UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Envolvimento da PI3K γ no efeito amnésico induzido pela escopolamina em
camundongos**

DAVI SILVEIRA SCOMPARIN

RIBEIRÃO PRETO
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

DAVI SILVEIRA SCOMPARIN

Envolvimento da PI3K γ no efeito amnésico induzido pela escopolamina em camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Aline Cristina de Campos.

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Scomparin, Davi Silveira

Envolvimento da PI3K γ no efeito amnésico induzido pela escopolamina em camundongos. Ribeirão Preto, 2020.

178 p.: il. ; 30 cm

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

Orientador: Campos, Aline Cristina de.

1. Memória 2. Escopolamina 3. Amnésia 4. Hipocampo
5. PI3K γ 6. AS605240

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SCOMPARIN, Davi Silveira

Título: Envolvimento da PI3Ky no efeito amnésico induzido pela escopolamina em camundongos.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____/____/ 2020

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Alline Cristina de Campos:

FMRP/USP

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Membro 1:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Membro 2:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Aos meus pais por todo tipo de apoio e a todos que direta ou indiretamente contribuíram em minha escalada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, fazendo jus aos mandamentos cristãos de que seu nome vem em primeiro lugar. Obrigado por me conceder capacidade intelectual e emocional para chegar até aqui, amém.

Aos meus pais por todo o suporte, seja financeiro ou emocional. Espero ter correspondido sempre como filho e, apesar das divergências normais da vida, ter podido trazer alguma luz à família de alguma forma.

Aos outros familiares que contribuíram com meu trabalho, especialmente meus avós e irmã, me dando forças para reascender a vontade interior de sempre melhorar e sair da inércia em busca de minhas motivações.

À minha orientadora, Dr^a Aline Cristina de Campos, por ter acreditado em meu potencial desde a época de iniciante na ciência e ter investido seu tempo e seus recursos para me moldar da melhor forma nessa área. Obrigado pelo espaço físico disposto para que eu pudesse realizar este trabalho.

À doutoranda Franciele, que me acolheu desde o princípio e me ensinou tudo o que eu sei hoje em dia, me ajudou a engatinhar pelo caminho da ciência e mostrou-se sempre disponível para me ajudar com aflições e problemas diversos. Você fez a diferença em tudo isso, tenha sempre em mente que você é brilhante.

Ao doutorando Gabriel, por todas as conversas bestas em carioquês(x) e o tempo gasto para tornar o meu fardo menor dentro de cada problema que apareceu. Agradeço também pelos ensinamentos técnicos e ajudas em diversos e incontáveis experimentos e afazeres, muito obrigado. Sei que você vai ler minha dissertação em algum momento da sua vida, sinta-se finalmente contemplado.

À doutoranda Karla, por sempre trazer luz ao nosso ambiente de convívio com seu jeito meigo e doce. Aprendi muito com você, não só em relação as normas ABNT, mas sobre ciência em geral e sobre a vida principalmente. Foi um prazer ter você como parte disso tudo, gratidão.

À doutoranda Melissa, por toda ajuda com meu ponto mais fraco (cálculo) entre outras, mas principalmente pelas conversas extra-lab, que tanto elevaram minha moral para continuar vendo a vida com bons olhos. Obrigado por ser folgada como eu e sempre preferir pegar o ônibus pro bandex do que ir andando.

Às pós-docs do nosso lab, Maria Adriele, Zezé e Tamires, por terem sido sempre gentis e me tratarem bem durante toda a caminhada. Agradeço principalmente à Maria Adriele pelos ensinamentos técnicos e por me tornado um mestre em estereotaxia,

participando sempre com boa vontade nos experimentos em que eu precisava de ajuda.

À Giuliana, pelo apoio técnico e pessoal no laboratório. Pode acreditar que seus ensinamentos serão levados para toda a minha vida, obrigado por compartilhar um pouco de sua experiência comigo.

A todos aqueles que já fizeram parte do laboratório e, conseqüentemente, da minha vida: Eduardo, Vinícius. Fernanda, Paula, Rafael, Mariana e Jordan. Levo sempre um resquício de cada um junto de mim, foi muito importante compartilhar momentos ao longo desses tempos.

Ao professor Francisco Guimarães e à professora Katiuchia Sales, por cederem gentilmente seus espaços físicos para a realização de diversos experimentos importantes para a conclusão desse trabalho.

Ao aluno Márcio Kodama, mestrando do laboratório da professora Katiuchia, pelo ensinamento técnico em uma fase difícil do projeto e pela disponibilidade sempre regada de bom humor e carisma.

À minha companheira Yurie Sato e sua família. Grande parte da motivação de continuar em Ribeirão Preto para fazer o mestrado foi devido a sua pessoa e, ao longo desse caminho, seu carinho foi a maior força que encontrei para sempre continuar em frente. Obrigado por me tornar uma pessoa melhor e me fazer enxergar que posso ser amado do jeito que eu sou.

A todos os meus amigos de Ribeirão Preto, pelos momentos de descontração e pelas conversas que tivemos, sinto falta da época em que podíamos ser mais próximos, mas vocês sempre estarão em minhas memórias.

Aos amigos da minha cidade natal, Bebedouro, que cresceram comigo e compartilharam desses momentos junto com minha pessoa. Obrigado por tudo, inclusive pelo sofrimento compartilhado em relação ao nosso time.

Aos professores do departamento de farmacologia, por terem me ensinado tantas coisas que levo até hoje e complementam meu conhecimento técnico.

Aos técnicos de suporte do departamento e demais funcionários, por me auxiliarem com sua experiência e sabedoria.

A todas as demais pessoas que se esconderam na minha memória neste momento, mas que me auxiliaram de alguma forma, meu muito obrigado por tudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Coordenação

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto L'Oreal pelo apoio financeiro.

“Nada fixa alguma coisa de forma tão intensa na memória como o desejo de esquecê-la.”

(Michel de Montaigne)

RESUMO

RESUMO

SCOMPARIN, D. S. **Envolvimento da PI3K γ no efeito amnésico induzido pela escopolamina em camundongos.** 2020. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Estudos mostram que diferentes doses do fármaco escopolamina (ESC) são capazes de gerar amnésia anterógrada em modelos animais, porém ainda não se sabe muito acerca do mecanismo exato pelo qual essa atividade é exercida. A proteína PI3K participa na regulação de uma série de processos intracelulares e é dividida em várias classes e tipos. Sua representante da classe Ib, denominada PI3K γ , demonstra estar envolvida em processos relacionados ao sistema nervoso central. Dessa forma, a hipótese de trabalho do presente estudo é que a proteína PI3K γ e as vias por ela reguladas possam estar envolvidas no efeito amnésico anterógrado gerado pela ESC. Para testar tal hipótese, foram utilizados camundongos machos e fêmeas (idade entre 10-12 semanas) *knock-out* (KO) para a proteína PI3K γ e camundongos *wild-type* (WT). O teste de reconhecimento de objetos (TRO) foi utilizado para avaliar as respostas mnemônicas dos animais e a ESC (1 e 2 mg/kg) foi administrada antes da etapa de aquisição do teste. Em um grupo separado, o antagonista seletivo para PI3K γ denominado AS605240 (Veículo, 3 nM, 10 nM e 30 nM) foi injetado de maneira intra-hipocampal apenas em animais WT canulados, sendo também injetado pareado a ESC. ESC, na dose de 1 mg/kg, gerou uma significativa redução do índice de discriminação entre os objetos no TRO em animais WT, mas esse efeito não foi observado em animais KO para PI3K γ , tanto machos quanto fêmeas. Não houve diferença comportamental correspondente a nenhuma concentração usada para a injeção central apenas de AS605240 no TRO. Quando injetado previamente à ESC, AS605240 na dose de 30 nM não foi efetivo em prevenir o efeito amnésico no TRO. Na região hipocampal, a expressão de proteínas vinculadas a vias associadas a PI3K γ (mTOR, Akt e associadas a via das MAP Kinases, tais como a Erk) foi analisada. Nesse panorama, foi verificado que animais PI3K γ KO apresentavam níveis de expressão alterados da proteína Erk e Akt, mas não da proteína mTOR. Juntos, estes dados demonstram que a PI3K γ está envolvida no mecanismo de ação da amnésia anterógrada induzida por ESC.

Palavras-chave: PI3K; Escopolamina; Memória; Hipocampo

ABSTRACT

ABSTRACT

SCOMPARIN, D. S. **PI3Ky participates in the amnesic effect induced by scopolamine in mice.** 2020. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Scopolamine (SCO), an antagonist of muscarinic receptors, induces anterograde amnesia in animal models, but the exact mechanism associated with this action remains unclear. The PI3K is a family of kinase proteins that play a role in regulating several intracellular processes and classified in 3 different classes. The PI3Ky is the member of class Ib and can control immune responses and central nervous system functions. Therefore, this study hypothesizes that the PI3Ky protein and its downstream signaling pathways are involved in the anterograde amnesia induced by SCO. Male and female mice (10-12 weeks old) knock-out (KO) for the PI3Ky protein and their wild-type (WT) littermates were used. The mnemonic function of the animals was addressed with the novel object recognition test (NOR). SCO (1 and 2 mg/kg) was administered before the acquisition step of the NOR protocol. A separate group of WT mice received an intra-hippocampal treatment with the selective PI3Ky antagonist AS605240 (Vehicle, 3 nM, 10 nM, and 30 nM) in the acquisition phase of the NOR protocol and this pharmacological intrahippocampal inhibition of PI3Ky (at the highest concentration tested) was paired with SCO treatment as well. Both in male and female mice, the treatment with SCO (1 mg/kg) induced a significant decrease in the discrimination index between the novel and familiar objects in the NOR test in WT mice, but this effect was absent in PI3Ky KO mice. None of the concentrations of AS605240 injected into the hippocampus altered the behavioral response of mice in the NOR test. The highest ineffective concentration tested (30nM), therefore, was administered before SCO treatment, however, AS605240 was not able to prevent the anterograde amnesia induced by SCO. The expression of proteins associated with the PI3Ky pathway (mTOR, Akt, and the MAP kinase-associated protein Erk) in the hippocampal formation was analyzed. Compared to their WT littermates, the PI3K KO mice presented altered hippocampal levels of Erk and Akt, but not mTOR. Our results support that the PI3Ky protein and its signaling pathways are involved in the anterograde amnesia induced by SCO in mice.

Key-words: PI3K; Scopolamine; Memory; Hippocampus.

SUMÁRIO

Sumário

1. Introdução.....	18
1.1. Neurobiologia da Memória	18
1.2. Sistema colinérgico central e memória.....	24
1.3. Escopolamina e memória.....	28
1.4. Mecanismos moleculares associados ao efeito central da escopolamina: A via da PI3Ky	31
1.5. Hipótese	34
2. Objetivos.....	36
2.1. Objetivo Geral	36
2.2. Objetivos Específicos	36
3. Material e Método	38
3.1. Animais	38
3.2. Drogas.....	38
3.3. Cirurgia estereotáxica	38
3.4. Teste de reconhecimento de objetos	39
3.5. Coleta e preservação do tecido.....	40
3.6. Genotipagem.....	40
3.7. Western Blot.....	43
3.8. Procedimentos Experimentais.....	45
3.8.1. Caracterização dos efeitos mnemônicos da escopolamina em animais <i>Wild Type naives</i>	45
3.8.2. Efeitos mnemônicos da escopolamina sobre animais PI3Ky <i>knockout</i> (KO)	45
3.8.3. Validação genotípica acerca do efeito amnésico da escopolamina em animais PI3Ky KO <i>inbreed</i>	46
3.8.4. Validação farmacológica acerca da participação da PI3Ky na amnésia anterógrada induzida pela Escopolamina	47

3.8.5. Caracterização molecular de vias de sinalização relacionadas a PI3Ky perante tratamento com escopolamina	49
3.9. Análise Estatística	49
4. Resultados.....	51
4.1. Análises comportamentais	51
4.1.1. Escopolamina na dose de 1 mg/Kg é efetiva em gerar amnésia anterógrada em animais selvagens	51
4.1.2. O <i>knockout</i> da proteína PI3Ky previne o efeito amnésico induzido pela escopolamina na dose de 1 mg/Kg.....	53
4.1.3. Animais <i>inbred knockout</i> e heterozigotos para a proteína PI3Ky de ambos os sexos não apresentam amnésia induzida pela escopolamina a 1 mg/Kg	55
4.1.4. A administração intrahipocampal de AS605240 não promove efeito comportamental relacionado a memória independentemente da dose	59
4.1.5. A administração intrahipocampal de AS605240 a 30 nM não é capaz de prevenir o efeito amnésico induzido pela escopolamina a 1 mg/Kg.....	61
4.2 Análises moleculares	63
4.2.1. Análise do nível de expressão de proteínas relacionadas a PI3Ky em animais <i>outbreed</i>	63
5. Discussão	69
6. Conclusão.....	83
7. Referências.....	85

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Neurobiologia da Memória

“A memória é a cola que mantém nossa vida mental unida. Sem o seu poder unificador, nossa vida consciente e inconsciente seria dividida em mais fragmentos do que segundos existentes em um dia” (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014).

Memória, pela etimologia da palavra, tem origem difusa do latim “memoria” e do grego “mnemis”, onde encontramos o significado de “aquele que se lembra”, segundo o dicionário Aurélio de língua portuguesa. Mais do que um processo natural e cotidianamente presente na vida dos seres vivos, a memória é também o ponto que nos caracteriza como seres únicos e define nossa própria essência, como brilhantemente ilustrado por Eric Kandel (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014). Porém, por trás desse conceito que parece simples à primeira vista, há uma história muito rica em relação a definição de memória segundo os aspectos neurobiológicos, que, de forma mecânica, nos possibilitam viver de maneira homeostática.

Os estudos acerca do funcionamento da memória são antigos e passam por muitas proposições da área da psicologia e de cunho filosófico criadas há muito tempo atrás até chegar ao começo do século XIX, onde o contato com a gênese da memória passou a ser mais direto. Franz Joseph Gall (1758-1828), médico e neuroanatomista alemão, introduziu um importante conceito que até hoje permanece enraizado na história da ciência, postulando que todas as atividades mentais emanam do cérebro e, além disso, que o cérebro não é um órgão homogêneo, mas multifacetado em detrimento das tarefas que comporta, ou seja, cada atividade diferente possui um local de inserção específico por dentro toda a massa que compõe o cérebro (FRANZ JOSEPH GALL E JOHANN SPURZHEIM, 1809). Anos depois, em 1861, Paul Broca, neurologista francês, compartilhou das ideias de Gall ao inferir que pacientes que possuíam um tipo de distúrbio na fala (patologia hoje conhecida como afasia de Broca) possuíam lesões em uma área específica do córtex cerebral (que tornou-se conhecida como área de Broca), descrita a partir de estudos post mortem (PAUL BROCA, 1865). Esses achados, somados aos de Carl Wernicke, em 1876, que descreveu um segundo tipo de afasia (conhecida como afasia de Wernicke) proveniente de lesões em outra região do córtex cerebral (hoje conhecida como área de Wernicke), demonstram que o cérebro pode ter áreas especializadas, mas suas funções decorrem da atividade

integrada de múltiplas faces, como concluído pelo próprio Wernicke (C. WERNICKE, 1908).

Além de possibilitar um conhecimento mais amplo acerca da neurobiologia, essas descobertas também preconizaram a investigação das áreas encefálicas envolvidas em outras diversas atividades, como a memória. A partir delas, muitos pesquisadores se esforçaram para “localizar” a memória a nível cerebral, e muitos deles falharam, como Karl Lashley, professor de psicologia em Harvard, que treinava a memorização em ratos por meio de tarefas específicas e paulatinamente removia partes do córtex cerebral dos animais cirurgicamente, a fim de testar posteriormente a evocação das memórias referentes as tarefas treinadas (LASHLEY, 1929). Sua pesquisa, porém, não foi satisfatória em ligar a memória a uma estrutura encefálica específica. Apenas em 1938, Wilder Penfield, neurocirurgião canadense, conseguiu evidências importantes de que a memória poderia ser estocada em determinada área cerebral. Visando mapear as microrregiões encefálicas responsáveis pelo quadro de epilepsia em pacientes, Penfield realizava estimulações elétricas em diversas áreas cerebrais dos pacientes não anestesiados de forma geral, uma vez que o cérebro não possui receptores nociceptivos, assim podendo obter relatos preciosos dos enfermos enquanto realizava os procedimentos. Em raras ocasiões, devido a estimulação de porções do lobo temporal, os pacientes relatavam experiências já vividas que podiam ser amplamente descritas, o que caracterizava uma percepção mnemônica. Penfield concluiu, portanto, que a memória poderia estar relacionada ao lobo temporal (PENFIELD; PEROT, 1963).

A partir disso, novas descobertas possibilitaram elencar definitivamente o lobo temporal como uma estrutura chave para o processo de memorização. Brenda Milner (colaboradora de Penfield por muito tempo) e William Scoville, reportaram em 1957 o famoso caso do paciente Henry Molaison (H.M), que sofria de ataques epiléticos desde os 9 anos de idade em decorrência de um acidente que ocasionou um trauma na cabeça. Como último recurso, devido a incapacitante vida à qual a epilepsia o lavava, H.M passou por uma lobotomia para a retirada dos lobos temporais, que continham o foco para suas crises. A cirurgia trouxe alívio para suas constantes convulsões, porém o levou a um profundo déficit de memória, passando a apresentar amnésia anterógrada desde o dia da cirurgia e sendo, a partir dela, incapaz de formar novas memórias de fatos ou eventos (SCOVILLE; MILNER, 1957). O fato ocorrido

com H.M se tornou um marco para a neurociência e possibilitou o crescimento do estudo da memória em amplos aspectos, como em relação as suas posteriores formas e/ou classificações.

Através do acompanhamento temporário de H.M após sua cirurgia, Milner conseguiu perceber algumas evidências importantes que corroboraram com divisões sistemáticas em relação a memória. Seu paciente apresentava uma crescente melhora em sua habilidade motora quando colocado para realizar tarefas complicadas (como desenhar figuras específicas em frente a um espelho) mesmo que nunca as tivesse feito em sua vida antes da cirurgia (CORKIN, 1965). Experimentalmente, essa evidência pôde representar ideias já existentes naquela época de que a memória pode ter mais de um aspecto, como enfatizado por Henri Bergson em 1913 que dizia que a memória poderia ser “consciente” ou “hábil” (HENRI BERGSON, 1913). Em 1949, Gilbert Ryle propôs a ideia de *knowing how*, destacando um componente implícito de memória (GILBERT RYLE, 1949), o que foi usado mais tarde por Jerome Bruner para postular que a memória pode ser acompanhada de uma lembrança ou não, como no caso da memória de habilidades (GREENFIELD, 2016). Juntos, esses fatos puderam ajudar a elencar a memória quanto ao seu conteúdo principal, como baseado nas ideias de Squire, sendo classificadas como declarativas (ou explícitas) correspondente a fatos ou eventos, ou não-declarativas (implícitas) correspondentes a habilidades motoras (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1991), o que está sumarizado na figura 1.

