

ISIS FIERI

Caracterização neuroanatômica e aspectos dimórficos da ECRG4/augurina em ratos (*Rattus norvegicus* – Long-Evans) durante o processo de envelhecimento e sua ação como possível mediador do eixo encéfalo-coração

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2022

ISIS FIERI

Caracterização neuroanatômica e aspectos dimórficos da ECRG4/augurina em ratos (*Rattus norvegicus* – Long-Evans) durante o processo de envelhecimento e sua ação como possível mediador do eixo encéfalo-coração

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, área de Biologia Morfofuncional, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia morfofuncional

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

Versão original.

SÃO PAULO
2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fieri, Isis
Caracterização neuroanatômica e aspectos dimórficos da ECRG4/augurina em ratos (*Rattus norvegicus* - Long-Evans) durante o processo de envelhecimento e sua ação como possível mediador do eixo encéfalo-coração / Isis Fieri; orientador Jackson Cioni Bittencourt. -- São Paulo, 2022.
90 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Augurina. 2. ECRG4. 3. Eixo encéfalo-coração. 4. Sistema límbico. 5. Ritmo teta. I. Cioni Bittencourt, Jackson , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Isis Fieri

Titulo da Dissertação/Tese: Caracterização neuroanatômica e aspectos dimórficos da ECRG4/angurina em ratos (*Rattus norvegicus* – Long-Evans) durante o processo de envelhecimento e sua ação como possível mediador do eixo encéfalo-coração

Orientador: Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a **26/08/2022**, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO NEUROANATÔMICA E ASPECTOS DIMÓRFICOS DA ECRG4/AUGURINA EM RATOS (*Rattus norvegicus* □ Long-Evans) DURANTE O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO", protocolada sob o CEUA nº 2413041218, sob a responsabilidade de **Jackson Cioni Bittencourt e equipe; Isis Fieri** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 11/03/2019.

We certify that the proposal "NEUROANATOMIC CHARACTERIZATION AND DIMORPHIC ASPECTS OF ECRG4/AUGURIN IN RATS (*Rattus norvegicus* - Long-Evans) DURING AGING", utilizing 90 Isogenic rats (45 males and 45 females), protocol number CEUA 2413041218, under the responsibility of **Jackson Cioni Bittencourt and team; Isis Fieri** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 03/11/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: [Anatomia](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Anatomia](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [1 a 1 meses](#)

Linhagem: [Long-Evans](#)

N amostral: [15](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Anatomia](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [3 a 3 meses](#)

Linhagem: [Long-Evans](#)

N amostral: [15](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Anatomia](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [12 a 12 meses](#)

Linhagem: [Long-Evans](#)

N amostral: [15](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Anatomia](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

Idade ou peso: [1 a 1 meses](#)

Linhagem: [Long-Evans](#)

N amostral: [15](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Anatomia](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

Idade ou peso: [3 a 3 meses](#)

Linhagem: [Long-Evans](#)

N amostral: [15](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Anatomia](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

Idade ou peso: [12 a 12 meses](#)

Linhagem: [Long-Evans](#)

N amostral: [15](#)

São Paulo, 11 de março de 2019



Instituto
de Ciências
Biomédicas
Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dedico esse trabalho à minha vó Maria Baldacin Fiel (*in memoriam*) que sempre acreditou no meu potencial como cientista e sempre me incentivou a estudar e a correr atrás dos meus sonhos.

A você com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Aos animais que deram suas vidas em prol desse projeto e da ciência.

À minha mãe Ana Helena Barbosa da Silva e minha tia Maria Palmira Fieri por todo apoio, incentivo, força e carinho durante o percurso do projeto.

Ao meu pai Carlos Roberto Fieri e minha madrasta Mariza Zuccolo Fieri que mesmo longe estiveram presentes.