Figura 1. Imagem representativa do esquema de divisão funcional da memória. A memória pode ser brevemente dividida em dois subtipos: Explícitas que dizem respeito às informações relacionadas a fatos ou eventos, e implícitas relacionadas a habilidades mecânicas.

O paciente H.M ainda promoveu valiosos achados no que consta ao tempo de armazenamento das informações memorizadas, bem como o local onde estas podem ser estocadas. Em suas observações, Milner constatou que H.M ainda mantinha boa fluência do inglês e conseguia descrever fatos passados e até mesmo de minutos antes de sua cirurgia com precisão e fluidez. Hoje em dia, a partir destas observações, sabemos que as memórias são estocadas no córtex ligado a origem sensorial da informação memorizada (MCCLELLAND; MCNAUGHTON; O'REILLY, 1995). Além do mais, H.M era capaz de replicar uma informação dada a ele segundos ou minutos depois e progredir em uma conversação momentânea normalmente, apesar de não ser capaz de se lembrar dela no dia posterior. Juntas, essas informações validaram outra forma de divisão da memória, relacionado ao tempo de armazenamento da informação, que consiste em memórias de curto prazo que duram de minutos à poucas horas, e memórias de longo prazo, com duração indefinida, podendo durar até o fim da vida. Uma memória de curto prazo pode vir a ser uma memória de longo prazo

dependendo da reverberação dessa informação, da atenção dada a ela e de aspectos emocionais ligados ao fato, dentre outras coisas, como exemplificado na figura 2.

Figura 2. Representação esquemática da transformação de uma memória de curto prazo em longo prazo. Após sua aquisição, a memória de curto prazo pode se tornar uma memória de longo prazo através da consolidação, sendo posteriormente estocada e permanecendo disponível para evocação durante longos períodos de tempo.

A partir do caso de H.M, muitas descobertas foram feitas em relação ao processo de sedimentação da memória. Sabemos hoje que o hipocampo (componente do lobo temporal), a nível estrutural, é um dos centros mais importantes relacionados a memória, principalmente para o processo de consolidação (EICHENBAUM, 2004; OPITZ, 2014; VOSS et al., 2017). Sua composição estrutural permite a integração de informações adquiridas de diversos sistemas cerebrais, como as providas pelo córtex entorrinal (KNIERIM; LEE; HARGREAVES, 2006; MANNS; EICHENBAUM, 2006). Este *input* alcança o giro denteado através da via perforante e, posteriormente, atinge o corno de Ammon 3 (CA3) pelas fibras musgosas (Mossy). A região CA3 se conecta com o corno de Ammon 1 (CA1) pelos colaterais de Schaffer, a qual emite projeções para o subículo, importante via de saída hipocampal e que caracteriza o fim de um circuito importante para a reverberação da informação adquirida (KESNER, 2007; ZHAO et al., 2006), simplificado e ilustrado na figura 3.

Figura 3. Representação esquemática do circuito hipocampal responsável pela consolidação da memória. O hipocampo pode reverberar informações adquiridas levando a sua consolidação. De forma simplificada, o *input* passa do córtex entorrinal para o giro denteado, indo posteriormente para a região CA3 e então CA1, de onde parte para o subículo.

O Hipocampo também foi a primeira estrutura a prover a evidência mecânica do processo de consolidação. Em 1973, Timothy Bliss e Terje Lomo observaram uma mudança na eletrofisiologia de neurônios hipocampais após a administração de pulsos de alta frequência, o que contribuiu para o aumento da força sináptica na região (BLISS; LØMO, 1973). A este evento foi dado o nome de *long term potentiation* (LTP), ou potenciação a longo prazo. Esse fenômeno está intimamente envolvido com o processo de sedimentação da memória. A indução de tarefas exploratórias facilita o início da LTP no hipocampo de roedores, e seu bloqueio consegue abolir a consolidação do aprendizado (LYNCH, 2004; ROSE; DUNWIDDIE, 1986). A fase tardia da LTP, após um crítico período de estimulação de alta frequência, é

caracterizada pela síntese proteica de moléculas chave para sua manutenção, o que explica o tempo levado para uma memória de curto prazo se tornar uma memória de longo prazo (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; KANDEL, 2001), como também pode explicar sua maior durabilidade.

De modo geral, a LTP é induzida de forma direta devido a um aumento nos níveis de glutamato na fenda sináptica (ERRINGTON; GALLEY; BLISS, 2003; LYNCH; ERRINGTON; BLISS, 1985), neurotransmissor que é importante para a fase de indução do processo, podendo agir através de receptores AMPA, principalmente, para mobilizar as fases subsequentes até a síntese proteica inicial. Por se tratar de um processo amplamente conservado e muito importante fisiologicamente, muitos outros sistemas neuromoduladores podem influenciar na regulação fina deste evento, uma vez que possuem a capacidade de influenciar na neurotransmissão glutamatérgica para a LTP, como é o caso do sistema colinérgico central, conhecido neuromodulador do sistema glutamatérgico e classicamente envolvido com o processo de memória (ELMSLIE; YOSHIKAMI, 1985; MARCHI; GRILLI; PITTALUGA, 2015).

1.2. Sistema colinérgico central e memória

Dentre os vários sistemas que regulam de maneira complexa a formação da memória, o sistema colinérgico central possui grande destaque, principalmente no que tange a elaboração de memórias de longo prazo dependentes do hipocampo (HAAM; YAKEL, 2017).

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor a ser descoberto, ainda em 1921, por Oto Loewi, que demonstrou sua liberação a partir de estimulações do nervo vago utilizando rãs (LOEWI, 1921), ainda que a substância já tivesse sido notada anteriormente por Henry Dale, que verificou que esta possuía capacidade de mimetizar efeitos parassimpáticos (H.H. DALE, 1914). Desde então, suas ações centrais ganharam notoriedade, uma vez que o sistema colinérgico central, pautado em seus neurônios principais (aqueles que produzem acetilcolina, caracterizados por conter sua principal enzima de síntese: a colina-acetiltransferase [ChAT]), colonizam de forma vasta o SNC (ARMSTRONG et al., 1983; LOEWI, 1921), participando de inúmeras funções fisiológicas. Segundo Mesulam (1983), o sistema colinérgico central

pode ser dividido em 4 pontos de partida, caracterizados como Ch1 a Ch4. O primeiro comporta corpos celulares de neurônios colinérgicos presentes no núcleo septal e, junto com o ponto 2 (Ch2), que emite aferências da porção vertical do núcleo da banda diagonal, inervam majoritariamente o complexo do hipocampo. O ponto Ch3 emite aferências da porção horizontal do núcleo da banda diagonal e caracteriza-se por inervar o bulbo olfatório. Por último, o quarto ponto (Ch4) provê aferências do núcleo basilar de Meynert (substância Inominada), destinatárias à amígdala e ao restante do córtex cerebral.

A regulação da liberação de ACh entre os sistemas a nível sináptico se dá de forma complexa e inclui proteínas responsáveis pela sua síntese, liberação, degradação e recaptção. A colina-acetiltransferase (ChAT) é a enzima responsável pela formação da ACh, iniciando o seu ciclo de ação ainda no citoplasma do neurônio pré-sináptico. Ela catalisa a acetilação da colina através da acetil coenzima A (acetil-CoA), que funciona como um doador de grupamentos acetil e é provido pela mitocôndria (NACHMANSOHN; MACHADO, 1943). Uma vez formada, a ACh pode ser armazenada em vesículas para posterior liberação na fenda sináptica através da despolarização dos neurônios que a contém, exercendo sua atividade no neurônio pré ou pós-sináptico e sendo rapidamente degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato (AUGUSTINSSON; NACHMANSOHN, 1949). A colina resultante da hidrólise promovida pela AChE pode ser ainda recaptada pelos transportadores de colina (que realizam a etapa limitante do processo), presentes na membrana do neurônio pré-sináptico, onde se destaca o transportador de colina sódio-dependente CHT1, o qual é responsável por realocar a colina no citoplasma novamente, reiniciando seu ciclo de ação, o qual está exemplificado na figura 4.

Figura 4. Imagem representativa da dinâmica sináptica relacionada a acetilcolina no sistema nervoso central. A acetilcolina (ACh) é sintetizada pela enzima ChAT através da acetilação da colina com a Acetil-CoA. Ao ser liberada, pode atuar de forma pré ou pós-sináptica em receptores muscarínicos (M) ou nicotínicos (N). É hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) e a colina resultante é recaptada para o neurônio pré-sináptico por transportadores específicos, como o CHT1, podendo reiniciar o ciclo (adaptado de Harald Hampel *et al.* 2018).

Para intermediar as ações da neurotransmissão colinérgica, dois tipos de receptores existem: Nicotínicos e muscarínicos. Os nicotínicos se caracterizam por serem canais iônicos responsivos a cátions (K^+ , Na^+ e Ca^{+2}), formados por dois tipos de subunidades no SNC (α_{2-10} e β_{2-4}), o que os possibilita promover respostas celulares rápidas (BRISSON; UNWIN, 1984; COOPER; COUTURIER; BALLIVET, 1991; NAI; MCINTOSH; MARGIOTTA, 2003). Já os muscarínicos têm como característica serem receptores acoplados a proteína G, o que os permite modular a excitabilidade celular em função da capacidade de interferir na sinalização iônica promovida pelos canais celulares (NATHANSON, 2000). Até o momento, foram identificados 5 subtipos de receptores muscarínicos (M_1 a M_5) que se diferenciam pelo tipo de proteína G acoplada a eles (BONNER *et al.*, 1987). Os subtipos M_1 , M_3 e M_5

são acoplados a proteína G_q , que possui característica de aumentar a concentração de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, levando a ativação da fosfolipase C (PLC) que facilita o fechamento de canais de K^+ , aumentando a excitabilidade celular (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998; HAMMER et al., 1980). Já os subtipos M_2 e M_4 são acoplados a proteína G_i , a qual atua de maneira antagônica à proteína G_q , promovendo queda dos níveis de AMPc intracelular e causando fechamento de canais Ca^{+2} -dependentes, diminuindo a excitabilidade celular e contribuindo para as atividades pré-sinápticas de autorreceptor destes subtipos (EGAN; NORTH, 1986; EHLERT et al., 1991). Apesar da sinalização muscarínica parecer simples, estes receptores podem participar também da produção de segundos mensageiros importantes para o *cross-talking* de muitas vias de sinalização no SNC, contemplando uma gama de atividades diferentes (FELDER, 1995).

O já citado hipocampo, estrutura relacionada a consolidação de memórias explícitas, possui receptores muscarínicos (principalmente do subtipo M_1) que o auxiliam nessa função (LEVEY et al., 1995). Sua ativação na região CA1 leva a uma LTP espontânea em neurônios piramidais (BUCHANAN et al., 2010; DENNIS et al., 2016; SHIMOSHIGE et al., 1997) que também pode se relacionar a um melhor desempenho no teste para memória do labirinto aquático de Morris (DIGBY et al., 2012), enquanto que o bloqueio do receptor M_1 na região CA3 por anti-muscarínicos leva a um prejuízo na consolidação de informações (ROGERS, 2004). Além do mais, as oscilações *theta* (4-12 Hz) características do hipocampo e relacionadas à processos cognitivos e de consolidação da memória são intimamente reguladas pela ACh (GU et al., 2017), uma vez que a inativação da via septal do hipocampo é capaz de abolir estas ondas e causar déficits cognitivos em ratos (BRANDON et al., 2011; KOENIG et al., 2011; MA et al., 2009). Porém, reside na patologia uma das maiores evidências de que o sistema colinérgico central possui influência sobre o aspecto cognitivo, principalmente relacionado a memória de longo prazo. Descoberta por Alois Alzheimer em um estudo de campo em 1906 (ALZHEIMER, 1907), a popularmente conhecida doença de Alzheimer (DA) tem como principal característica a perda de memória progressiva, sintoma este relacionado ao enfraquecimento da sinalização colinérgica central como um todo devido a neuro degeneração (BARTUS et al., 1982; GEULA; MESULAM, 1995). Nos pacientes acometidos, bem como em modelos animais para DA, há um enfraquecimento progressivo das projeções colinérgicas da

área septal para o hipocampo, dificultando a formação de novas memórias (BELARBI et al., 2011; DAVIES; MALONEY, 1976). Além do mais, também foi observada a redução do número de receptores muscarínicos no hipocampo de pacientes com DA, bem como uma reduzida capacidade de ligação da ACh a eles (PARENT et al., 2013; SHIOZAKI et al., 2001). Somado a isso, a primeira escolha farmacológica para tratar a DA se concentra nos inibidores da acetilcolinesterase (como a tacrina, rivastigmina, galantamina e donepezila) que, se inibida, pode indiretamente acarretar no aumento da concentração de acetilcolina nas fendas sinápticas colinérgicas, melhorando o quadro clínico previamente apresentado (BIRKS et al., 2009; BIRKS, 2006; RAINA et al., 2008; SUN et al., 2008).

Perante tudo isso, a sinalização colinérgica central é alvo de muitos estudos envolvendo não só a patologia da DA, mas também o processo de memória como um todo. Experimentos feitos com lesões de núcleos colinérgicos (SMITH, 1988) e com antagonistas muscarínicos (MYERS et al., 1971) serviram de base para estudos pré-clínicos sobre a memória, e, em geral tendem a mimetizar o perfil amnésico presente na DA, servindo para o estudo das diversas classes que compõem o processo mnemônico.

1.3. Escopolamina e memória

A relação envolvendo a escopolamina com seus efeitos sobre o SNC e sobre a memória é antiga. Desde os tempos mais remotos, as pessoas já possuíam o conhecimento de que certos extratos de plantas poderiam afetar o estado mental de um indivíduo (SCHULTES; HOFMANN; RÄTSCH, 2001). Nesse contexto, plantas da família *Belladonna*, *Mandrake*, *Datura* e *Henbane* eram usadas para compor as chamadas “poções mágicas”, utilizadas em ritos para alterar o estado de realidade individual. Passados os efeitos da ingestão das plantas, muitos indivíduos apresentavam amnésia em relação aos acontecimentos no período em que estavam sob a ação dos extratos (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010). Muitas outras utilidades eram encontradas para os extratos das plantas tropânicas, como o aumento do efeito “emocional” da cerveja em relatos vindos da Rússia e China, e também o efeito anestésico para diversas dores encontrado em documentos da Babilônia (ULBRICHT et al., 2005). Apesar disso, seus efeitos capaz de alterar a consciência também eram

(e ainda são) usados para cometer crimes como assassinatos, torturas e estupros (BRUGGER, 2000).

A elucidação acerca de quais compostos presentes nestas plantas promoviam tais efeitos centrais começou a ser desvendada em 1833, quando Geiger e Hesse isolaram a atropina, um alcaloide tropânico, de plantas como a *Atropa belladonna* e *Hyoscyamus niger* (GEIGER; HESSE, 1833). A partir disso, em 1864, Lossen descobriu que a atropina poderia ter um componente racêmico, o qual chamou de hiosciamina. A busca por mais compostos presentes nas plantas tropânicas abriu caminho para que a escopolamina (ESC) fosse isolada pela primeira vez em 1880. Desde então, a ESC pode ser usada na clínica para inúmeras finalidades, sendo que uma das principais é para a profilaxia de náuseas e vômitos decorrentes de grandes cirurgias (PERGOLIZZI et al., 2012). Além disso, também é um dos fármacos mais utilizados para tratar enjoos e distúrbios que acometam o sistema gastrointestinal (presente no Buscopan®, por exemplo), devido a seu grande poder de diminuir a motilidade de músculos lisos (PARROTT, 1989). Perante sua grande capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica devido a sua estrutura de amina terciária (figura 5), os efeitos amnésicos característicos que produz foram notados em muitos casos clínicos decorrentes de seu uso em cirurgias (HARDY; WAKELY, 1962; KOPELMAN, 1986). Experimentalmente, seus efeitos sobre a cognição já tinham sido observados empiricamente em meados da década de 1910 (GAUSS, 1906; THOMSON; COTTERILL, 1910) vindo a ganhar mais notoriedade científica apenas a partir da década de 50 (BOREN; NAVARRO, 1959; HEARST, 1959). Desde então, muitas outras observações acerca do efeito central deste fármaco foram colhidas em testes característicos para mensuração mnemônica (ESTAPÉ; STECKLER, 2002; FLOOD; CHERKIN, 1986; HODGES et al., 2009; NOMURA et al., 1994; ROBINSON; HARBARAN; RIEDEL, 2004; STEVENS, 1981) tornando a escopolamina uma referência como modelo de indução de efeitos amnésicos (BAJO et al., 2015). Propõe-se que estes efeitos estejam relacionados principalmente com o bloqueio e consequente distúrbio da sinalização colinérgica mediada por receptores muscarínicos (principalmente M₁), uma vez que a escopolamina age de forma não seletiva sobre todos os tipos de receptores muscarínicos (BOLDEN; CUSACK; RICHELSON, 1992).

Figura 5. Imagem representativa da síntese da escopolamina a partir da tropinona, componente de plantas tropânicas. A reação envolvendo tropina (sintetizada a partir da tropinona) e derivados da fenilalanina é capaz de produzir hiosciamina que pode ser convertida em hioscina, conhecida como escopolamina (adaptado de Lanoue *et al.* 2002).

Apesar de contemplar um robusto mecanismo para o estudo da memória em geral, há ainda certa divergência literária em relação aos efeitos amnésicos da escopolamina. Dependendo da fase de memorização e da estrutura encefálica onde há a infusão de escopolamina e outros agentes parassimpatolíticos, ocorre um efeito paradoxal de facilitação da retenção/evocação da memória, oposto ao efeito amnésico clássico (FARR *et al.*, 2000; VAZDARJANOVA; MCGAUGH, 1999; WINTERS *et al.*, 2007; WINTERS; SAKSIDA; BUSSEY, 2006), além do mais, a mecamilamina, um

antagonista não específico de receptores nicotínicos é capaz de reverter os efeitos amnésicos induzidos pela escopolamina, sugerindo que este efeito possa não ser decorrente puramente de um bloqueio de ações colinérgicas intermediadas simplesmente e unicamente por receptores muscarínicos (NEWMAN; GOLD, 2016).

Somado a isso, alguns estudos dão conta de que alterações moleculares podem reverter o efeito amnésico induzido pela escopolamina, como por exemplo o tratamento com genisteína (4,5,7- trihidroxiisoflavona) que reverte o prejuízo de memória no labirinto aquático de Morris ao mesmo passo que aumenta significativamente os níveis de Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) e BDNF (*brain-derived neurotrophic fator*) hipocampais (LU et al., 2018), muito semelhante ao efeito da ipriflavona, onde também há restauração comportamental no teste de Morris relacionada a um aumento dos níveis de Erk no hipocampo (HAFEZ et al., 2017a). A curcumina (*Curcuma longa*) reverte o efeito amnésico causado pela escopolamina no medo condicionado ao contexto e promove um aumento dos níveis de Akt (ou PKB – proteína *kinase* B) fosforilada no hipocampo dos animais usados no teste (SOUKHAKLARI et al., 2018). Essas evidências dão margem à hipotéticas associações do efeito amnésico produzido pela escopolamina com efetores moleculares.

1.4. Mecanismos moleculares associados ao efeito central da escopolamina:

A via da PI3Ky

A fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K, do inglês *phosphoinositide-3-kinase*) é uma enzima constituinte de uma super família de proteínas (a família das PI3K) que tem por característica a catálise da fosforilação de fosfolipídeos de membrana (chamados de inositol) em sua posição 3, dando origem a segundos mensageiros lipídicos com inúmeras funções (CANTLEY, 2002; STEPHENS; JACKSON; HAWKINS, 1993). Descoberta em meados dos anos 80, foi amplamente associada à sinalização de processos neoplásicos, uma vez que esteve ligada primariamente à transdução de sinal de receptores do tipo tirosina *kinase*, relacionados com o crescimento celular em variados contextos (CANTLEY et al., 1991; SUGIMOTO et al., 1984; WHITMAN et al., 1988). Desde então, muitos estudos deram força à teoria de que as PI3K também poderiam ser ativadas por receptores acoplados a proteína G em alguns tecidos

específicos como neutrófilos e plaquetas (KUCERA; RITTENHOUSE, 1990; STEPHENS; JACKSON; HAWKINS, 1993; TRAYNOR-KAPLAN et al., 1988).

Em relação a sua especificidade pelo substrato e função, as PI3K puderam ser divididas em classes diferentes. As PI3K de classe II somam 3 componentes (PI3K-C2 α , C2 β e C2 γ) enquanto há apenas 1 representante definido até momento da classe III das PI3K (hVPS34) (BACKER, 2016; FALASCA; MAFFUCCI, 2012). Porém, as mais estudadas são as PI3K de classe I, com 4 componentes elencados (PI3K α , β , δ e γ), os quais podem ser divididos em subclasses de acordo com sua homologia e mecanismo de ativação (Tirosina *kinase* ou proteína G, citado anteriormente) (HAWKINS; STEPHENS, 2016). Baseado em estudos bioquímicos de purificação de DNA e análise homóloga, descobriu-se que as PI3K de classe I formavam dímeros e possuíam uma subunidade regulatória e outra catalítica (figura 6), a qual é compartilhada entre elas, sendo sempre a molécula p110 (podendo ser p110 α , β , δ e γ dependendo do gene que a codifica) (VANHAESEBROECK et al., 2001). Para as PI3K α , β e δ a subunidade regulatória pode ser formada por proteínas p50-55/p85, já para a PI3K γ , a composição do dímero é fechada com as subunidades regulatórias p101 ou p84 (também conhecida como p87) (FRUMAN et al., 2017; STEPHENS et al., 1997). De forma interessante, a PI3K γ é também a única isoforma da classe I a ser ativada por receptores acoplados a proteína G, o que predispõe sua inserção na subclasse Ib, em detrimento de suas coirmãs (α , β e δ) que compõe a classe Ia por serem ativadas por receptores tirosina *kinase*.

Classe I		Subunidades Regulatória	Catalítica	Especificidade pelo substrato	Ativação
Classe IA		p85α p85β p55α p55γ p50α	p110α p110β p110δ	PI PIP PIP ₂	Tirosina Kinase
Classe IB		p101 p84	p110γ	PI PIP PIP ₂	Receptores acoplados a proteína G (unidade Gβγ)

Figura 6. Imagem representativa da homologia das PI3Ks de classe I. As PI3K de classe Ia caracterizam-se por formar dímeros compostos por proteínas reguladoras (p50/p55 – p85) e uma subunidade catalítica (p110 α , β e δ), sendo ativadas por receptores tirosina kinase. A PI3K γ , representante única da classe Ib e ativada pela proteína G, é formada pela mesma subunidade catalítica (p110 γ), com reguladores diferentes (p84 ou p101) (adaptado de Doepfner et al. 2007).

A PI3K γ , assim como todas as outras representantes da classe I, por meio da produção dos já citados segundos mensageiros lipídicos (principalmente o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) tem a capacidade de ativar vias muito conhecidas e que compõe variadas funções biológicas, como é o caso da via canônica PI3K – Akt – mTOR (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006; VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012). Apesar da similaridade de funções, a PI3K γ é historicamente menos estudada em comparação as outras componentes da classe I, e um dos motivos é sua expressão celular restrita a poucos órgãos, enquanto suas coirmãs apresentam expressão ubíqua (VANHAESEBROECK; WHITEHEAD; PIÑEIRO, 2016). A expressão da PI3K γ é ligada principalmente a funções do sistema imune (FRUMAN; BISMUTH, 2009; HIRSCH et al., 2000), cardiovascular (PATRUCCO et al., 2004) e encefálico (CUNHA et al., 2010; NARITA et al., 2002; RÜCKLE; SCHWARZ; ROMMEL, 2006), sendo o último, comparativamente, o menos estudado entre eles, resultando em poucas evidências sobre a função biológica da PI3K γ nesse sistema.

Estudos prévios sugerem que a PI3K γ possa se relacionar a situações que envolvam quebra da homeostase no SNC (HUANG et al., 2015; JIN et al., 2010; LIU et al., 2019), entre eles a desestabilização do processo cognitivo normal (semelhante ao que faz a escopolamina), prejudicando a LTD (*long term depression*) hipocampal quando hiperexpressa nesse tecido (CHOI et al., 2014). A falta da PI3K γ no *locus coeruleus* pode desestabilizar o mecanismo de atenção, essencial para sedimentar informações adquiridas, influenciando até mesmo nos níveis de CREB nessa região, outrora ligado ao processo de LTP na consolidação (D'ANDREA et al., 2015). Paralelamente, as PI3K já demonstraram ter um papel fundamental na manutenção do processo mnemônico homeostático, de forma geral. A administração intracerebroventricular (i.c.v) de *Wortmannin*, um inibidor irreversível de PI3Ks, demonstrou afetar a memória espacial dependente do hipocampo (MIZUNO et al., 2003) enquanto a administração i.c.v de outro inibidor de PI3Ks, LY294002, promoveu bloqueio da progressão do processo de LTP hipocampal e resultou em déficits cognitivos evidenciados no teste de reconhecimento de objetos (HORWOOD et al., 2006). Pouco estudada no SNC e muito semelhante funcional e homologicamente, a PI3K γ poderia também participar de processos cognitivos assim como suas semelhantes. Além do mais, ao ser ativada por receptores acoplados a proteína G, poderia paralelamente se relacionar com receptores muscarínicos, fundamentais

neste processo mnemônico, e que parecem depender de uma íntegra sinalização mediada por PI3K (SLACK; BLUSZTAJN, 2008).

A sinalização através de receptores muscarínicos no contexto da consolidação leva a síntese proteica de moléculas relacionadas diretamente as PI3Ks, como Akt e mTOR, as quais podem estabilizar o processo de LTP (SHEHATA; INOKUCHI, 2014). Experimentos utilizando a rapamicina, um inibidor específico de mTOR, antes da indução de LTP, mostram prejuízo na LTP tardia (CAMMALLERI et al., 2003; TANG et al., 2002; VICKERS; DICKSON; WYLLIE, 2005). Por outro lado, manipulações genéticas em camundongos que resultam no aumento da atividade basal de mTOR, facilitam a LTP (HOEFFER et al., 2008). Relacionada a sua função de ancoramento, a PI3K γ especificamente pode mobilizar e ativar a proteína Ras, participante da via das MAPK, paralela à via canônica efetivada por mTOR (PACOLD et al., 2000). Embora funcione paralelamente a principal via ativada pela PI3K, a via das MAPK pautada em sua efetora ERK também é correlacionada com o correto funcionamento da LTP e consolidação da memória (ATKINS et al., 1998; WALZ et al., 2000).

Baseado nesses fatos, a PI3K γ poderia estar relacionada ao mecanismo de ação de drogas que comprometam o processo mnemônico através da interferência no sistema colinérgico, em especial a escopolamina.

1.5. Hipótese

A hipótese do presente estudo é de que a PI3K γ é a via de sinalização responsável pelo efeito amnésico induzido pela escopolamina em modelos animais.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a possível participação da proteína PI3K γ no efeito amnésico induzido pela escopolamina em camundongos quando injetada na fase prévia a aquisição.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito amnésico em potencial de diferentes doses do fármaco escopolamina quando administrado via i.p em camundongos selvagens (WT) *naes*.
- Analisar o efeito da escopolamina em animais *knockout* (KO) para a proteína PI3K γ em um contexto de disfunção do processo de memória.
- Verificar a importância do fator sexo em relação aos animais PI3K γ KO sobre o possível efeito amnésico da escopolamina
- Promover um paralelo farmacológico utilizando um inibidor preferencial da PI3K γ , chamado AS605240, verificando seus efeitos sobre a ação da escopolamina.
- Mensurar a expressão de componentes de vias moleculares relacionadas à proteína PI3K γ , direta ou indiretamente, como a Akt, mTOR e Erk.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Método

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl6 (idade entre 10 e 12 semanas), originários do biotério central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto e do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Unicamp/Campinas destinados apenas à parte cirúrgica do projeto, além de camundongos *Knockout* (KO) para a molécula PI3K γ (machos e fêmeas), obtidos por intermédio do Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE) de Ribeirão Preto e também criados em biotério próprio localizado no Anexo A da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). A linhagem PI3K γ KO foi utilizada em experimentos pareada com animais *Wild-type* (WT) de forma *outrem* e *ingrede*. Os animais foram mantidos em biotério com condições de temperatura e umidade controladas e em ciclo claro/escuro de 12h/12h, com ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos foram conduzidos de acordo com as resoluções do comitê de ética em uso de animais (Protocolo nº159/2016).

3.2. Drogas

O fármaco escopolamina (Butilbrometo de Escopolamina, Buscopan® 20 mg/Kg) foi utilizado nas doses de 1 mg/Kg e 2 mg/Kg via intraperitoneal (i.p), diluído em salina 0,9%. A droga AS605240 (Cayman®, Michigan, EUA) foi usada em animais *Wild-Type* (WT) para inibir preferencialmente a proteína PI3K γ e foi administrada nesses animais bilateralmente de forma intra-hipocampal nas doses de 3 nM, 10 nM e 30 nM, diluídas em DMSO 0,1% e injetadas em um volume total de 300 nL à 150 nL/min (total de 3 minutos por lado de injeção, 2 de infusão farmacológica e 1 de prevenção para refluxo). Como veículo utilizou-se uma solução de DMSO 0,1% diluída em salina 0,9%.

3.3. Cirurgia estereotáxica

Animais WT foram anestesiados (I.P) com uma solução de Ketamina (102 mg/Kg) e Xilazina (8 mg/Kg) diluídas em salina 0,9% para que pudessem ser contidos em um aparelho estereotáxico (BIO-ST8001 BIOSEB®) pelo osso temporal e incisivos superiores. O crânio desses animais sofreu antes antisepsia com uma solução de iodo 2% e foi então anestesiado localmente com Lidocaína (Lidostesin, Harvey,

Brasil). Antes de começar o processo cirúrgico aplicou-se uma única injeção de flunixinina meglumina (Banamine®, Schering-Plough, Brasil) subcutânea (0,25 mg/mL) como antiinflamatório.

Posteriormente, com o crânio exposto, houve a remoção do periósteo por raspagem para tornar límpido o campo de acesso e a implantação de cânulas de aço inoxidável medindo 7 mm de comprimento direcionadas ao hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas baseadas no livro de Paxinos e Franklin (2008) a partir do bregma: -2,9 mm anteroposterior (AP); $\pm 1,5$ mm médio-lateral (ML); - 1,3 dorsoventral (DV), onde foram estabilizadas com um parafuso colocado de forma anterior às cânulas e fixadas com auxílio deacrílico dentário. Como pós cirúrgico, nos 7 dias de hiato sem manejo procedimental para atingir plena recuperação, os animais receberam Amoxicilina na concentração de 0,25 mg/mL (MARX et al., 2014) infundida nos bebedouros de água (volume máximo de 400 mL) a fim de prevenir uma possível infecção decorrente da invasiva cirurgia. A injeção das drogas foi feita com o auxílio de uma bomba injetora (Pump 11 Elite – Harvard Apparatus ®) através de agulhas gengivais de 8 mm acopladas a uma seringa Hamilton ligada a um fio de polietileno (50G), com o animal livre para movimentação.

3.4. Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos (TRO) foi realizado em 3 etapas. A primeira consistiu na fase de habituação, na qual os animais foram colocados na arena (caixa deacrílico quadrada medindo 50x50x40cm) contendo aproximadamente 2 cm de serragem por 10 minutos para se ambientarem ao contexto do teste. 24 horas depois foi realizada a etapa de pré-teste (aquisição), que consiste em colocar 2 objetos idênticos na arena e permitir que os animais os explorem por 10 minutos. No dia seguinte (24 horas pós pré-teste), realizou-se a última etapa para avaliar a memória de longo-prazo dependente do hipocampo (retenção da memória), onde os animais foram colocados na arena contendo novamente 2 objetos: um familiar, ao qual o animal foi previamente exposto na etapa de pré-teste, e um novo substituindo um dos objetos previamente usado na fase anterior. Quantificou-se o tempo despendido pelos animais explorando cada objeto durante 5 minutos e as respostas foram expressas como porcentagem de exploração do objeto novo, calculado através da subtração do tempo despendido no objeto novo com o tempo de exploração do objeto velho, dividido

pelo tempo de exploração somente do objeto novo multiplicando o produto por 100, caracterizando a fórmula $(T_n - T_v / T_n) \times 100$, sendo T_n = tempo explorando o objeto novo e T_v = tempo explorando o objeto velho.

3.5. Coleta e preservação do tecido

Logo após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com um volume de 10 ml/Kg de uma solução mista de ketamina (150 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg) diluídas em salina 0,9% para poderem ser decapitados e terem seus encéfalos retirados.

Para os animais que passaram pelos testes comportamentais envolvendo o fator genótipo (PI3K γ KO e WT correspondentes), o cérebro retirado foi lavado com solução salina 0,9% e manejado para que houvesse a excisão bilateral dos hipocampus, os quais foram armazenados à -80° C em tubos de 2 mL até seu uso para testes moleculares. Os animais que passaram pelo teste envolvendo o duplo tratamento com escopolamina e AS605240 foram, antes da retirada de seus encéfalos, injetados com corante Azul de Evans (300 nL por lado) e perfundidos por via transcardíaca com salina tamponada em tampão fosfato (30 mL) seguido da infusão de paraformaldeído (PFA) 4% previamente filtrado (30 mL). Posteriormente, os encéfalos retirados foram pós-fixados *overnight* em PFA 4% até passarem pela crioproteção com solução de sacarose 30% por aproximadamente 4 dias. Após este processo, houve o congelamento em isopentana + vapor de gelo seco (até -30° C) por aproximadamente 30 segundos e armazenamento em freezer -80° C até o momento dos cortes (50 μ metros) em criostato (Leica, Wetzlar, Alemanha) para obtenção de lâminas visando observar os sítios de injeção.

3.6. Genotipagem

O processo de genotipagem foi realizado para a determinação dos genótipos dos animais PI3K γ KO criados em biotério de supervisão própria (correspondentes ao perfil *inbreed*) e se sucedeu através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Logo após o desmame, os animais tiveram um pequeno fragmento de sua cauda coletado em um tubo *ependorff* de 1,5 mL para que servisse de material genético para a reação. Esse material foi digerido em 200 μ L de tampão de lise (NaCl

5 M, EDTA 500 mM pH 8, SDS 10%, Tris base 1 M e 500 µL de proteinase K a 20 mg/ml) e incubado à 55° C *overnight* com o auxílio de um banho seco (Thoth, modelo 2120, São Paulo, Brasil). Para completa precipitação do DNA genômico, adicionou-se isopropanol (1:1 em relação ao volume de tampão de análise) ao conteúdo amostral para centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a 4° C. O conteúdo foi posteriormente dispensado e a amostra foi ressuspensa em 50 µL de água MiliQ, sendo armazenada a 4° C pronta para a realização da técnica de PCR.

Para a reação, utilizou-se 1 µL da amostra digerida que foi colocada em um mix contendo 8,4 µL de água MiliQ, 2,5 µL de *buffer* para PCR, 0,25 µL de dNTPs, 0,06 da enzima Taq polimerase (GoTaq®, Promega, Wisconsin, EUA) e 0,125 µL de *primer* utilizado para a detecção de animais WT ou KO para PI3Ky, como mostrado na tabela de número 1. Todos os componentes foram misturados de forma homogênea em um tubo de 0,2 µL de capacidade com uma *bead* contendo magnésio (PuReTaq RTG, GE Healthcare, Pittsburgh, EUA).

Tabela 1. Primers para genotipagem de PI3Ky KO	
Genótipo	Sequência
Wild Type	5' - TCAGGCTCGGAGATTAGGTA - 3'
	5' - GCCCAATCGGTGGTAGAACT - 3'
Mutante (PI3K KO)	5' - GGACACGGCTTTGATTACAATC - 3'
	5' - GGGGTGGGATTAGATAAATG - 3'

Os mixes de amostra foram colocados em um termociclador (9902 Veriti PCR *Thermal Cycler*, Applied Biosystems, ThermoFisher scientific, Massachusetts, EUA) programado da seguinte maneira:

- **Stage 1 (1x)**
 - 95° C por 3 minutos (*hot start* para ativação da polimerase)
- **Stage 2 (35x)**
 - 95° C por 30 segundos
 - 60° C por 45 segundos (Temperatura de *melting* dos primers)
 - 72° C por 1 minuto
- **Stage 3 (1x)**
 - 72° C por 7 minutos (extensão final da polimerase)
- **Stage 4**
 - 4° C por tempo indeterminado até a retirada das amostras

Ao final da reação, as amostras foram aplicadas em gel para eletroforese (separação por tamanho em pares de base) contendo 1,5% de agarose diluída em tampão tris-acetato (TAE, Tris HCl 2M, ácido acético 20 mM, EDTA 0,5M pH 8; pH 7,8) que, após solubilização em micro-ondas à máxima potência, recebeu 10 µL de SYBR Safe (Intercalante de DNA, Invitrogen, ThermoFisher scientific, Massachusetts, EUA). A eletroforese foi realizada por 30 minutos a uma voltagem de 100 V em uma cuba horizontal e, passado o tempo de corrida, o gel foi revelado utilizando o aparelho ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Os produtos de interesse podem ser visualizados na figura 7.

Figura 7. Imagem representativa da disposição das bandas na reação de PCR para a genotipagem dos animais consanguíneos (*inbreed*). O protocolo de PCR foi utilizado para distinguir os genótipos existentes em cada ninhada de animais *inbreed*. Animais WT apresentam bandas na altura de 500 bp, heterozigotos apresentam duas bandas (500 bp e 1.100 bp) e animais KO apresentam uma única banda próxima a 1.100 bp.