À minha família que sempre me apoiou. Meus tios Dito, Luiz, Erwin, Rubens e Eduardo, minhas tias Kika, Márcia, Clarice, Sirlei e Adriana, meus primos Gustavo, Gisele, Gabriela, Guilherme, Júlia, Louise, André, Iris, Maiara, Bruna, Eduardo, Felipe, Fernanda, Alan, Laura e meus avós Antônio, Palmiro, Gercy e Maria.

Às minhas amigas Aline Cândido de Oliveira e Liziane Bizi Fracassi por fazerem parte da minha caminhada e compartilhar momentos de tanta alegria juntas.

Ao Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt, meu orientador, por ter apostado e patrocinado esse projeto e ter feito parte da minha carreira acadêmica. Obrigada pela parceria e por ter confiado em meu trabalho!

Ao Prof. Dr. Enzo Lalli por ter iniciado esse projeto e ter nos fornecido gentilmente os anticorpos para as reações imunohistoquímicas.

À Prof^a. Dra. Luciane Valéria Sita pelas ajudas metodológicas e também relacionadas ao comitê de ética do uso de animais.

Aos colegas do laboratório LNQ: Jéssica Catherine Gomes Duarte, Jozélia Gomes Pacheco Ferreira, Jully Lloyd Camargo Martins, Daniella Sabino Battagello, Marianne Orlandini Klein, Amanda Ribeiro de Oliveira, Ammir Yacoub Helou, Ariel Rodrigues Cardoso, Vitor Correia, Camila de Carvalho,

Larissa Aveiro do Carmo e Giovanna Baroni Diniz. Obrigada por dividirmos tão bons momentos juntos, pelas risadas, pelas discussões científicas, pelos almoços, jantares e tantas alegrias.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo por todas as oportunidades que me foram concedidas para a realização da dissertação do mestrado no curso de pós-graduação.

Ao Programa de Biologia de Sistemas, principalmente à secretária Patrícia que sempre foi muito disponível e prestativa na orientação dos trâmites do mestrado.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia da USP, Renivaldo, e Fabio por toda a ajuda e cuidado com os animais.

Às técnicas do Laboratório Multiusuário do Departamento de Anatomia da USP que sempre ensinaram a usar os equipamentos e contribuíram para o sucesso dos resultados, Martinha, Soninha, Kelly, Marina e Amanda.

A todos os funcionários dos setores de serviços gerais, guardas e secretários que contribuíram para a correta manutenção, proteção e administração do Departamento de Anatomia da USP.

À FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado (Processo 2019/01820-8) que me permitiu minha dedicação exclusiva ao estudo.

À CAPES pelos incentivos ao Programa de Pós-Graduação de Biologia de Sistemas (Código de financiamento- 001).

Enfim, a todos que de uma forma direta ou indireta me ajudaram a concretizar esse projeto, meu muito obrigada!

**“Ninguém pode entrar no Reino de Deus
se não nascer da água e do espírito”**

João (3:5)

RESUMO

FIERI, I. **Caracterização neuroanatômica e aspectos dimórficos da ECRG4/augurina em ratos (*Rattus norvegicus* – Long-Evans) durante o processo de envelhecimento e sua ação como possível mediador do eixo encéfalo-coração.** 2022. 90 folhas. Dissertação (Mestrado Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é o líquido que compõe a maior parte do fluido extracelular do sistema nervoso central (SNC) tendo um papel importante na proteção mecânica, no tamponamento osmótico e na homeostase química do SNC, atribuindo-se a ele a função de comunicação e integração neuroendócrina. Ele é produzido pelo plexo coroide (PC), um epitélio secretor altamente vascularizado que é o principal local de produção da augurina. A augurina é um peptídeo codificado pelo gene relacionado ao câncer de esôfago-4 (*EcrG4*), que em humanos é denominado *C2orf40*. Esse peptídeo atua como gene supressor de tumor, indutor de senescência neural, regulação do sistema imune e potencializador da liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pelo hipotálamo. Ele apresenta ampla distribuição pelos órgãos do corpo, com ênfase àqueles relacionados ao SNC e sistema cardio-vascular (SCV). Os dois sistemas são de vital importância para o manutenção da homeostase corporal estando relacionados através do eixo encéfalo-coração. Esse eixo é composto por uma rede de estruturas límbicas e autonômicas associadas ao ritmo teta. Uma vez que a augurina é um peptídeo relativamente novo e pouco estudado, objetivou-se fazer o mapeamento neuroanatômico, a quantificação no LCR e no soro e a verificação da expressão gênica (RT-qPCR) em ratos de 1 mês, 3 meses e 12 meses, machos e fêmeas. Os resultados obtidos indicaram intensa imunomarcagem para augurina em áreas límbicas da via de sincronização ascendente do tronco encefálico-hipocampo, níveis significativamente maiores de augurina no líquido em relação ao sangue e expressão gênica de *EcrG4* em todas as áreas encefálicas analisadas, com diferenças relativas à idade e sexo. A augurina é, assim, um hormônio peptídico com ação importante na integração e