3.7. Western Blot

Para uma análise semi-quantitativa do nível de expressão das proteínas de interesse, amostras de hipocampo destinadas à técnica de *Western Blot* (item 3.5) foram maceradas em tampão de lise (Tris-HCl 25mM pH=7,5, NaCl 75mM, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_7\text{P}_2$ 2,5mM, Na_3VO_4 1mM, Na_2MoO_4 5mM, 0,5% Triton X-100) contendo inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail powder, Cat. P2714, Componentes: AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, EDTA, Leupeptin; Sigma Aldrich) com o auxílio de um homogeneizador do tipo *bead-beater* (*TissueLyser LT Adapter*, Qiagen, Hilden, Alemanha), o qual foi programado para uma frequência de 30 Hz com atividade de 90 segundos de duração. Após a lise, as amostras passaram por duas etapas de centrifugação (12000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante resultante foi estocado em alíquotas (50 µL) a -80° C.

Para mensurar e normalizar a concentração proteica das amostras, foi utilizado o método de Bradford, com construção de uma curva padrão de BSA (pontos em 2000, 1500, 1000, 750, 500, 200 e 125 [µg/mL]) e leitura da absorbância a 450 nM em leitor de placas (VICTOR X, ParkinElmer, Massachusetts, EUA). Para a separação proteica, as amostras foram aplicadas (concentração de 40 µg/40µL) em gel gradiente de poliacrilamida (NuPAGE™ Invitrogen) 4-12% para proteínas de peso molecular menor (10 a 75 Kda) e 3-8% para proteínas de peso molecular maior (90 a 300 Kda) e

submetidas à eletroforese para depois serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose ativada em água. A transferência foi confirmada através de coloração por Ponceau. A fim de bloquear epítomos inespecíficos, a membrana foi colocada em solução de bloqueio (Blotting-Grade Blocker BioRad® 10% diluído em salina tamponada em Tris e Tween 20 [TBS-t]) por 2 horas. Em seguida, foi realizada a incubação *overnight* com os anticorpos primários diluídos em TBS-t (descritos na tabela 2).

Tabela 2. Anticorpos primários usados no <i>Western Blot</i>			
Ac. Primário	Hospedeiro	Marca	Diluição
p-Akt (Ser473)	Coelho	Cell Signaling	1:1000
Akt	Coelho	Cell Signaling	1:1000
p-mTOR (Ser2448)	Coelho	Cell Signaling	1:1000
mTOR	Camundongo	Cell Signaling	1:1000
p-Erk(1/2) (Thr202/Tyr204)	Coelho	Cell Signaling	1:1000
Erk(1/2)	Camundongo	Cell Signaling	1:2000
α -Tubulina	Camundongo	Cell Signaling	1:10000

Após a incubação, o anticorpo primário foi recuperado e a membrana passou por 3 processos de lavagem com TBS-t (10, 5 e 10 minutos, respectivamente) antes de receber o anticorpo secundário (Anti-rabbit, GE Healthcare, 1:10000 ou Anti-mice, GE Healthcare, 1:10000) por 2 horas. Em seguida, as membranas foram novamente submetidas a 3 lavagens em TBS-t. A revelação se deu por uma reação de quimioluminescência em um fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000 series, GE Healthcare Life Sciences) e as bandas resultantes tiveram, então, suas densidades avaliadas através do software *Image Studio Lite 5*.

3.8. Procedimentos Experimentais

3.8.1. Caracterização dos efeitos mnemônicos da escopolamina em animais *Wild Type* *naïves*

Para avaliar o possível efeito amnésico da escopolamina, foram selecionadas 2 doses do fármaco para serem testadas, com base na literatura: 1 mg/Kg e 2 mg/Kg. Animais WT foram selecionados e elencados em grupos conforme dita o fator tratamento: (1) Veículo, (2) Escopolamina 1 mg/Kg, (3) Escopolamina 2 mg/Kg. O teste comportamental escolhido foi o de reconhecimento de objetos (TRO), para avaliar o processo cognitivo dos animais, e foi conduzido em 3 dias conforme consta no item 3.4. No segundo dia de teste, 30 minutos antes de serem colocados na arena, os animais foram tratados via i.p com um dos tratamentos disponíveis e, no dia seguinte (24 horas depois) testados quanto a retenção, representando a memória de longa duração (LTM) (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática da caracterização dos efeitos mnemônicos da escopolamina em diferentes doses. O protocolo de TRO foi realizado em 3 dias e o tratamento (Veículo, Escopolamina 1 mg/Kg e Escopolamina 2 mg/Kg) foi feito 30 minutos antes do pré-teste no segundo dia. O teste para memória de longo prazo foi feito no terceiro e último dia de protocolo.

3.8.2. Efeitos mnemônicos da escopolamina sobre animais *PI3K γ knockout* (KO)

Definida a dose de escopolamina a ser utilizada, foi possível usá-la para testar sua capacidade amnésica frente a deleção do gene da *PI3K γ* , conforme protocolo esquematizado na figura 9. Os animais foram divididos nos seguintes grupos, ditados pelos fatores genótipo e tratamento: (1) WT + Veículo, (2) WT + Escopolamina 1 mg/Kg, (3) *PI3K γ KO (outbreed)* + Veículo, *PI3K γ KO (outbreed)* + Escopolamina 1 mg/Kg.

O teste de reconhecimento de objetos, a exemplo do item 3.8.1, foi conduzido em 3 dias e os tratamentos feitos (via i.p) no segundo dia de teste, 30 minutos antes da entrada dos animais na arena. No 3º dia de teste houve também a coleta de tecidos para análises moleculares posteriores.

Figura 9. Representação esquemática do tratamento com escopolamina sobre animais WT e PI3Kγ KO. O protocolo de TRO foi realizado em 3 dias e o tratamento (Veículo e Escopolamina 1 mg/Kg) foi feito 30 minutos antes do pré-teste no segundo dia sobre os dois genótipos usados (WT e PI3Kγ KO). O teste para memória de longo prazo foi feito no terceiro e último dia de protocolo, assim como a coleta de tecidos para análises moleculares.

3.8.3. Validação genotípica acerca do efeito amnésico da escopolamina em animais PI3Kγ KO *inbred*

Para assegurar o efeito do fator genótipo no trabalho, foi realizado o protocolo esquematizado na figura 10. Os animais foram dispostos em grupos divididos conforme o item 3.8.2, porém o fator genótipo foi representado por animais PI3Kγ KO que compartilhavam consanguinidade com seus pares WT, havendo ainda a entrada do grupo heterozigoto, que compartilha apenas 1 alelo funcional do gene da PI3Kγ, caracterizando os seguintes grupos: (1) WT (*inbred*) + Veículo, (2) WT (*inbred*) + Escop 1 mg/Kg, (3) Heterozigoto + Veículo, (4) Heterozigoto + Escop 1 mg/Kg, (5) PI3Kγ KO (*inbred*) + Veículo, (6) PI3Kγ KO (*inbred*) + Escop 1 mg/Kg. O fator gênero também foi levado em conta e o protocolo foi aplicado tanto para animais machos quanto para fêmeas. O teste de reconhecimento de objetos foi conduzido por 3 dias e os tratamentos feitos no segundo dia, 30 minutos antes da entrada do animal na arena, conforme exposto no item 3.8.1. No 3º dia de teste houve também a coleta de tecidos para análises moleculares posteriores.

Figura 10. Representação esquemática do protocolo para validação genotípica acerca dos efeitos mnemônicos da escopolamina em animais PI3K γ KO. O protocolo de TRO foi realizado em 3 dias e o tratamento (Veículo e Escopolamina 1 mg/Kg) foi feito 30 minutos antes do pré-teste no segundo dia sobre os três genótipos usados (WT, Heterozigoto e PI3K γ KO, todos *inbred*), em ambos os sexos. O teste para memória de longo prazo foi feito no terceiro e último dia de protocolo, assim como a coleta de tecidos para análises moleculares.

3.8.4. Validação farmacológica acerca da participação da PI3K γ na amnésia anterógrada induzida pela Escopolamina

Animais WT foram submetidos à cirurgia estereotáxica e tiveram cânulas implantadas no hipocampo dorsal conforme citado no item 3.3. O primeiro bloco de animais caracterizou a primeira parte do experimento e foi dividido de acordo com o fator tratamento: (1) Veículo, (2) AS605240 3 nM, (3) AS605240 10 nM, (4) AS605240 30 nM. O teste de reconhecimento de objetos foi feito nos mesmos moldes anteriores (itens 3.8.1, 3.8.2 e 3.8.3) 7 dias após a cirurgia, com o tratamento intrahipocampal realizado 30 minutos antes do pré-teste no segundo dia de protocolo. No terceiro dia, os animais foram submetidos ao teste para memória de longo prazo, conforme esquematizado na figura 11.

Figura 11. Representação esquemática da primeira parte da validação farmacológica acerca da participação da PI3K γ no efeito amnésico da escopolamina. O protocolo de TRO foi realizado 7 dias após cirurgia para implantação de cânulas nos hipocampus dorsais dos animais. O tratamento (Veículo, AS605240 3 nM, AS605240 10 nM, AS605240 30 nM) foi feito 30 minutos antes do pré-teste no segundo dia sobre animais WT naives. O teste para memória de longo prazo foi feito no terceiro e último dia de protocolo.

A segunda parte foi realizada com outro bloco de animais WT que também passaram por cirurgia estereotáxica a exemplo do item 3.3. Esses animais foram elencados em grupos conforme o fator tratamento, que se deu por 2 vias: intrahipocampal e i.p, respectivamente. Desse modo, a disposição dos grupos foi a seguinte: (1) Veículo + Veículo, (2) Veículo + Escop 1 mg/Kg, (3) AS605240 30 nM + Veículo, (4) AS605240 30 nM + Escop 1 mg/Kg. O teste de reconhecimento de objetos foi realizado em 3 dias e os animais receberam os tratamentos no segundo dia, com a injeção intrahipocampal 30 minutos antes do teste e a i.p 25 minutos antes do teste, dispostas com 5 minutos de intervalo entre elas, conforme figura 12. No terceiro dia de testes houve ainda a perfusão dos animais e coleta do encéfalo, conforme exemplificado no item 3.5.

Figura 12. Representação esquemática da segunda parte da validação farmacológica acerca da participação da PI3K γ no efeito amnésico da escopolamina. O protocolo de TRO foi realizado 7 dias após cirurgia para implantação de cânulas nos hipocampus dorsais dos animais. O tratamento (Veículo + Veículo, Veículo + Escop 1 mg/Kg, AS605240 30 nM + Veículo, AS605240 30 nM + Escop 1 mg/Kg) foi feito 30 minutos antes do pré-teste (30 minutos antes para a injeção intrahipocampal e 25 para a injeção i.p) no segundo dia sobre animais WT naives. O teste para memória de longo prazo foi feito no terceiro e último dia de protocolo.

3.8.5. Caracterização molecular de vias de sinalização relacionadas a PI3Kγ perante tratamento com escopolamina

As vias anexas à PI3Kγ foram avaliadas em tecidos coletados de animais submetidos aos protocolos descritos nos itens 3.8.2 e 3.8.3. As análises objetivaram analisar o conteúdo molecular de proteínas associadas a via canônicas das PI3K, como Akt e mTOR, e proteínas envolvidas indiretamente com a classe I das PI3K, como a Erk.

3.9. Análise Estatística

Os dados estão representados como média $\pm$ Erro padrão da média (EPM) e exceções, se existirem, estão especificadas nas legendas e descrições dos dados correspondentes. A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Kolmorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Os dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias (com fatores genótipo e tratamento) seguida do teste de Duncan para comparações múltiplas e análises entre os grupos. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Análises comportamentais

4.1.1. Escopolamina na dose de 1 mg/Kg é efetiva em gerar amnésia anterógrada em animais selvagens

Primeiramente, foi necessário obter uma dose de escopolamina que fosse efetiva em promover amnésia anterógrada, a qual seria usada posteriormente nos demais testes. Nesse panorama, foram testadas duas doses (1 e 2 mg/Kg), administradas antes da fase de aquisição do teste de reconhecimento de objetos (item 3.8.1).

A ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan mostrou efeito significativo do fator tratamento para o grupo tratado com a dose de 1 mg/Kg de escopolamina ($F_{(2,12)}=5,072$; $p=0,027$), a qual foi significativa em diminuir a porcentagem de exploração do objeto novo em comparação ao grupo veículo (Figura 13).

Figura 13. Efeito do tratamento com escopolamina na fase pré aquisição de animais selvagens *naïves*. Animais selvagens (tratados com veículo, escopolamina 1 ou 2 mg/Kg) foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (n=5/grupo). Valores expressos como Média ± EPM; (*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan).

4.1.2. O *knockout* da proteína PI3K γ previne o efeito amnésico induzido pela escopolamina na dose de 1 mg/Kg

Determinada a dose efetiva de escopolamina capaz de gerar amnésia anterógrada, buscou-se avaliar de forma correlacional a participação da proteína PI3K γ neste efeito amnésico. Para isso, foram utilizados animais KO para a proteína PI3K γ que passaram pelo teste de reconhecimento de objetos, adicionando o efeito genótipo nas análises obtidas.

A ANOVA de duas vias indicou uma significativa interação entre os fatores tratamento e genótipo ($F_{(1,22)} = 7,843$; $p = 0,010$), o que indica que o efeito do tratamento depende do fator genótipo. Não houve, porém, efeito do fator tratamento ($F_{(1,22)} = 1,392$; $p = 0,251$) e nem do fator genótipo ($F_{(1,22)} = 2,747$; $p = 0,112$) deflagrados de forma significativa pela ANOVA de duas vias. ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan ($F_{(3,22)} = 4,182$; $p = 0,017$) indicou que o grupo WT tratado com escopolamina 1 mg/Kg era significativamente diferente do grupo WT tratado com veículo, da mesma forma que os grupos KO tratados com veículo e com escopolamina 1 mg/Kg possuíam diferenças estatisticamente significativas para o grupo WT tratado com escopolamina 1 mg/Kg (Figura 14).

Figura 14. Efeito do tratamento com escopolamina sobre animais *knockout* para a proteína PI3K γ . Animais selvagens (WT) ou *knockouts* (KO) para a proteína PI3K γ foram tratados com veículo ou escopolamina 1 mg/Kg e submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (n=7/grupo para os WT e 6/grupo para os KO). Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) indica $p < 0,05$ em relação aos demais grupos (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan).

4.1.3. Animais *inbreed knockout* e heterozigotos para a proteína PI3K γ de ambos os sexos não apresentam amnésia induzida pela escopolamina a 1 mg/Kg

De forma semelhante ao que foi realizado no item 4.1.2, a escopolamina também foi injetada a 1 mg/Kg em animais PI3K γ KO, porém contendo grupos WT consanguíneos (*inbreed*). Além disso, ainda foram considerados grupos heterozigotos (representados como grupo hetero) no delineamento e houve a introdução do fator gênero, uma vez que o teste de reconhecimento de objetos foi feito para camundongos de ambos os sexos.

Para os animais machos, ANOVA de duas vias indicou uma significativa interação entre os fatores tratamento e genótipo ($F_{(2,50)}=4,526$; $p=0,016$), indicando que o efeito do tratamento depende do fator genótipo. Houve ainda um efeito significativo do fator tratamento ($F_{(1,50)}=13,129$; $p=0,001$) e também do fator genótipo ($F_{(2,50)}=6,865$; $p=0,002$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan ($F_{(5,50)}=7,501$; $p<0,001$) indicou que o grupo WT tratado com escopolamina 1 mg/Kg era significativamente diferente em comparação aos demais grupos (Figura 15).

Figura 15. Efeito do tratamento com escopolamina sobre animais machos heterozigotos e KO *inbreed* para a proteína PI3K γ . Animais machos selvagens (WT), heterozigotos (Hetero) e *knockouts* (KO) para a proteína PI3K γ , compartilhando consanguinidade (*inbreed*), foram tratados com veículo ou escopolamina 1 mg/Kg e submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (n=10 para os grupos WT + Veí, WT + Escop, Hetero + Veí e Hetero + Escop; n=9 para o grupo KO + Veí e n=7 para o grupo KO + Escop). Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) indica $p < 0,05$ em relação aos demais grupos (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan).

No caso das fêmeas, ANOVA de duas vias também indicou uma interação significativa entre os fatores tratamento e genótipo ($F_{(2,38)}=4,593$; $p=0,016$), indicando que o efeito do tratamento depende do fator genótipo. Também houve significância do efeito do fator genótipo ($F_{(2,38)}=5,777$; $p=0,006$), porém não houve efeito significativo do fator tratamento ($F_{(1,38)}=0,875$; $p=0,356$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan ($F_{(5,38)}=4,215$; $p=0,004$) indicou que o grupo WT tratado com escopolamina 1 mg/Kg era significativamente diferente em comparação aos demais grupos (Figura 16).

Figura 16. Efeito do tratamento com escopolamina sobre animais fêmeas heterozigotos e KO *inbreed* para a proteína PI3K γ . Animais fêmeas selvagens (WT), heterozigotos (Hetero) e *knockouts* (KO) para a proteína PI3K γ , compartilhando consanguinidade (*inbreed*), foram tratados com veículo ou escopolamina 1 mg/Kg e submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (n=6 para os grupos WT + Veí, WT + Escop e Hetero + Escop; n=4 para o grupo Hetero + Veí e n=11 para o grupo KO + Veí e KO + Escop). Valores expressos como Média $\pm$ EPM; (*) indica $p < 0,05$ em relação aos demais grupos (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan).

4.1.4. A administração intrahipocampal de AS605240 não promove efeito comportamental relacionado a memória independentemente da dose

Para confirmar se a ablação do efeito amnésico da escopolamina nos animais PI3K γ KO foi definitivamente devido ao fator genótipo ou se poderia se tratar de um efeito compensatório relacionado à perda de sinalização promovida por essa proteína, foi utilizado um inibidor que atua preferencialmente na proteína PI3K γ , chamado de AS605240. O fármaco foi inicialmente injetado de forma bilateral nos hipocampus dorsais de animais selvagens (Veículo, 3 nM, 10 nM e 30 nM), conceitualmente envolvidos na consolidação de memórias, na fase prévia à aquisição do teste de reconhecimento de objetos (item 3.8.4), buscando primeiramente definir uma dose que não promovesse efeitos comportamentais *per se* e fosse adequada para a administração conjunta à escopolamina em um passo posterior.

ANOVA de uma via não indicou efeito significativo do fator tratamento ($F_{(4,36)} = 0,148$; $p = 0,963$), não havendo diferença significativa em nenhuma dose utilizada para a administração intrahipocampal quando comparadas ao grupo controle. Também não há diferença significativa do grupo sham para os demais grupos (Figura 17).