comunicação do eixo encéfalo-coração e por conseguinte da regulação homeostática.

Palavras chaves: Augurina. ECRG4. Eixo encéfalo-coração. Sistema límbico. Ritmo teta.

ABSTRACT

FIERI, I. **The neuroanatomical characterization and dimorphic aspects of ECRG4/augurin in rats (*Rattus norvegicus* - Long-Evans) during the aging process, and its role as a possible mediator of the brain-heart axis.** 2022. 90 folhas. Masters Thesis (Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Cerebrospinal fluid (CSF) is the fluid that makes up the majority of the extracellular fluid of the central nervous system (CNS). It is important in mechanical protection, osmotic buffering, and chemical homeostasis of the CNS, as well as communication and neuroendocrine integration. The choroid plexus (PC), a highly vascularized secretory epithelium that is the primary site of augurin production, produces it. Augurin is a peptide encoded by the esophageal cancer-4 (*EcrG4*) gene, also known as *C2orf40* in humans. This peptide functions as a tumor suppressor gene, inducer of neural senescence, immune system regulator, and potentiator of hypothalamic adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release. It is widely distributed throughout the body's organs, with a focus on those related to the CNS and cardiovascular system (CVS). The brain-heart axis connects the two systems, which are critical for maintaining body homeostasis. This axis is made up of a network of limbic and autonomic structures that are linked to theta rhythm. Because augurin is a relatively new and understudied peptide, the goal was to perform neuroanatomical mapping, quantification in CSF and serum, and gene expression verification (RT-qPCR) in 1-month, 3-month, and 12-month rats. The findings revealed intense immunostaining for augurine in limbic areas of the brainstem-hippocampus ascending synchronization pathway, significantly higher levels of augurin in cerebrospinal fluid compared to blood, and *EcrG4* gene expression in all brain areas analyzed, with differences related to age and sex. Augurin is thus a peptide hormone with a significant role in the integration and communication of the brain-heart axis and, as a consequence, in homeostatic regulation.

Key words: Augurin. ECRG4. Brain-heart axis. Limbic system. Theta rhythm.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1– Visão sagital da circulação do LCR pelo sistema ventricular encefálico humano
- Figura 2– Representação esquemática da estrutura do PC e seu sistema de transporte celular
- Figura 3– Processamento da proteína ECRG4
- Figura 4– Peso dos animais x idade
- Figura 5– Concentração de proteínas totais no soro
- Figura 6– Concentração de proteínas totais no LCR
- Figura 7– Concentração de augurina no soro
- Figura 8– Concentração de augurina no LCR
- Figura 9– Quantificação relativa da expressão gênica de EcrG4 por qPCR
- Figura 10- Escala colorimétrica para determinação da imunorreatividade à augurina
- Figura 11- Imunomarcação para augurina no PC
- Figura 12- Imunomarcação para augurina no OVLT
- Figura 13- Imunomarcação para augurina no SFO
- Figura 14- Imunomarcação para augurina no SO
- Figura 15- Imunomarcação para augurina no Pa
- Figura 16- Imunomarcação para augurina no Arc
- Figura 17- Imunomarcação para augurina no LS
- Figura 18- Imunomarcação para augurina no LC