Figura 17. Efeito da injeção intrahipocampal de AS605240 em variadas doses sobre animais selvagens. Animais selvagens (WT) passaram por cirurgia para a implantação de cânulas bilaterais no hipocampo, a exceção do grupo sham, e foram tratados com veículo ou AS605240 em múltiplas doses (3, 10 ou 30 nM). Valores expressos como Média $\pm$ EPM (n=9 para os grupos Veículo e 30 nM; n=8 para o grupo 3 nM; n=10 para o grupo 10 nM e n=5 para o grupo Sham).

4.1.5. A administração intrahipocampal de AS605240 a 30 nM não é capaz de prevenir o efeito amnésico induzido pela escopolamina a 1 mg/Kg

Para avaliar se o inibidor farmacológico da PI3K poderia prevenir seu efeito amnésico, foram utilizados animais selvagens que receberam dois tratamentos, um intrahipocampal (veículo ou AS605240 a 30 nM) e outro intraperitoneal (veículo ou escopolamina a 1 mg/Kg), seguindo o delineamento exposto na segunda parte do item 3.8.4. A dose de AS605240 foi escolhida com base no resultado apresentado no item 4.1.4, sendo a maior dose inefetiva nesse caso.

ANOVA de duas vias não indicou interação entre os tratamentos ($F_{(1,10)}=0,010$; $p=0,922$) e também não houve efeito apenas do tratamento com AS605240 ($F_{(1,17)}=0,552$; $p=0,468$). Por outro lado, há um efeito significativo do tratamento com escopolamina 1 mg/Kg ($F_{(1,17)}=24,381$; $p<0,001$) apontado pela ANOVA de duas vias. ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan ($F_{(3,17)}=8,337$, $p=0,001$) indicou que o grupo Veículo + Escop 1 mg/Kg era diferente se comparado ao grupo Veículo + Veículo, bem como o grupo AS605240 30 nM + Escop 1 mg/Kg possuía diferença em relação ao grupo AS605240 30 nM + Veículo (Figura 18A).

A imagem histológica representativa do experimento bem como os pontos de acerto em relação a cirurgia extereotóxica estão representados na Figura 18B.

Figura 18A. Efeito do tratamento com escopolamina em animais que receberam injeção intrahipocampal de AS605240. Animais selvagens (WT) foram primeiramente tratados com injeção intrahipocampal de veículo ou AS605240 a 30 nM e depois com veículo ou escopolamina a 1 mg/Kg (n=6 para os grupos Veículo + Veículo e Veículo + Escop 1 mg/Kg; n=4 para o grupo AS605240 30 nM + Veículo e n=5 para o grupo AS605240 + Escop 1 mg/Kg). Valores expressos como Média ± EPM, (*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo + Veículo e (#) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo AS605240 30 nM + Veículo (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan).

Figura 18B. Representação histológica e das secções coronais em relação ao bregma de animais canulados. Os animais utilizados para o experimento do item 4.1.5 tiveram seus cérebros dissecados para a confecção de lâminas (HE) utilizadas para a validação dos sítios de injeção mirando o hipocampo. Em relação as secções, os pontos em preto representam os sítios que estavam dentro do hipocampo e os vermelhos os fora. Devido a sobreposição, o número de pontos pode ser menor do que o número de animais utilizados.

4.2 Análises moleculares

4.2.1. Análise do nível de expressão de proteínas relacionadas a PI3Ky em animais *outbreed*

Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados, tiveram seus cérebros retirados e dissecados para separação do hipocampo, o qual foi posteriormente processado para avaliar a expressão proteica através da técnica de *western blot*, vide item 3.5.

Quanto a expressão de proteínas relacionadas à via canônica encabeçada pela PI3Ky, foi encontrada interação entre os fatores tratamento e genótipo para a proteína Akt deflagrada pela ANOVA de duas vias ($F_{(1,9)}=6,518$; $p=0,031$), indicando que o efeito do tratamento depende do fator genótipo. Além disso, também foi apontado efeito significativo do fator tratamento ($F_{(1,9)}=7,477$; $p=0,023$), bem como do fator genótipo individualmente ($F_{(1,9)}=7,917$; $p=0,020$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan ($F_{(3,9)}=6,995$; $p=0,010$) indicou que o grupo WT tratado com veículo era significativamente diferente do grupo KO tratado também com veículo, assim como o grupo KO tratado com escopolamina 1 mg/Kg se diferenciava do grupo KO tratado com veículo (Figura 19).

Para a proteína mTOR na sua forma fosforilada em detrimento da quantidade total, ANOVA de duas vias indicou que não houve interação entre o fator tratamento e o fator genótipo ($F_{(1,10)}=0,896$; $p=0,366$). Além disso, não houve significância do fator tratamento de forma separada ($F_{(1,10)}=0,260$; $p=0,621$), tampouco do fator genótipo ($F_{(1,10)}=1,136$; $p=0,311$) (Figura 20).

Figura 19. Efeito do tratamento com escopolamina e do fator genótipo sobre a expressão da proteína Akt no hipocampo de camundongos. Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a retirada do hipocampo visando promover análises moleculares sobre o nível de expressão da proteína Akt, normalizada pelo controle endógeno α -tubulina (n=3 para os grupos WT + Veículo. WT + Escopolamina 1 mg/Kg e KO + Veículo; n=4 para o grupo KO + Escopolamina 1 mg/Kg). Valores expressos como Média $\pm$ EPM, (*) indica $p < 0,05$ para a comparação entre WT + Veículo e KO + Veículo; (#) indica $p < 0,05$ para a comparação entre KO + Veículo e KO + Escopolamina 1 mg/Kg (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan).

Figura 20. Efeito do tratamento com escopolamina e do fator genótipo sobre a expressão da proteína mTOR no hipocampo de camundongos. Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a retirada do hipocampo visando promover análises moleculares sobre o nível de expressão da proteína mTOR fosforilada, normalizada pela sua expressão total (n=3 para os grupos WT + Veículo e KO + Escopolamina 1 mg/Kg; n=4 para os grupos WT + Escopolamina 1 mg/Kg e KO + Veículo). Valores expressos como Média ± EPM.

Para caracterizar um possível ponto de compensação molecular refletido nos experimentos comportamentais, foi analisada a expressão da proteína Erk, componente da via das MAPK que atua de modo paralelo a via da PI3K.

ANOVA de duas vias não mostrou interação entre o fator tratamento e o fator genótipo ($F_{(1,18)}=1,715$; $p=0,207$) e também não houve efeito significativo do fator tratamento ($F_{(1,18)}=0,025$; $p=0,876$). Para o fator genótipo, houve efeito significativo deflagrado pela ANOVA de duas vias ($F_{(1,18)}=12,454$; $p=0,002$). ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan ($F_{(3,18)}=4,576$; $p=0,015$) indicou que há diferença significativa entre o grupo WT tratado com veículo e o grupo KO tratado também com veículo (Figura 21).

Figura 21. Efeito do tratamento com escopolamina e do fator genótipo sobre a expressão da proteína Erk no hipocampo de camundongos. Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a retirada do hipocampo visando promover análises moleculares sobre o nível de expressão da proteína Erk fosforilada, normalizada pela sua expressão total (n=6 para os grupos WT + Veículo, WT + Escopolamina 1 mg/Kg e KO + Escopolamina 1 mg/Kg; n=4 para o grupo KO + Veículo). Valores expressos como Média ± EPM, (*) indica $p < 0,05$ em relação ao grupo WT + Veículo (ANOVA de uma via seguida de pós-hoc de Duncan).

DISCUSSÃO

5. Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que animais selvagens tratados com escopolamina na dose de 1 mg/Kg de forma intraperitoneal (i.p), quando injetada na fase prévia a aquisição, apresentam amnésia anterógrada deflagrada pelo teste de reconhecimento de objetos. A mesma dose de escopolamina, porém, quando injetada na mesma fase do teste, falha em promover estes efeitos em animais PI3Ky KO, sugerindo que esta proteína possa ter um papel no mecanismo de ação do fármaco para o efeito amnésico.

A escopolamina é uma droga que, comparada a outras da mesma classe (como a atropina), possui maior facilidade para ultrapassar a barreira hematoencefálica e promover efeitos psicotrópicos, sendo comumente utilizada em experimentações com esse viés (OHNO; WATANABE, 1996). Além disso, sua toxicidade (acima de 10 mg) pode levar a quadros de coma com prováveis efeitos amnésicos, configurando um cenário preocupante principalmente no caso de tentativas de estupro, sequestros e assassinatos (BIDLACK, 2002), uma vez que em certas regiões corporais, até mesmo a absorção cutânea pode ser facilitada (HUIZINGA, 1971). Devido a isso, é importante compreender de forma satisfatória os mecanismos que compõem os efeitos psicoativos da escopolamina. No caso da amnésia anterógrada, o foco do projeto, a escopolamina apresenta uma gama de doses utilizadas na literatura para alcançar este efeito, dependendo do modelo animal de estudo (ratos, camundongos e demais) e do teste a ser utilizado para predição da memória. Baseado nisso, o primeiro passo foi definir a dose que melhor se adequaria a proposta do trabalho.

A dose de 1 mg/Kg é, para camundongos, uma das mais utilizadas na literatura para provocar amnésia anterógrada. Izquierdo, em 1989, reportou que a dose de 1 mg/Kg era utilizada em camundongos para afetar a aquisição, citando outros autores (como Rush, 1988) que conseguiram, com essa dose, causar um perfil amnésico em camundongos testados em variados testes preditivos para a memória. Especificamente para o teste de reconhecimento de objetos, o qual foi utilizado no projeto, há também muitos trabalhos que utilizam esta dose para obter um efeito amnésico efetivo, fundamentando seus objetivos na reversão da amnésia gerada pela administração de 1 mg/Kg de escopolamina nos animais (DODART; MATHIS; UNGERER, 1997; KRUK-SŁOMKA et al., 2014; MALIK; KAUR; CHOUDHARY, 2018), especialmente quando injetada na fase prévia a aquisição, que parece ser mais

sensível ao efeito da escopolamina, uma vez que para obter um efeito amnésico semelhante em outras fases (como previamente à evocação) é necessário uma alta dose do fármaco, cerca de 10 vezes o utilizado para a disfunção da memória na fase de aquisição (IZQUIERDO, 1989).

A escopolamina injetada na mesma dose (1 mg/Kg) e na mesma fase do teste de reconhecimento de objetos falha em promover o efeito amnésico clássico em animais PI3K γ KO. De fato, muitos estudos utilizando a escopolamina para gerar um perfil amnésico reportaram a reversão (ou prevenção) desse quadro por agentes ou drogas que não atuam diretamente sobre componentes do sistema colinérgico central, como é o caso da proteína PI3K γ , que apesar de encabeçar uma importante via de sinalização amplamente atuante no sistema nervoso como um todo, não possui ligação direta com o sistema colinérgico ainda elucidada na literatura. Em 1986, por exemplo, Rush reportou que a administração de 3 mg/Kg de naloxona (antagonista de receptores opioides) antes da administração de escopolamina (1 mg/Kg) era capaz de prevenir o déficit cognitivo em camundongos no teste da esQUIVA passiva (RUSH, 1986). Do mesmo modo, a bupropiona (5 e 10 mg/Kg), um agonista de receptores 5HT₃, quando administrada junto a escopolamina (1 mg/Kg), parece prevenir o efeito amnésico em ratos no teste de reconhecimento de objetos (KRUK-SŁOMKA et al., 2014). Além do mais, Flood e Cherkin reportaram, em 1986, que drogas que atuavam sobre sistemas adrenérgicos, serotoninérgicos, GABAérgicos e de glicina eram capazes de prevenir a amnésia anterógrada gerada pela injeção subcutânea de 1 mg/Kg de escopolamina em camundongos testados no labirinto em T perante estímulo aversivo (FLOOD; CHERKIN, 1986). Brouillette e colaboradores, em 2007, revelaram que a expressão gênica do hipocampo de animais submetidos ao tratamento com escopolamina era aumentada para o receptor GABA-B, sugerindo sua participação no efeito amnésico promovido pelo fármaco. Com base nessas evidências, podemos definir que o processo de formação de uma memória envolve vários sistemas neurais, e que a ação da escopolamina sobre o sistema colinérgico central tem desdobramentos sobre estes variados sistemas, não sendo um efeito reduzido apenas a um tipo neuronal. Desse modo também pode se enquadrar a participação da PI3K γ no estudo, que pode não ser diretamente ativada pela escopolamina em sua ação anticolinérgica, mas pode ter participação na atividade de outros sistemas de

neurônios, em um tipo de reação indireta, algo que não é possível preconizar a partir dos resultados obtidos.

Estudos envolvendo animais geneticamente modificados e a amnésia anterógrada gerada pela escopolamina são escassos na literatura. Alguns deles trazem a participação direta de componentes do sistema colinérgico central em relação ao efeito da escopolamina, como por exemplo o estudo de Espallergues e colaboradores (2008), que utilizou camundongos heterozigotos para a AChE (AChE +/-) e verificou que sua sensibilidade aos efeitos amnésicos da escopolamina (s.c 0,5 a 5 mg/Kg) era reduzido no teste do labirinto aquático de Morris (ESPALLERGUES et al., 2008). Tzavara e colaboradores, em 2003, demonstrou que a escopolamina injetada de forma intrahipocampal poderia aumentar os níveis de ACh no hipocampo de camundongos. Além disso, ao usar animais KO para o receptor muscarínico M4, verificou que estes já possuíam de forma basal um aumento nos níveis de ACh hipocampal e não sofriam de déficits no teste da esQUIVA passiva, o que pode paralelamente significar uma compensação do sistema em reação à falta de um receptor importante. Tzavara (2003) não realizou testes envolvendo o animal geneticamente modificado em relação aos efeitos amnésicos da escopolamina, porém podemos nos questionar se poderia haver um possível bloqueio do déficit cognitivo gerado pelo fármaco em detrimento de possíveis efeitos compensatórios decorrentes da modificação genética atribuída, o que muda o microambiente neural a fim de manter a homeostase do organismo. Isso também acontece em relação ao primeiro estudo citado, Espallergues (2008) cita que animais AChE KO possuem uma redução da densidade de receptores M1, M2 e M4 de cerca de 50 a 80% em relação a animais selvagens (VOLPICELLI-DALEY et al., 2003), traçando um paralelo com seus animais heterozigotos, o que poderia influenciar no resultado da sensibilidade a escopolamina. Deste mesmo modo, os animais PI3K γ KO poderiam possuir aditivos compensatórios que os possibilitassem resistir aos efeitos amnésicos da escopolamina e, dados os poucos estudos que envolvem a PI3K γ e o sistema nervoso central, é difícil prever como poderia ser sua homeostase neural específica. Um estudo de Takada-Takatori e colaboradores, em 2006, demonstrou que inibidores da AChE (já visto como bloqueadores dos efeitos amnésicos da escopolamina), como o donepezil e a galantamina, realizam suas ações protetivas em relação a memória por intermédio de receptores nicotínicos $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR), ativando a proteína PI3K. Ao usar um inibidor

inespecífico de PI3K (LY294002), estes efeitos protetivos são abolidos. A falta da proteína PI3K γ nos animais KO poderia levar ao aumento reflexo de outras PI3Ks componentes de outras classes que poderiam sobrepor o efeito da escopolamina sobre a memória, como a exemplo do artigo citado, porém, mais estudos acerca destes efeitos compensatórios a nível de classes das PI3K necessitam ser feitos.

Outro parâmetro interessante a ser analisado em relação aos resultados envolvendo os animais PI3K γ KO é o tempo de administração da escopolamina. Em nosso delineamento utilizamos apenas a administração aguda do fármaco (30 minutos antes da fase de aquisição), porém a cronicidade da administração (7 dias ou mais) também revela efeitos interessantes para comparações, sobretudo os efeitos a nível sináptico. Culturas celulares do neuro blastoma humano SHSY5Y, ao serem expostas a escopolamina (1-3 mM) por um período considerável de tempo, têm sua viabilidade celular reduzida (PUANGMALAI et al., 2017). Além do mais, a exposição prolongada a escopolamina também induz danos à membrana celular e às mitocôndrias de células PC12 (PANDAREESH; ANAND, 2013). Paralelamente, animais que são tratados de forma crônica com escopolamina sistêmica possuem robustos déficits mnemônicos em variados testes preditivos para a memória (LEE et al., 2017) e apresentam mudanças estruturais no sistema nervoso central, como a redução da mielinização no hipocampo (centro da consolidação da memória), importante para o correto funcionamento das sinapses (PARK et al., 2016), a perda de neuro filamentos e proteínas que o compõem, também no hipocampo (LEE et al., 2017) e o prejuízo da neurogênese hipocampal, alterando a migração e a diferenciação celular (YAN et al., 2014), desestabilizando a memória dependente do hipocampo nos animais testados.

Os efeitos observados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, são também constantemente ligados à capacidade da escopolamina em promover um princípio neuroinflamatório e de desequilibrar o sistema oxidativo do sistema nervoso central. Muitos estudos relatam o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) em detrimento do tratamento crônico com escopolamina, bem como aumento de fatores ligados a neuroinflamação como TNF- α e COX2 (induzível) e a diminuição de fatores antioxidantes/anti-inflamatórios como a glutathiona (BUDZYNSKA et al., 2015; ISHOLA et al., 2013; JAWAID et al., 2014; PACHAURI et al., 2012). A PI3K γ é uma molécula que, apesar de não possuir muitos estudos na literatura, é bem delineada em relação a sua participação em cadeias inflamatórias e efeitos relacionados a células do

sistema imune (HIRSCH et al., 2000), além do mais, estudos de Frister e colaboradores, em 2014, apontaram para a grande importância da PI3Kγ microglial em, ao interagir com mediadores como AMPc, promover um perfil pró-inflamatório e permitir a produção de espécies oxidativas no sistema nervoso central. A PI3Kγ poderia se envolver no efeito mnemônico provido pela escopolamina, uma vez que se relaciona à neuroinflamação e ao sistema oxidativo, e os animais PI3Kγ KO, sobre a condição de tratamento crônico com a escopolamina, poderiam apresentar um perfil protetivo sobre os efeitos amnésicos nesse ponto de vista. A participação de outros tipos celulares no efeito, como a micróglia, tirando o foco dos sistemas neuronais, também poderia ser um aditivo no fenômeno, uma vez que há poucos estudos sobre essas células nesse paradigma amnésico.