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1– Grupos de animais conforme sexo e idade.
- Tabela 2– Sequência dos primers a serem utilizados para reação de RT-PCR
- Tabela 3- Concentração de augurina no soro (pg/mL) por idade e sexo
- Tabela 4- Concentração de augurina no LCR (pg/mL) conforme idade e sexo
- Tabela 5- Imunomarcação para ECRG4/augurina no SNC

1. INTRODUÇÃO

1.1. Líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é o líquido que compõe a maior parte do fluido extracelular do sistema nervoso central (SNC) (Skipor; Thiery, 2008; Kaiser; Bryja, 2020). Ele tem um papel importante na proteção mecânica, no tamponamento osmótico e na homeostase química do SNC, tendo sido tradicionalmente considerado o regulador entre o fornecimento de nutrientes essenciais ao encéfalo e a retirada de metabólitos tóxicos provenientes da atividade neuronal. Atualmente, atribui-se a ele uma função mais dinâmica como via neuroendócrina de comunicação e integração dentro do SNC (Nilsson *et al.*, 1992; Skipor; Thiery, 2008; Liddelow, 2015; Kaiser; Bryja, 2020).

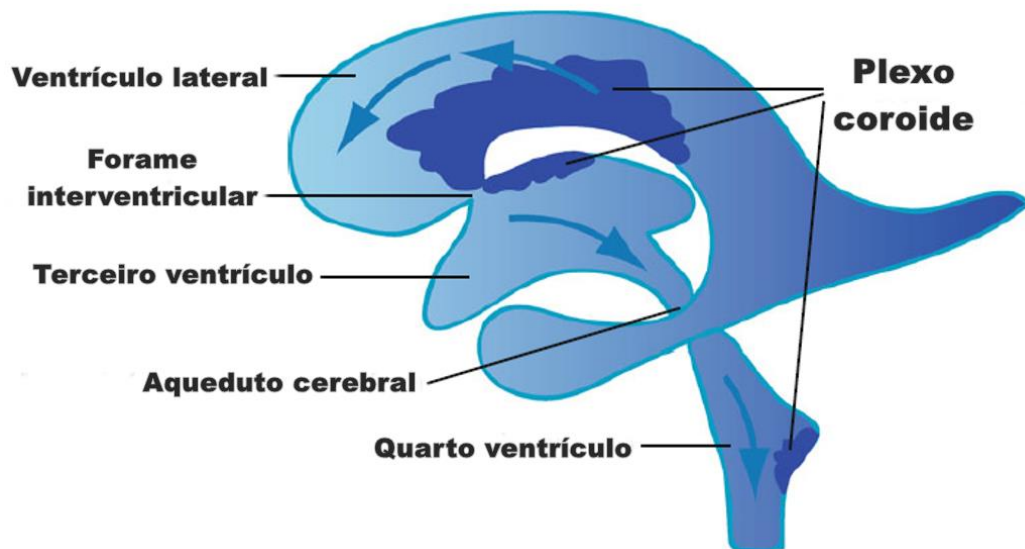


Figura 1 - Visão sagital da circulação do LCR pelo sistema ventricular encefálico humano. O LCR é produzido principalmente pelo plexo coroide localizado nos ventrículos encefálicos. O LCR circula dos ventrículos laterais para o terceiro ventrículo via forames interventriculares e depois para o quarto ventrículo através do aqueduto cerebral. Após deixar o quarto ventrículo o LCR flui para o canal espinal e preenche o espaço subaracnoide, sendo posteriormente absorvido e drenado para a corrente sanguínea pelas granulações das vilosidades aracnoides. Adaptado de Zapaterra; Lehtinen, 2012.