Ainda assim, de forma aguda, como é o caso do delineamento do presente estudo, é difícil ponderar que mecanismos de desbalanço oxidativo e relacionados a neuroinflamação poderiam ser o centro da prevenção do efeito amnésico relacionado a escopolamina nos animais PI3Kγ KO. A administração aguda de escopolamina, no entanto, pode revelar outros pontos de discussão que envolvem a memória. Qiu e colaboradores, em 2016, reportou que a escopolamina administrada agudamente também poderia ser usada para alterar o estado de consciência em ratos e promover um perfil relacionado a delírios, que se sucedia a partir do desbalanço de vários sistemas de neurotransmissores neurais, segundo sua hipótese (QIU et al., 2016). Esta alteração do estado de consciência pode ser aplicada também ao processo de memorização em um fenômeno conhecido como *state dependent learning* (SDL), que, a exemplo do estudo de Qiu, também parece envolver vários tipos neuronais em seu processo. A SDL se caracteriza por ser um fenômeno onde há o processamento de informações (aquisição e consolidação) para a geração de uma memória como normalmente acontece em situações basais, porém, sob uma alteração do estado mental do indivíduo neste momento (PETERSEN, 1977; WEINGARTNER et al., 1976). Desse modo, sob condições de linha de base, a evocação dessa informação consolidada apresenta-se deficitária, porém pode ser melhorada se houver o retorno do indivíduo ao estado mental que permeou este processo de sedimentação, em um processo condicionado, o que faz jus ao termo “*state*”, utilizado na SDL para definir a condição mental, do cérebro e do indivíduo como um todo (OVERTON, 1964).

A primeira evidência de que o estado individual pudesse alterar o comportamento mnemônico surgiu em 1937 quando Guirden e Culler reportaram que a flexão das pernas de cachorros, quando condicionadas sob efeito de curare, só conseguiam ser repetidas se os animais fossem tratados com curare novamente. Porém, quando este reflexo era condicionado em um estado basal, ele não conseguia se apresentar sob o efeito do curare, apenas sob o estado homeostático anterior (GIRDEN; CULLER, 1937). A partir deste estudo, descobriu-se outros poucos agentes (no caso, fármacos) capazes de alterar o estado mental e promover o efeito da SDL, tanto em humanos, quanto em cobaias, como por exemplo a anfetamina (BUSTAMANTE et al., 1970), a cocaína (ROMIEU; LUCAS; MAURICE, 2006), a cafeína (SANDAY et al., 2013), o álcool (LOWE, 1983) e agentes opiáceos como a morfina (BRUINS SLOT; COLPAERT, 1999). A atropina e a escopolamina também se incluem nesta lista e possuem efeitos documentados no caso da SDL tanto em humanos quanto em animais (PERT; AVIS, 1974; PETERSEN, 1979), mostrando que seu potencial de alterar o estado mental também pode ser enquadrado no processo mnemônico.

A escopolamina, no caso, parece promover a SDL de uma maneira dependente do hipocampo, alterando a homeostase de alguns sistemas neurais nessa região. Piri e colaboradores, em 2013, demonstrou que a escopolamina injetada de forma intrahipocampal era capaz de promover SDL em ratos no teste de esquiva passiva. Esse efeito era antagonizado pela injeção de bloqueadores do receptor D1 no hipocampo dorsal, o que evidencia uma participação dopaminérgica no efeito de SDL na escopolamina (PIRI et al., 2013). Além disso, alterações no balanço da acetilcolina também pode estar relacionadas ao mecanismo de SDL da escopolamina, uma vez que não só é necessário o bloqueio dos receptores muscarínicos, mas também o aumento da acetilcolina no sistema (GARDNER; GLICK; JARVIK, 1972). O sistema GABAérgico também possui papel importante neste fenômeno, uma vez que a escopolamina é capaz de gerar SDL de forma cruzada à administração de morfina, e estes compostos são capazes de modular o tônus GABAérgico no hipocampo (CHANG; LIANG, 2012; MALEKI et al., 2017). Apesar de ser um processo complexo e que envolve vários sistemas neuromoduladores, não há evidência literária sobre o processo molecular que dá base a SDL, sobretudo para a SDL da escopolamina. Os animais PI3K γ KO poderiam se enquadrar nesse contexto, uma vez que recebem uma

única injeção de escopolamina antes da aquisição no teste de reconhecimento de objetos. Se a escopolamina estiver promovendo seus efeitos amnésicos através do mecanismo de SDL, seria interessante que se observasse a manutenção da amnésia ou não em um protocolo separado apenas para a avaliação do processo de SDL. Caso haja o recrutamento da proteína PI3K γ para que se crie essa associação entre a informação estocada e o estado individual dos camundongos, faz sentido pensar que os animais PI3K γ KO não apresentem a amnésia anterógrada denotada pela injeção da escopolamina, que é o que acontece nos delineamentos contidos no presente estudo. Além do mais, Qiu (2016) reportou que o estado de delírio atingido pela administração de escopolamina nos ratos testados era abolido pela inibição da via PI3K/Akt/mTOR, o que sugere que essa via realmente possa estar envolvida nesse mecanismo de SDL, permitindo que o paralelo com os animais PI3K γ KO seja traçado nesse contexto.

O efeito comportamental induzido pelo fator genótipo (KO para a PI3K γ) se mantém quando os animais utilizados compartilham consanguinidade (chamados de animais *inbred*). Esta abordagem é utilizada para assegurar o efeito do fator genótipo, uma vez que animais com alto grau de parentesco (fêmeas e machos da mesma ninhada, ou seja, irmãos), quando cruzados, permitem que seu *pool* genético seja diminuído quando comparado a cruzamentos de animais *outbred*, que possuem mais variantes gênicas (alelos), tornando a prole heterogênea. Essa diferença genética é importante para diminuir as chances de respostas inespecíficas no caso de testes comportamentais, bem como para aumentar a comparabilidade com outros estudos de locais diferentes (KINNEY et al., 1999). Em 1958, Boyland conclui em seu estudo que animais chamados “puros” (*inbred*) eram mais suscetíveis a toxicidade crônica de fármacos do que os animais *outbred*, em razão de possuírem um número reduzido de variantes gênicas, e essa susceptibilidade pode ser até 80% diferente entre animais *outbred*, como evidenciado por Falconer e Bloom, em 1962, ao estudarem o potencial carcinogênico da uretana. Além disso, há uma grande correlação entre a participação gênica e as respostas comportamentais à fármacos (KALOW, 2006; MEIER, 2014) como poderia ser o caso da resposta mnemônica à administração da escopolamina. O próprio protocolo comportamental utilizado, no caso do teste de reconhecimento de objetos, pode influenciar na expressão de moléculas relacionadas ao aprendizado (WANG et al., 2003) e também no *turnover* de neurotransmissores (SHANKS;

GRIFFITHS; ANISMAN, 1994), que podem se diferenciar em detrimento do *pool* genético que as linhagens carregam. Apesar disso, ao comparar os resultados obtidos no teste de reconhecimento de objetos pelas linhagens *inbred* e *outbred*, vemos que a prevenção do efeito amnésico se manteve em animais PI3K γ KO nos dois casos, demonstrando que fatores genéticos exógenos (ou externos) não alteram esse padrão de comportamento. Uma vez que os genes são refletidos em proteínas através da transcrição e posterior tradução, análises moleculares poderiam diferenciar-se quando feitas em materiais biológicos de animais *inbred* e *outbred*, o que condiz com outro ponto de discussão.

A possibilidade de obter animais *inbred* através do cruzamento de irmãos heterozigotos também abriu a possibilidade para o teste do efeito da escopolamina nos próprios animais heterozigotos que advinham da prole. De maneira interessante, a perda de apenas um alelo da PI3K γ (restando apenas 1 do par componente) foi suficiente para observar a mesma resposta de prevenção ao efeito amnésico da escopolamina apresentada pelos animais KO. Paralelamente, síndromes envolvendo a PI3K em humanos são frequentemente apresentadas como heterozigóticas, como o ganho de função heterozigótico da PI3K δ , que predispõe imunodeficiência severa e complicações pulmonares (ANGULO et al., 2013; CARPIER; LUCAS, 2017; COULTER et al., 2017; DEAU et al., 2014; LUCAS et al., 2014a, 2014b; TAKEDA et al., 2017). Em relação a PI3K γ , há apenas um estudo que reporta a perda de função heterozigótica do gene PIK3CG (codificador da PI3K γ), que acarreta em hipofunção de determinados componentes do sistema imune (principalmente em relação a anticorpos) e distúrbios na microbiota. Apesar disso, não há qualquer evidência de que o paciente possua modificações na produção de espécies reativas e nem alterações no processo de quimiotaxia, não sendo, porém, um efeito compensatório inerente a outras PI3Ks componentes de outras classes, que apresentam níveis normais (TAKEDA et al., 2019). Nada foi declarado em relação aos processos cognitivos do paciente, o que deixa em aberto a questão relacionada a memória no paralelo com os animais PI3K γ KO e heterozigotos.

No que diz respeito ao fator sexo, o resultado do tratamento com escopolamina sobre animais fêmeas promoveu amnésia anterógrada a exemplo do que acontece nos machos, e o KO para a proteína PI3K γ preveniu o efeito também nesse caso. A importância de se incluir fêmeas nos estudos, segundo Golden e Voskuhl (2017) vai

desde a susceptibilidade a doenças específicas até a resposta única restrita aos sexos a diversos tratamentos, tendo em vista as diferenças hormonais de cada sistema. O estradiol, por exemplo, já demonstrou ser um potencial inibidor da amnésia anterógrada provocada pela escopolamina. Quando administrado nas doses de 20 e 60 µg/Kg em ratos fêmeas ovariectomizadas, concomitantemente a escopolamina (2 mg/Kg), demonstrou prevenir o prejuízo mnemônico no teste do labirinto aquático de Morris (MAREFATI et al., 2019). Além disso, o parâmetro farmacocinético referente a distribuição da escopolamina parece ser alterado em indivíduos do sexo feminino, no qual a Cmax (o pico da concentração plasmática) é menor se comparado a indivíduos do sexo masculino (3.93±0.04 ng/ml para fêmeas; 6.61±0.63 ng/ml para machos) (EBERT; OERTEL; KIRCH, 2000), o que poderia ser um outro fator que alterasse a resposta cognitiva das fêmeas à escopolamina. A prevenção do efeito amnésico em camundongos fêmea KO para a proteína PI3Kγ pode, desta maneira, também relacionar-se com características inerentes ao sexo, porém não há como predizer se tal hipótese é verdadeira, uma vez que mais testes são necessários e não há nenhum dado literário ligando o fator sexo ao efeito da escopolamina ou à PI3Kγ de um modo geral.

Para testar se a prevenção ao efeito amnésico da escopolamina nos animais PI3Kγ KO foi realmente em decorrência do fator genótipo ou por eventuais efeitos compensatórios relacionados ao *knockout*, usamos o inibidor específico de PI3Kγ chamado AS605240, administrado em animais WT. Há poucas evidências literárias sobre o uso de AS605240 para mensurar os efeitos da PI3Kγ de forma central, muito em função dos poucos estudos disponibilizados para essa proteína nessa área. Ademais, muitos destes utilizam o protótipo para experimentar seus efeitos inibitórios sobre a PI3Kγ em um contexto neuroinflamatório, pouco se relacionando a processos como a memória, por exemplo. Alguns poucos estudos, no entanto, chamam a atenção para o uso de AS605240 em outros processos centrais não correlacionando-os a processos inflamatórios, como por exemplo o trabalho de Lima e colaboradores (2015), que utilizou o inibidor (1, 10 e 100 nM) em sinaptosomos hipocampais extraídos de animais WT e verificou que a concentração intracelular de cálcio bem como a liberação de glutamato era aumentada de maneira dose dependente, atingindo níveis semelhantes aos observados em sinaptosomos de animais PI3Kγ KO, que possuíam crises convulsivas mais severas (se comparados aos WT) ao serem

expostos a pilocarpina. Uma vez que a inibição da PI3K γ pelo AS605240 aumenta a liberação de glutamato e os níveis de cálcio intracelular em células hipocâmpais a níveis semelhantes aos que os animais PI3K γ KO apresentam, podemos pensar que este efeito (tanto contido basalmente nos animais, quanto induzido farmacologicamente pelo AS605240) também possa contribuir para a prevenção do efeito amnésico da escopolamina, já que o aumento da captação de glutamato no hipocampo pode predispor à LTP (PITA-ALMENAR et al., 2006) e a indução da LTP é um dos mecanismos contidos em diversos trabalhos que reportam a reversão ou prevenção da amnésia anterógrada gerada pela escopolamina (HWANG et al., 2017; JEON et al., 2017; PORTERO-TRESSERRA et al., 2014). Os níveis aumentados de cálcio podem se relacionar também ao processo de LTP, já que este íon atua como um segundo mensageiro eficaz para a expressão de proteínas e tem relação com a manutenção da LTP por GPCRs (GONÇALVES-RIBEIRO et al., 2019; MATEOS-APARICIO; RODRÍGUEZ-MORENO, 2020) que são o meio da ativação da PI3K γ .

A administração de AS605240 concomitantemente a escopolamina, no entanto, não promoveu um efeito preventivo evidenciado pelo teste de reconhecimento de objetos. Apenas um trabalho na literatura utiliza o AS605240 para administração intracerebral, como utilizado no protocolo do presente estudo. Apesar disso, o estudo de Kim e colaboradores (2011) demonstra sua ação sobre o teste de medo condicionado, que convencionalmente demonstra ser um tipo de memória diferente da representada pelo reconhecimento de objetos. A dose utilizada é diferente (1 mM) para uma região também diferente (CA1) da usada no presente estudo, que priorizou vias de saída da formação hipocâmpal. Outro estudo se assemelha mais com a proposta presente neste exposto, onde Passos e colaboradores (2010) administraram AS605240 em camundongos 1 hora antes da administração de escopolamina (1 mg/Kg, i.p) e os testaram no labirinto aquático de Morris. Nesse caso, AS605240 falhou em promover um efeito preventivo em relação a amnésia gerada pela escopolamina, porém há diferenças consideráveis em relação aos delineamentos deste trabalho e os apresentados neste estudo. O AS605240 foi administrado de forma sistêmica via oral (gavagem) nos animais, em uma dose de 30 mg/Kg, o que reserva diferenças farmacocinéticas em relação a uma administração intracerebral. Além do mais, o teste do labirinto aquático de Morris se diferencia do teste de reconhecimento de objetos na questão do tipo de memória acessada e consolidada.

É importante ressaltar que as doses de AS605240 utilizadas no exposto para administração intracerebral foram conseguidas através de transformações envolvendo seu parâmetro K_i ($= 7,8 \text{ nM}$), o que pode necessitar de ajustes em novas curvas contendo novas doses. É possível também que a escopolamina possa atuar em outros segmentos encefálicos para gerar o efeito amnésico no teste de reconhecimento de objetos, o que não poderia ser contraposto só com a injeção de AS605240 intrahipocampal, tendo em visto que a distribuição da escopolamina é sistêmica em detrimento de sua forma de administração, possibilitando sua vasta ação sobre o sistema nervoso central. Uma única injeção de escopolamina é capaz de induzir grandes alterações moleculares no córtex pré-frontal de ratos, uma estrutura envolvida com a cognição, por exemplo (ISHOLA et al., 2013), além de parecer relacionar-se ao córtex entorrinal na promoção dos efeitos amnésicos (RASHID; AHMED, 2019).

A reversão do dano mnemônico da escopolamina, além de ser muito comum em experimentos que envolvam o sistema colinérgico central e suas disfunções no processo de memória, como anteriormente citado, também é frequentemente associada a alterações moleculares, principalmente em regiões chave para a memorização, como o hipocampo. No presente estudo, reportamos que os animais *outbred* PI3K γ KO possuíam níveis aumentados de Erk fosforilada e Akt total de forma basal, o que, segundo alguns casos da literatura, poderia auxiliar na explicação da prevenção do efeito amnésico obtida por estes animais. Hafez e colaboradores, em 2017, reportou que a reversão do perfil amnésico da escopolamina em ratos Wistar no labirinto aquático de Morris pela ipriflavona era acompanhada de um significativo aumento da fosforilação de Erk no hipocampo destes animais. O mesmo foi reportado por Deepa e colaboradores (2020), que encontrou um significativo aumento dos níveis de Erk fosforilada no hipocampo de ratos CD1 que foram tratados com *Dracocephalum moldávica*, uma erva nativa da Ásia central que reverteu os efeitos amnésicos da escopolamina nos animais que passaram pelo teste do labirinto aquático de Morris e da esQUIVA passiva. Lu e colaboradores, em 2018, reportou que a genisteína possuía a capacidade de prevenir o efeito amnésico da escopolamina em camundongos que passaram pelo teste do labirinto aquático de Morris e no teste do reconhecimento da localização de objetos, efeito que estava associado a um aumento da fosforilação de Erk no hipocampo. Baseado nesses resultados, o aumento basal

da fosforilação de Erk no hipocampo dos animais PI3K γ KO poderia ser um grande ponto compensatório na prevenção do efeito mnemônico da escopolamina, uma vez que a Erk possui, de fato, um importante papel na função sináptica e na performance cognitiva (SWEATT, 2001), atuando por exemplo como coadjuvante do BDNF na LTP hipocampal (LU, 2003).

No caso da Akt, há resultados semelhantes aos da proteína Erk na literatura que envolvem sua modulação transcricional na prevenção ou reversão dos efeitos cognitivos associados a escopolamina. SouhkakLari e colaboradores, em 2018, reportou que a curcumina era capaz de restaurar os níveis de Akt no hipocampo de animais tratados com escopolamina, prevenindo o efeito amnésico causado no teste da esquiva passiva. Seguindo a mesma linha, Kazerouni e colaboradores (2020) reportaram um aumento dos níveis de Akt hipocampal em animais tratados com cinamaldeído, conseguindo prevenir amnésico do tratamento com escopolamina no teste da esquiva passiva. De modo interessante, no mesmo trabalho, foi reportada uma diminuição nos níveis de Erk hipocampal, justificada como um *crosstalk* entre as proteínas que podem aumentar seus níveis de forma inversamente proporcional, de maneira que quando há aumento na fosforilação e produção de Akt, há diminuição de fosforilação e expressão de Erk, e vice versa (GHASEMI et al., 2015; ZHOU et al., 2015). Segundo dados do presente estudo, os níveis de Akt hipocampal são diminuídos nos animais PI3K γ KO tratados com escopolamina, sendo basalmente já aumentados nesses animais, porém, o tratamento não é capaz de alterar os níveis da fosforilação de Erk hipocampal. Uma vez que há esse *crosstalk* entre essas moléculas, podemos esperar que, nos animais PI3K γ KO, os níveis de Akt estejam sendo diminuídos em detrimento da manutenção dos níveis de Erk fosforilada, em uma intenção de resguardar o sistema dos efeitos da escopolamina. Há, porém, o fato de que não ocorrem alterações moleculares nos animais WT em detrimento do tratamento com escopolamina, o que indica que este efeito hipotético estaria associado ao fator genótipo, neste caso. Ademais, não houve mensuração dos níveis de Akt fosforilada nas amostras destes animais, o que revelaria o nível de atividade dessa proteína, o que poderia mudar as suposições previamente elaboradas. Em relação aos níveis de mTOR fosforilado em detrimento de sua forma total, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, concluindo que nesse delineamento e sob essas condições, não há influência dessa proteína nos resultados

encontrados. Apesar disso, Lana e colaboradores (2017) mostram que a escopolamina pode ligeiramente aumentar os níveis de mTOR em ratos Wistar, levando a um aumento reflexo de p70S6K, controlada por mTOR e que também pode se envolver com processos mnemônicos (CORTESE et al., 2018; HULLINGER; O'RIORDAN; BURGER, 2015). A p70S6K também pode ser controlada pela proteína Erk (BABCHIA et al., 2010; PAGE et al., 2006) que se encontra basalmente aumentada nos animais PI3K γ KO, podendo levar esta a ser a via de controle da p70S6K, ao invés de sofrer regulação via mTOR. Entretanto, mais análises deveriam ser feitas para que pudéssemos hipotetizar essa possível interação de vias, como avaliar os níveis de expressão da p70S6K.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Os resultados do presente estudo evidenciam que a escopolamina injetada de forma i.p na dose de 1 mg/Kg é capaz de gerar amnésia anterógrada em camundongos selvagens. Porém, a mesma dose injetada em animais PI3K γ KO não é capaz de causar os efeitos mnemônicos previamente destacados. Paralelamente a estes efeitos comportamentais, os animais PI3K γ apresentam níveis moleculares (de forma basal) alterados de proteínas que se relacionam ao processo de memorização. A administração de um inibidor específico de PI3K γ (AS605240) no hipocampo de animais selvagens concomitantemente à aplicação de escopolamina, porém, não foi capaz de mimetizar os efeitos comportamentais obtidos com os animais KO, sugerindo que o efeito preventivo não advém do bloqueio da PI3K γ hipocampal, podendo ser um efeito compensatório inerente aos animais PI3K γ , como no caso das alterações moleculares previamente descritas, ou ligada ao bloqueio de sinalização da PI3K γ de outras regiões encefálicas.

REFERÊNCIAS

7. Referências

- ALZHEIMER. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde» [About a peculiar disease of the cerebral cortex]. **Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin**, v. 64, n. 1–2, p. 146–148, 1907.
- ANGULO, I. et al. Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 342, n. 6160, p. 866–871, 15 nov. 2013.
- ARMSTRONG, D. M. et al. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: Demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 216, n. 1, p. 53–68, 1 maio 1983.
- ATKINS, C. M. et al. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. **Nature Neuroscience**, v. 1, n. 7, p. 602–609, nov. 1998.
- AUGUSTINSSON, K.-B.; NACHMANSOHN, D. Distinction between Acetylcholine-Esterase and Other Choline Ester-splitting Enzymes. **Science**, v. 110, n. 2847, p. 98–99, 22 jul. 1949.
- BABCHIA, N. et al. The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K signaling pathways in human uveal melanoma cells: interaction with B-Raf/ERK. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 1, p. 421–429, jan. 2010.
- BACKER, J. M. The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34. **The Biochemical Journal**, v. 473, n. 15, p. 2251–2271, 01 2016.
- BAJO, R. et al. Scopolamine effects on functional brain connectivity: a pharmacological model of Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9748, 1 jul. 2015.
- BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science (New York, N.Y.)**, v. 217, n. 4558, p. 408–414, 30 jul. 1982.
- BELARBI, K. et al. Loss of medial septum cholinergic neurons in THY-Tau22 mouse model: what links with tau pathology? **Current Alzheimer Research**, v. 8, n. 6, p. 633–638, set. 2011.
- BIDLACK, W. R. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th ed. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 289–290, jun. 2002.
- BIRKS, J. et al. Rivastigmine for Alzheimer's disease. In: THE COCHRANE COLLABORATION (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. p. CD001191.pub2.
- BIRKS, J. S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. In: THE COCHRANE COLLABORATION (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. p. CD005593.
- BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 7 jan. 1993.

- BLISS, T. V. P.; LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, n. 2, p. 331–356, 1 jul. 1973.
- BOLDEN, C.; CUSACK, B.; RICHELSON, E. Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 260, n. 2, p. 576–580, fev. 1992.
- BONNER, T. et al. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. **Science**, v. 237, n. 4814, p. 527–532, 31 jul. 1987.
- BOREN, J. J.; NAVARRO, A. P. The action of atropine, benactyzine, and scopolamine upon fixed-interval and fixed-ratio behavior. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 2, p. 107–115, abr. 1959.
- BOYLAND, E. The biological examination of carcinogenic substances. **British Medical Bulletin**, v. 14, n. 2, p. 93–98, maio 1958.
- BRANDON, M. P. et al. Reduction of Theta Rhythm Dissociates Grid Cell Spatial Periodicity from Directional Tuning. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 595–599, 29 abr. 2011.
- BRISSON, A.; UNWIN, P. N. Tubular crystals of acetylcholine receptor. **The Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 4, p. 1202–1211, 1 out. 1984.
- BROUILLETTE, J. et al. Hippocampal gene expression profiling reveals the possible involvement of Homer1 and GABA(B) receptors in scopolamine-induced amnesia. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 6, p. 1978–1989, set. 2007.
- BRUGGER, W. May Government Ever Use Torture? Two Responses from German Law. **The American Journal of Comparative Law**, v. 48, n. 4, p. 661, 2000.
- BRUINS SLOT, L. A.; COLPAERT, F. C. Opiate states of memory: receptor mechanisms. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 23, p. 10520–10529, 1 dez. 1999.
- BUCHANAN, K. A. et al. Facilitation of long-term potentiation by muscarinic M(1) receptors is mediated by inhibition of SK channels. **Neuron**, v. 68, n. 5, p. 948–963, 9 dez. 2010.
- BUDZYNSKA, B. et al. Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 5, p. 931–942, mar. 2015.
- BUSTAMANTE, J. A. et al. State dependent learning in humans. **Physiology & Behavior**, v. 5, n. 7, p. 793–796, jul. 1970.
- C. WERNICKE. ‘The symptom-complex of aphasia’. in **Diseases of the Nervous System**, n. A. Church. Appleton, New York, p. 265–324, 1908.
- CAMMALLERI, M. et al. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14368–14373, 25 nov. 2003.

- CANTLEY, L. C. et al. Oncogenes and signal transduction. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 281–302, jan. 1991.
- CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5573, p. 1655–1657, 31 maio 2002.
- CARPIER, J.-M.; LUCAS, C. L. Epstein-Barr Virus Susceptibility in Activated PI3K δ Syndrome (APDS) Immunodeficiency. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 2005, 2017.
- CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 2, p. 279–290, jun. 1998.
- CHANG, S.-D.; LIANG, K. C. Roles of hippocampal GABAA and muscarinic receptors in consolidation of context memory and context–shock association in contextual fear conditioning: A double dissociation study. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 98, n. 1, p. 17–24, jul. 2012.
- CHOI, J.-H. et al. Effects of PI3K γ overexpression in the hippocampus on synaptic plasticity and spatial learning. **Molecular Brain**, v. 7, p. 78, 6 nov. 2014.
- COOPER, E.; COUTURIER, S.; BALLIVET, M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. **Nature**, v. 350, n. 6315, p. 235–238, mar. 1991.
- CORKIN, S. Tactually-guided maze learning in man: Effects of unilateral cortical excisions and bilateral hippocampal lesions. **Neuropsychologia**, v. 3, n. 4, p. 339–351, nov. 1965.
- CORTESE, G. P. et al. Environmental enrichment improves hippocampal function in aged rats by enhancing learning and memory, LTP, and mGluR5-Homer1c activity. **Neurobiology of Aging**, v. 63, p. 1–11, 2018.
- COULTER, T. I. et al. Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome: A large patient cohort study. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 2, p. 597–606.e4, 2017.
- CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 9, p. 4442–4447, 2 mar. 2010.
- D’ANDREA, I. et al. Lack of kinase-independent activity of PI3K γ in locus coeruleus induces ADHD symptoms through increased CREB signaling. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 7, p. 904–917, jul. 2015.
- DAVIES, P.; MALONEY, A. J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer’s disease. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8000, p. 1403, 25 dez. 1976.
- DEAU, M.-C. et al. A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 9, p. 3923–3928, set. 2014.

DEEPA, P. et al. Dracocephalum moldavica attenuates scopolamine-induced cognitive impairment through activation of hippocampal ERK-CREB signaling in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 253, p. 112651, maio 2020.

DENNIS, S. H. et al. Activation of Muscarinic M1 Acetylcholine Receptors Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. **Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)**, v. 26, n. 1, p. 414–426, jan. 2016.

DIGBY, G. J. et al. Novel allosteric agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors induce brain region-specific responses that correspond with behavioral effects in animal models. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 25, p. 8532–8544, 20 jun. 2012.

DODART, J. C.; MATHIS, C.; UNGERER, A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. **Neuroreport**, v. 8, n. 5, p. 1173–1178, 24 mar. 1997.

DOEPFNER, K. T. et al. Recent patents of gene sequences relative to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and their relevance to drug discovery. **Recent patents on DNA & gene sequences**, v. 1, n. 1, p. 9–23, 2007.

EBERT, U.; OERTEL, R.; KIRCH, W. Influence of grapefruit juice on scopolamine pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy male and female subjects. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 11, p. 523–531, nov. 2000.

EGAN, T. M.; NORTH, R. A. Acetylcholine hyperpolarizes central neurones by acting on an M2 muscarinic receptor. **Nature**, v. 319, n. 6052, p. 405–407, jan. 1986.

EHLERT, F. J. et al. Differential Coupling of Subtypes of the Muscarinic Receptor to Signaling Mechanisms in Brain and Peripheral Tissues. In: KITO, S.; SEGAWA, T.; OLSEN, R. W. (Eds.). **Neuroreceptor Mechanisms in Brain**. Boston, MA: Springer US, 1991. v. 287p. 301–312.

EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 109–120, 30 set. 2004.

ELMSLIE, K. S.; YOSHIKAMI, D. Effects of kynurenate on root potentials evoked by synaptic activity and amino acids in the frog spinal cord. **Brain Research**, v. 330, n. 2, p. 265–272, 25 mar. 1985.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews. Genetics**, v. 7, n. 8, p. 606–619, ago. 2006.

ERRINGTON, M. L.; GALLEY, P. T.; BLISS, T. V. P. Long-term potentiation in the dentate gyrus of the anaesthetized rat is accompanied by an increase in extracellular glutamate: real-time measurements using a novel dialysis electrode. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 358, n. 1432, p. 675–687, 29 abr. 2003.

ESPALLERGUES, J. et al. Hyposensitivity to the amnesic effects of scopolamine or amyloid β_{25-35} peptide in heterozygous acetylcholinesterase knockout (AChE+/-) mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1–3, p. 131–134, set. 2008.

ESTAPÉ, N.; STECKLER, T. Cholinergic blockade impairs performance in operant DNMTTP in two inbred strains of mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 72, n. 1–2, p. 319–334, maio 2002.

FALASCA, M.; MAFFUCCI, T. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. **The Biochemical Journal**, v. 443, n. 3, p. 587–601, 1 maio 2012.

FALCONER, D. S.; BLOOM, J. L. A Genetic Study of Induced Lung-Tumours in Mice. **British Journal of Cancer**, v. 16, n. 4, p. 665–685, dez. 1962.

FARR, S. A. et al. Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 65, n. 3, p. 363–368, mar. 2000.

FELDER, C. C. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 8, p. 619–625, maio 1995.

FLOOD, J. F.; CHERKIN, A. Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia? **Behavioral and Neural Biology**, v. 45, n. 2, p. 169–184, mar. 1986.

FRANZ JOSEPH GALL E JOHANN SPURZHEIM. **Untersuchungen ueber die Anatomie des Nervensystems ueberhaupt, und des Gehirns insbesondere, Paris e Strasburg** Paris e Strasburg, Ed. Treuttel e Würtz, , 1809.

FRISTER, A. et al. Phosphoinositide 3-Kinase γ Affects LPS-Induced Disturbance of Blood–Brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells. **NeuroMolecular Medicine**, v. 16, n. 4, p. 704–713, dez. 2014.

FRUMAN, D. A. et al. The PI3K Pathway in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 605–635, 10 ago. 2017.

FRUMAN, D. A.; BISMUTH, G. Fine tuning the immune response with PI3K. **Immunological Reviews**, v. 228, n. 1, p. 253–272, mar. 2009.

GARDNER, E. L.; GLICK, S. D.; JARVIK, M. E. ECS dissociation of learning and one-way cross-dissociation with physostigmine and scopolamine. **Physiology & Behavior**, v. 8, n. 1, p. 11–15, jan. 1972.

GAUSS, C. J. Geburten in künstlichem Dämmerschlaf. **Archiv für Gynaekologie**, v. 78, n. 3, p. 579–631, out. 1906.

GEIGER; HESSE. Fortgesetzte Versuche über Atropin. **Annalen der Pharmacie**, v. 6, n. 1, p. 44–65, 1833.

GEULA, C.; MESULAM, M. M. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 9 Suppl 2, p. 23–28, 1995.

GHASEMI, R. et al. The Interplay of Akt and ERK in A β Toxicity and Insulin-Mediated Protection in Primary Hippocampal Cell Culture. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 57, n. 3, p. 325–334, nov. 2015.

GILBERT RYLE. **The Concept of Mind**. [s.l.] University of Chicago Press, 1949.

GIRDEN, E.; CULLER, E. Conditioned responses in curarized striate muscle in dogs. **Journal of Comparative Psychology**, v. 23, n. 2, p. 261–274, abr. 1937.

GONÇALVES-RIBEIRO, J. et al. Glutamate Transporters in Hippocampal LTD/LTP: Not Just Prevention of Excitotoxicity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 357, 2019.

GREENFIELD, P. M. Jerome Bruner (1915–2016). **Nature**, v. 535, n. 7611, p. 232–232, jul. 2016.

GU, Z. et al. Hippocampus and Entorhinal Cortex Recruit Cholinergic and NMDA Receptors Separately to Generate Hippocampal Theta Oscillations. **Cell Reports**, v. 21, n. 12, p. 3585–3595, dez. 2017.

HAAM, J.; YAKEL, J. L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, p. 111–121, ago. 2017.

HAFEZ, H. S. et al. Neuroprotective effect of ipriflavone against scopolamine-induced memory impairment in rats. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 20, p. 3037–3053, out. 2017a.

HAFEZ, H. S. et al. Neuroprotective effect of ipriflavone against scopolamine-induced memory impairment in rats. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 20, p. 3037–3053, out. 2017b.

HAMMER, R. et al. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. **Nature**, v. 283, n. 5742, p. 90–92, jan. 1980.

HAMPEL, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 1 jul. 2018.

HARDY, T. K.; WAKELY, D. The amnesic properties of hyoscine and atropine in pre-anaesthetic medication. **Anaesthesia**, v. 17, p. 331–336, jul. 1962.

HAWKINS, P. T.; STEPHENS, L. R. Emerging evidence of signalling roles for PI(3,4)P2 in Class I and II PI3K-regulated pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 1, p. 307–314, fev. 2016.

HEARST, E. Effects of scopolamine on discriminated responding in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 126, p. 349–358, ago. 1959.

HENRI BERGSON. **Metter and Memory**. New York: George Allen & Company, 1913.

H.H. DALE. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 6, n. 2, p. 147–190, nov. 1914.

HIRSCH, E. et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5455, p. 1049–1053, 11 fev. 2000.

HODGES, D. B. et al. Scopolamine induced deficits in a battery of rat cognitive tests: comparisons of sensitivity and specificity. **Behavioural Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 237–251, maio 2009.

HOEFFER, C. A. et al. Removal of FKBP12 enhances mTOR-Raptor interactions, LTP, memory, and perseverative/repetitive behavior. **Neuron**, v. 60, n. 5, p. 832–845, 10 dez. 2008.

HORWOOD, J. M. et al. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. **The European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 3375–3384, jun. 2006.

HUANG, L. et al. Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Contributes to Neuroinflammation in a Rat Model of Surgical Brain Injury. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 29, p. 10390–10401, 22 jul. 2015.

HUIZINGA, E. Murder through the Ear. **ORL**, v. 33, n. 6, p. 361–365, 1971.

HULLINGER, R.; O'RIORDAN, K.; BURGER, C. Environmental enrichment improves learning and memory and long-term potentiation in young adult rats through a mechanism requiring mGluR5 signaling and sustained activation of p70s6k. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 125, p. 126–134, nov. 2015.

HWANG, E.-S. et al. Loganin enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments. **Physiology & Behavior**, v. 171, p. 243–248, 15 2017.

ISHOLA, I. O. et al. Combretum mucronatum and Capparis thoningii prevent scopolamine-induced memory deficit in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 1, p. 49–57, jan. 2013.

IZQUIERDO, I. Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 175–177, maio 1989.

JAWAID, T. et al. Evaluation of Cucurbita maxima extract against scopolamine-induced amnesia in rats: implication of tumour necrosis factor alpha. **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 69, n. 9–10, p. 407–417, out. 2014.

JEON, S. J. et al. The ameliorating effect of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-acetylglycerol on scopolamine-induced memory impairment via acetylcholinesterase inhibition and LTP activation. **Behavioural Brain Research**, v. 324, p. 58–65, 01 2017.

JIN, R. et al. Phosphoinositide 3-kinase-gamma expression is upregulated in brain microglia and contributes to ischemia-induced microglial activation in acute experimental stroke. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 3, p. 458–464, 27 ago. 2010.

KALOW, W. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 6, n. 3, p. 162–165, maio 2006.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2 nov. 2001.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 163–186, 27 mar. 2014.

KAZEROUNI, A. et al. Sub-chronic oral cinnamaldehyde treatment prevents scopolamine-induced memory retrieval deficit and hippocampal Akt and MAPK dysregulation in male mice. **Neurological Research**, v. 42, n. 2, p. 99–107, 1 fev. 2020.

KESNER, R. P. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 11, p. 771–781, nov. 2007.

KIM, J.-I. et al. PI3K γ is required for NMDA receptor–dependent long-term depression and behavioral flexibility. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1447–1454, nov. 2011.

KINNEY, G. G. et al. Rat strain differences in the ability to disrupt sensorimotor gating are limited to the dopaminergic system, specific to prepulse inhibition, and unrelated to changes in startle amplitude or nucleus accumbens dopamine receptor sensitivity. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 13, p. 5644–5653, 1 jul. 1999.

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 8, p. 1307–1350, jul. 2010.

KNIERIM, J. J.; LEE, I.; HARGREAVES, E. L. Hippocampal place cells: parallel input streams, subregional processing, and implications for episodic memory. **Hippocampus**, v. 16, n. 9, p. 755–764, 2006.

KOENIG, J. et al. The Spatial Periodicity of Grid Cells Is Not Sustained During Reduced Theta Oscillations. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 592–595, 29 abr. 2011.

KOPELMAN, M. D. The Cholinergic Neurotransmitter System in Human Memory and Dementia: A Review. **The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section A**, v. 38, n. 4, p. 535–573, nov. 1986.

KRUK-SŁOMKA, M. et al. A comparison of mecamylamine and bupropion effects on memory-related responses induced by nicotine and scopolamine in the novel object recognition test in mice. **Pharmacological reports: PR**, v. 66, n. 4, p. 638–646, ago. 2014.