O LCR circula a partir das pulsações das grandes artérias encefálicas presentes sobre a superfície do cérebro, no espaço subaracnoide e nas cisternas basais (Figura 1). Durante a sístole, este é

conduzido para baixo através do forame magno até o saco tecal espinal, que se distende e comprime a gordura epidural, fazendo deslocar o sangue do plexo venoso epidural. Já na diástole, parte do LCR retorna para a cavidade intracraniana e à medida que a onda sistólica distende sua microvasculatura, o encéfalo pulsa se expandindo e comprimindo os ventrículos, impulsionando dessa forma o fluido para fora dos ventrículos (Moody, 2006).

Grande parte do LCR é absorvida e drenada para a corrente sanguínea por meio de granulações das vilosidades aracnoides que penetram nos seios venosos durais e estão associados às raízes nervosas espinais (Cutler; Spelter, 1982; Kaiser; Bryja, 2020). No entanto, foi demonstrado que uma quantidade substancial de LCR entra no parênquima cerebral ao longo do espaço perivascular, incluindo os espaços de Virchow-Robin, como parte de um sistema "glifático" recentemente descrito, o que permite que as substâncias transmitidas pelo LCR se espalhem para um grande número de regiões (Moody, 2006; Johanson; Johanson, 2016; Kaiser; Bryja, 2020).

Em humanos, estima-se que o volume total de LCR no SNC é de 150 ml e que este circule cerca de três a quatro vezes por dia. A taxa de formação de LCR é de aproximadamente 0,35 ml por minuto, produzindo cerca de 500 a 600 ml por dia, o que gera um *turnover* de 14% por hora. (Cutler; Spelter, 1982; Moody, 2006; Skipor; Thiery, 2008; Zappaterra; Lehtinen, 2012; Johanson; Johanson, 2016). Esta produção tende a apresentar variação circadiana, com produção mínima de 30% dos valores máximos (12 ml/h) aproximadamente às 18h e pico máximo de produção noturno de aproximadamente 42 ml/h às 02h (Skipor; Thiery, 2008). Além disso, a dinâmica de produção do LCR muda em resposta a diferentes estados fisiológicos, como o sono, implicando em um possível papel do LCR na coordenação da atividade biológica em todo o SNC em resposta à fisiologia alterada (Kaiser; Bryja, 2020).

Aproximadamente dois terços do volume de LCR são produzidos e secretados pelo plexo coróide (PC) (Nilson *et al.*, 1992; Moody, 2006; Liddelow, 2015; Solár *et al.*, 2020). O volume restante, cerca de 10-30% é derivado das células ependimárias que revestem os ventrículos e pelo

fluido intersticial do parênquima encefálico que se difunde para os ventrículos e espaço subaracnóide (Skipor; Thiery, 2008; Solár *et al.*, 2020).

A secreção do LCR também é influenciada pela ação do sistema nervoso autônomo (SNA). Os capilares e células epiteliais cuboideis do PC são inervados por fibras nervosas adrenérgicas provenientes dos gânglios cervicais superiores e por fibras nervosas parassimpáticas, provavelmente relacionadas aos nervos glossofaríngeo e vago. A estimulação parassimpática reduz a atividade da bomba Na^+ - K^+ ATPase mediada pela formação de óxido nítrico e resulta em redução da secreção de LCR (Cutler; Spelter, 1982; Solár *et al.*, 2020). Ao contrário, a estimulação dos receptores adrenérgicos alpha e beta aumenta a formação de LCR. Além disso, as fibras serotoninérgicas e peptidérgicas no PC também possivelmente influenciam a produção de LCR (Cutler; Spelter, 1982; Solár *et al.*, 2020).

1.2. Plexo coroide

O PC é um epitélio secretor altamente vascularizado, que se projeta para o lúmen dos ventrículos cerebrais (Zappaterra; Lehtinen, 2012; Kaiser; Bryja, 2020). Na maioria dos vertebrados, o PC está presente em cada um dos quatro ventrículos encefálicos (Figura.1) (Skipor; Thiery, 2008; Liddelow, 2015). Em mamíferos, o PC dos ventrículos laterais tem uma estrutura característica semelhante a uma folha ondulante de células epiteliais que está em contato direto com o LCR e encapsula o estroma ricamente vascularizado, enquanto o PC do quarto ventrículo é altamente lobulado e mais complexo, se assemelhando a um feixe de vasos (Skipor; Thiery, 2008; Solár *et al.*, 2020; Kaiser; Bryja, 2020). Já o PC no terceiro ventrículo é muito menor em tamanho e tem uma aparência intermediária (Solár *et al.*, 2020).