KUCERA, G. L.; RITTENHOUSE, S. E. Human platelets form 3-phosphorylated phosphoinositides in response to alpha-thrombin, U46619, or GTP gamma S. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 10, p. 5345–5348, 5 abr. 1990.

LANA, D. et al. Rapamycin inhibits mTOR/p70S6K activation in CA3 region of the hippocampus of the rat and impairs long term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 137, p. 15–26, jan. 2017.

LASHLEY, K. S. **Brain mechanisms and intelligence: A quantitative study of injuries to the brain**. Chicago: University of Chicago Press, 1929.

LEE, J. et al. Effects of chronic scopolamine treatment on cognitive impairment and neurofilament expression in the mouse hippocampus. **Molecular Medicine Reports**, 15 nov. 2017.

LEVEY, A. I. et al. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 5 Pt 2, p. 4077–4092, maio 1995.

LIMA, I. V. DE A. et al. PI3K γ deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Experimental Neurology**, v. 267, p. 123–134, maio 2015.

LIU, S. et al. Induction of Neuronal PI3K γ Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress and Long-Term Functional Impairment in a Murine Model of Traumatic Brain Injury. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, 11 jun. 2019.

LOEWI, O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung: I. Mitteilung. **Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, v. 189, n. 1, p. 239–242, dez. 1921.

LOSSEN, W. Ueber das Atropin. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, v. 131, n. 1, p. 43–49, 1864.

LOWE, G. Alcohol and state-dependent learning. **Substance and Alcohol Actions/Misuse**, v. 4, n. 4, p. 273–282, 1983.

LU, B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 10, n. 2, p. 86–98, abr. 2003.

LU, C. et al. Genistein Ameliorates Scopolamine-Induced Amnesia in Mice Through the Regulation of the Cholinergic Neurotransmission, Antioxidant System and the ERK/CREB/BDNF Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1153, 12 out. 2018.

LUCAS, C. L. et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110 δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. **Nature Immunology**, v. 15, n. 1, p. 88–97, jan. 2014a.

LUCAS, C. L. et al. Heterozygous splice mutation in PIK3R1 causes human immunodeficiency with lymphoproliferation due to dominant activation of PI3K. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 13, p. 2537–2547, 15 dez. 2014b.

LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 87–136, jan. 2004.

LYNCH, M. A.; ERRINGTON, M. L.; BLISS, T. V. Long-term potentiation of synaptic transmission in the dentate gyrus: increased release of [^{14}C]glutamate without increase in receptor binding. **Neuroscience Letters**, v. 62, n. 1, p. 123–129, 20 nov. 1985.

MA, S. et al. Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory by relaxin-3 neurons of the nucleus incertus. **Learning & Memory**, v. 16, n. 11, p. 730–742, 30 out. 2009.

MALEKI, M. et al. Research Paper: Cross State-dependent Learning Interaction Between Scopolamine and Morphine in Mice: The Role of Dorsal Hippocampus. **Basic and Clinical Neuroscience Journal**, v. 8, n. 3, p. 193–202, 1 maio 2017.

MALIK, J.; KAUR, J.; CHOUDHARY, S. Standardized extract of *Lactuca sativa* Linn. and its fractions abrogates scopolamine-induced amnesia in mice: A possible cholinergic and antioxidant mechanism. **Nutritional Neuroscience**, v. 21, n. 5, p. 361–372, jun. 2018.

MANNS, J. R.; EICHENBAUM, H. Evolution of declarative memory. **Hippocampus**, v. 16, n. 9, p. 795–808, 2006.

MARCHI, M.; GRILLI, M.; PITTALUGA, A. M. Nicotinic modulation of glutamate receptor function at nerve terminal level: a fine-tuning of synaptic signals. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 89, 2015.

MAREFATI, N. et al. The effects of soy on scopolamine-induced spatial learning and memory impairments are comparable to the effects of estradiol. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 39, n. 3, 25 set. 2019.

MARX, J. O. et al. Antibiotic Administration in the Drinking Water of Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 6, 2014.

MATEOS-APARICIO, P.; RODRÍGUEZ-MORENO, A. Calcium Dynamics and Synaptic Plasticity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1131, p. 965–984, 2020.

MCCLELLAND, J. L.; MCNAUGHTON, B. L.; O'REILLY, R. C. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. **Psychological Review**, v. 102, n. 3, p. 419–457, jul. 1995.

MEIER, H. **Experimental Pharmacogenetics: Physiopathology of Heredity and Pharmacologic Responses**. Saint Louis: Elsevier Science, 2014.

MESULAM, M. M. et al. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). **Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1185–1201, dez. 1983.

MIZUNO, M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. **Molecular Psychiatry**, v. 8, n. 2, p. 217–224, fev. 2003.

MYERS, R. D. et al. Micro-injection of 3H-acetylcholine, 14C-serotonin and 3H-norepinephrine into the hypothalamus of the rat: diffusion into tissue and ventricles. **Physiology & Behavior**, v. 7, n. 5, p. 743–751, nov. 1971.

NACHMANSOHN, D.; MACHADO, A. L. THE FORMATION OF ACETYLCHOLINE. A NEW ENZYME: "CHOLINE ACETYLASE". **Journal of Neurophysiology**, v. 6, n. 5, p. 397–403, 1 set. 1943.

NAI, Q.; MCINTOSH, J. M.; MARGIOTTA, J. F. Relating Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes Defined by Subunit Composition and Channel Function. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 311–324, 1 fev. 2003.

NARITA, M. et al. Implications of phosphoinositide 3-kinase in the mu- and delta-opioid receptor-mediated supraspinal antinociception in the mouse. **Neuroscience**, v. 113, n. 3, p. 647–652, 2002.

NATHANSON, N. M. A multiplicity of muscarinic mechanisms: Enough signaling pathways to take your breath away. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6245–6247, 6 jun. 2000.

NEWMAN, L. A.; GOLD, P. E. Attenuation in rats of impairments of memory by scopolamine, a muscarinic receptor antagonist, by mecamylamine, a nicotinic receptor antagonist. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 5, p. 925–932, mar. 2016.

NOMURA, Y. et al. Role of cholinergic neurotransmission in the amygdala on performances of passive avoidance learning in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 4, p. 490–494, abr. 1994.

OHNO, M.; WATANABE, S. Blockade of 5-HT_{1A} receptors compensates loss of hippocampal cholinergic neurotransmission involved in working memory of rats. **Brain Research**, v. 736, n. 1–2, p. 180–188, out. 1996.

OPITZ, B. Memory function and the hippocampus. **Frontiers of Neurology and Neuroscience**, v. 34, p. 51–59, 2014.

OVERTON, D. A. STATE-DEPENDENT OR “DISSOCIATED” LEARNING PRODUCED WITH PENTOBARBITAL. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 57, p. 3–12, fev. 1964.

PACHAURI, S. D. et al. Protective effect of fruits of *Morinda citrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice: a behavioral, biochemical and cerebral blood flow study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 34–41, 6 jan. 2012.

PACOLD, M. E. et al. Crystal Structure and Functional Analysis of Ras Binding to Its Effector Phosphoinositide 3-Kinase γ . **Cell**, v. 103, n. 6, p. 931–944, dez. 2000.

PAGE, G. et al. Group I metabotropic glutamate receptors activate the p70S6 kinase via both mammalian target of rapamycin (mTOR) and extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) signaling pathways in rat striatal and hippocampal synaptoneurosome. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 4, p. 413–421, set. 2006.

PANDAREESH, M. D.; ANAND, T. Neuromodulatory propensity of *Bacopa monniera* against scopolamine-induced cytotoxicity in PC12 cells via down-regulation of AChE and up-regulation of BDNF and muscarinic-1 receptor expression. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 33, n. 7, p. 875–884, out. 2013.

PARENT, M. J. et al. Cholinergic Depletion in Alzheimer’s Disease Shown by [(18) F]FEOBV Autoradiography. **International Journal of Molecular Imaging**, v. 2013, p. 205045, 2013.

PARK, J. H. et al. Effects of Chronic Scopolamine Treatment on Cognitive Impairments and Myelin Basic Protein Expression in the Mouse Hippocampus. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 59, n. 4, p. 579–589, ago. 2016.

PARROTT, A. C. Transdermal scopolamine: a review of its effects upon motion sickness, psychological performance, and physiological functioning. **Aviation, Space, and Environmental Medicine**, v. 60, n. 1, p. 1–9, jan. 1989.

PATRUCCO, E. et al. PI3K γ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 375–387, 6 ago. 2004.

PAUL BROCA. Sur le siège de la faculté du langage articulé. **Bell. Soc. Anthropol.**, n. 6, p. 377–393, 1865.

PENFIELD, W.; PEROT, P. THE BRAIN'S RECORD OF AUDITORY AND VISUAL EXPERIENCE. A FINAL SUMMARY AND DISCUSSION. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 86, p. 595–696, dez. 1963.

PERGOLIZZI, J. V. et al. Perspectives on transdermal scopolamine for the treatment of postoperative nausea and vomiting. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 24, n. 4, p. 334–345, jun. 2012.

PERT, A.; AVIS, H. H. Dissociation between scopolamine and mecamlamine during fear conditioning in rats. **Physiological Psychology**, v. 2, n. 2, p. 111–116, jun. 1974.

PETERSEN, R. C. Retrieval failures in alcohol state-dependent learning. **Psychopharmacology**, v. 55, n. 2, p. 141–146, 19 dez. 1977.

PETERSEN, R. C. Scopolamine state-dependent memory processes in man. **Psychopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 309–314, set. 1979.

PIRI, M. et al. Blockade of the dorsal hippocampal dopamine D1 receptors inhibits the scopolamine-induced state-dependent learning in rats. **Neuroscience**, v. 252, p. 460–467, nov. 2013.

PITA-ALMENAR, J. D. et al. Different mechanisms exist for the plasticity of glutamate reuptake during early long-term potentiation (LTP) and late LTP. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 41, p. 10461–10471, 11 out. 2006.

PORTERO-TRESSERRA, M. et al. D-cycloserine prevents relational memory deficits and suppression of long-term potentiation induced by scopolamine in the hippocampus. **European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 11, p. 1798–1807, nov. 2014.

PUANGMALAI, N. et al. Neuroprotection of N-benzylcinnamide on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 9, p. 1492, 2017.

QIU, Y. et al. 5-HT(1A) receptor antagonist improves behavior performance of delirium rats through inhibiting PI3K/Akt/mTOR activation-induced NLRP3 activity: Effects of 5-HT(1A) Antagonist on Delirium Rats. **IUBMB Life**, v. 68, n. 4, p. 311–319, abr. 2016.

RAINA, P. et al. Effectiveness of Cholinesterase Inhibitors and Memantine for Treating Dementia: Evidence Review for a Clinical Practice Guideline. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, n. 5, p. 379, 4 mar. 2008.

RASHID, H.; AHMED, T. Muscarinic activity in hippocampus and entorhinal cortex is crucial for spatial and fear memory retrieval. **Pharmacological reports: PR**, v. 71, n. 3, p. 449–456, jun. 2019.

- ROBINSON, L.; HARBARAN, D.; RIEDEL, G. Visual acuity in the water maze: sensitivity to muscarinic receptor blockade in rats and mice. **Behavioural Brain Research**, v. 151, n. 1–2, p. 277–286, 5 maio 2004.
- ROGERS, J. L. Cholinergic Modulation of the Hippocampus During Encoding and Retrieval of Tone/Shock-Induced Fear Conditioning. **Learning & Memory**, v. 11, n. 1, p. 102–107, 1 jan. 2004.
- ROMIEU, P.; LUCAS, M.; MAURICE, T. Sigma1 receptor ligands and related neuroactive steroids interfere with the cocaine-induced state of memory. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 7, p. 1431–1443, jul. 2006.
- ROSE, G. M.; DUNWIDDIE, T. V. Induction of hippocampal long-term potentiation using physiologically patterned stimulation. **Neuroscience Letters**, v. 69, n. 3, p. 244–248, 12 set. 1986.
- RÜCKLE, T.; SCHWARZ, M. K.; ROMMEL, C. PI3Kgamma inhibition: towards an “aspirin of the 21st century”? **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 903–918, nov. 2006.
- RUSH, D. K. Reversal of scopolamine-induced amnesia of passive avoidance by pre- and post-training naloxone. **Psychopharmacology**, v. 89, n. 3, p. 296–300, 1986.
- RUSH, D. K. Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. **Behavioral and Neural Biology**, v. 50, n. 3, p. 255–274, nov. 1988.
- SANDAY, L. et al. Role of state-dependent learning in the cognitive effects of caffeine in mice. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 7, p. 1547–1557, ago. 2013.
- SCHULTES, R. E.; HOFMANN, A.; RÄTSCH, C. **Plants of the gods: their sacred, healing, and hallucinogenic powers**. Rev. and expanded ed ed. Rochester, Vt: Healing Arts Press, 2001.
- SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11–21, fev. 1957.
- SHANKS, N.; GRIFFITHS, J.; ANISMAN, H. Norepinephrine and serotonin alterations following chronic stressor exposure: mouse strain differences. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 57–65, set. 1994.
- SHEHATA, M.; INOKUCHI, K. Does autophagy work in synaptic plasticity and memory? **Reviews in the Neurosciences**, v. 25, n. 4, p. 543–557, 2014.
- SHIMOSHIGE, Y. et al. Involvement of M2 receptor in an enhancement of long-term potentiation by carbachol in Schaffer collateral-CA1 synapses of hippocampal slices. **Neuroscience Research**, v. 27, n. 2, p. 175–180, fev. 1997.
- SHIOZAKI, K. et al. Distribution of m1 muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus of patients with Alzheimer’s disease and dementia with Lewy bodies-an immunohistochemical study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 193, n. 1, p. 23–28, 15 dez. 2001.

SLACK, B. E.; BLUSZTAJN, J. K. Differential regulation of mTOR-dependent S6 phosphorylation by muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 5, p. 1818–1831, 1 ago. 2008.

SMITH, G. Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation. **Brain Research**, v. 472, n. 2, p. 103–118, jun. 1988.

SOUKHAKLARI, R. et al. Curcumin ameliorates scopolamine-induced mice memory retrieval deficit and restores hippocampal p-Akt and p-GSK-3 β . **European Journal of Pharmacology**, v. 841, p. 28–32, 15 dez. 2018.

SQUIRE, L. R.; ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 253, n. 5026, p. 1380–1386, 20 set. 1991.

STEPHENS, L. R. et al. The G $\beta\gamma$ Sensitivity of a PI3K Is Dependent upon a Tightly Associated Adaptor, p101. **Cell**, v. 89, n. 1, p. 105–114, abr. 1997.

STEPHENS, L. R.; JACKSON, T. R.; HAWKINS, P. T. Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1179, n. 1, p. 27–75, 7 out. 1993.

STEVENS, R. Scopolamine impairs spatial maze performance in rats. **Physiology & Behavior**, v. 27, n. 2, p. 385–386, ago. 1981.

SUGIMOTO, Y. et al. Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 7, p. 2117–2121, abr. 1984.

SUN, Y. et al. How long can patients with mild or moderate Alzheimer's dementia maintain both the cognition and the therapy of cholinesterase inhibitors: a national population-based study. **European Journal of Neurology**, v. 15, n. 3, p. 278–283, mar. 2008.

SWEATT, J. D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 1, p. 1–10, jan. 2001.

TAKADA-TAKATORI, Y. et al. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 3, p. 474–486, set. 2006.

TAKEDA, A. J. et al. Novel PIK3CD mutations affecting N-terminal residues of p110 δ cause activated PI3K δ syndrome (APDS) in humans. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 4, p. 1152–1156.e10, 2017.

TAKEDA, A. J. et al. Human PI3K γ deficiency and its microbiota-dependent mouse model reveal immunodeficiency and tissue immunopathology. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4364, 25 2019.

TANG, S. J. et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 1, p. 467–472, 8 jan. 2002.

THOMSON, H. T.; COTTERILL, D. Note on the Use of the Scopolamine-Morphine Combination as an Anæsthetic Adjunct. **Transactions. Medico-Chirurgical Society of Edinburgh**, v. 29, p. 22–29, 1910.

TRAYNOR-KAPLAN, A. E. et al. An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 353–356, 28 jul. 1988.

TZAVARA, E. T. et al. Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. **Molecular Psychiatry**, v. 8, n. 7, p. 673–679, jul. 2003.

ULBRICHT, C. et al. An Evidence-Based Systematic Review of Belladonna by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal Of Herbal Pharmacotherapy**, v. 4, n. 4, p. 61–90, 26 maio 2005.

VANHAESEBROECK, B. et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 535–602, 2001.

VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 195–203, 23 2012.

VANHAESEBROECK, B.; WHITEHEAD, M. A.; PIÑEIRO, R. Molecules in medicine mini-review: isoforms of PI3K in biology and disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 94, n. 1, p. 5–11, jan. 2016.

VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 15, p. 6615–6622, 1 ago. 1999.

VICKERS, C. A.; DICKSON, K. S.; WYLLIE, D. J. A. Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. **The Journal of Physiology**, v. 568, n. Pt 3, p. 803–813, 1 nov. 2005.

VOLPICELLI-DALEY, L. A. et al. Altered hippocampal muscarinic receptors in acetylcholinesterase-deficient mice. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 6, p. 788–796, jun. 2003.

VOSS, J. L. et al. A Closer Look at the Hippocampus and Memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 21, n. 8, p. 577–588, 2017.

WALZ, R. et al. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 73, n. 1, p. 11–20, jan. 2000.

WANG, H. et al. cDNA microarray analysis of gene expression in anxious PVG and SD rats after cat-freezing test. **Experimental Brain Research**, v. 149, n. 4, p. 413–421, abr. 2003.

WEINGARTNER, H. et al. Encoding-imagery specificity in alcohol state-dependent learning. **Journal of Experimental Psychology. Human Learning and Memory**, v. 2, n. 1, p. 83–87, jan. 1976.

WHITMAN, M. et al. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. **Nature**, v. 332, n. 6165, p. 644–646, 14 abr. 1988.

WINTERS, B. D. et al. Scopolamine infused into perirhinal cortex improves object recognition memory by blocking the acquisition of interfering object information. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 9, p. 590–596, set. 2007.

WINTERS, B. D.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J. Paradoxical facilitation of object recognition memory after infusion of scopolamine into perirhinal cortex: implications for cholinergic system function. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 37, p. 9520–9529, 13 set. 2006.

YAN, B. C. et al. Long-term administration of scopolamine interferes with nerve cell proliferation, differentiation and migration in adult mouse hippocampal dentate gyrus, but it does not induce cell death. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 19, p. 1731–1739, 1 out. 2014.

ZHAO, C. et al. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 3–11, 4 jan. 2006.

ZHOU, J. et al. Crosstalk Between MAPK/ERK and PI3K/AKT Signal Pathways During Brain Ischemia/Reperfusion. **ASN neuro**, v. 7, n. 5, out. 2015.