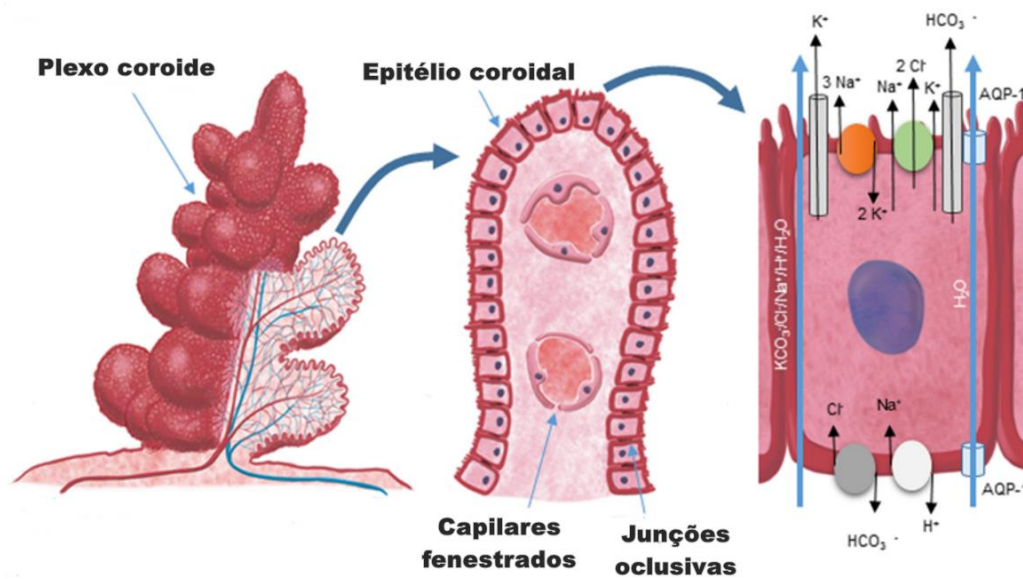


Figura 2- Representação esquemática da estrutura do PC e seu sistema de transporte celular. O PC é composto por uma camada de células epiteliais cubóides e polarizadas fortemente unidas por junções oclusivas que recobrem o estroma composto por capilares fenestrados. O PC desempenha um papel importante no transporte ativo de íons e substâncias para o LCR, mantendo sua homeostase. Adaptado de Oreskovic; Rados; Klarica, 2017.

As células epiteliais coroidais são cubóides, polarizadas e caracterizadas por grandes núcleos arredondados, retículo endoplasmático rugoso proeminente, mitocôndrias abundantes e alta expressão de várias proteínas de transporte, indicando uma robusta capacidade secretora (Rodriguez, 1976; Nilsson *et al.*, 1992; Skipor; Thiery, 2008; Kaiser; Bryja, 2020). Em nível microscópico, a área de superfície do PC é aumentada por numerosas vilosidades, sendo cada vilão composto por uma única camada contínua de células epiteliais coroidais recobrimo um estroma de tecido conjuntivo altamente vascularizado (Figura 2) (Rodriguez, 1976; Nilsson *et al.*, 1992; Skipor; Thiery, 2008; Solár *et al.*, 2020).

Muitas funções têm sido atribuídas ao PC, que dependem principalmente das células epiteliais desse tecido. Além da secreção do LCR, as principais funções são: regulação do acesso de substâncias químicas do sangue ao LCR e síntese e secreção de substâncias biologicamente ativas importantes para as funções do SNC, como proteínas plasmáticas, polipeptídios e citocinas, impactando muitas ações biofísicas/bioquímicas extracelulares nas extensas redes glias e neuronais (Skipor; Thiery, 2008; Johanson; Johanson, 2016).

1.2.1. Função neuroendócrina do PC

O PC apresenta uma posição estratégica no SNC sendo o principal regulador da barreira hematoliquórica (BHLCR). Dessa forma, desempenha um importante papel na comunicação intercelular via LCR, sendo um alvo, fonte e via de sinalização neuroendócrina dentro do SNC. (Wood, 1982; Nilsson *et al.*, 1992; Skipor; Thiery, 2008; Kaiser; Bryja, 2020). Foi relatada a capacidade do PC de liberar uma ampla variedade de moléculas bioativas que, via LCR, regulam processos em todo o SNC, além de ter a função de sensor, respondendo à composição alterada do LCR associada a mudanças nos padrões de atividade do SNC (Kaiser; Bryja, 2020).

O PC também constitui uma via de comunicação endócrina ativa entre a periferia e o encéfalo, atuando como um ponto chave de entrada de complexos sinalizadores da circulação sanguínea para o SNC (Nilsson *et al.*, 1992; Kaiser; Bryja, 2020). Há a transferência ativa de peptídios e hormônios do sangue para o hipotálamo, seja diretamente por meio de transportadores através da barreira hematoencefálica (BHE) hipotalâmica ou indiretamente por meio da rota mais longa de PC-LCR, estabelecendo uma alça reguladora de feedback hormonal (Skipor; Thiery, 2008; Johanson; Johanson, 2016).

Muitos dos fatores distribuídos no LCR demonstraram influenciar uma ampla gama de comportamentos, incluindo sono e apetite (Zappaterra; Lehtinen, 2012). Em geral, as moléculas presentes no LCR se originam do plasma sanguíneo, bem como podem ser secretadas pelos neurônios em contato com o LCR e outras são sintetizadas no PC e depois secretadas para o LCR (Skipor; Thiery, 2008).

O LCR realiza o transporte desses fatores a partir da transmissão de volume, um tipo de comunicação intercelular parassináptica, ou transmissão não sináptica (Moody, 2006; Skipor; Thiery, 2008; Zappaterra; Lehtinen, 2012; Johanson; Johanson, 2016). O fluxo do LCR é conduzido por um gradiente de pressão hidrostática, direcionado do fluido ventricular para o sangue venoso do seio dural (Skipor; Thiery, 2008; Johanson; Johanson, 2016). Acredita-se que a transmissão de volume envolva o

movimento de difusão e de convecção das moléculas dentro do SNC. Assim, as moléculas de sinalização liberadas dentro do tecido cerebral podem agir de maneira autócrina/parácrina, mas também podem se mover ao longo do sistema ventricular e espaço subaracnóide com o LCR e, em seguida, exercer efeitos distais semelhantes ao endócrino nas células-alvo no encéfalo (Skipor; Thiery, 2008).

1.3. Augurina

A augurina é um hormônio neuropeptídico codificado pelo gene relacionado ao câncer de esôfago-4 (*Ecrq4*), um gene supressor de tumor cuja presença e função em tecidos normais não está completamente elucidada, tendo sido associado a homeostase do LCR, indução de senescência celular no SNC, estimulação de células progenitoras após lesão encefálica e estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), através da liberação de fator liberador de corticotrofina (CRF) em ratos (González *et al.*, 2011; Ozawa *et al.*, 2011; Zapaterra; Lehtinen, 2012; Dang *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013; Qin; Zhang, 2018).

O gene *Ecrq4*, oficialmente chamado de *C2orf40* em humanos, está localizado no cromossomo 2q12.2 e consiste de quatro exons, medindo cerca de 14,9 kb e com um cDNA correspondente de 772 pb (Mirabeau *et al.*, 2007; Tadross *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013; Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018; Zhou *et al.*, 2019). Ele foi originalmente identificado e clonado por Su *et al.* em 1998, a partir do epitélio esofágico humano normal em um estudo que visava estabelecer a expressão diferencial de genes no epitélio esofágico humano normal e no epitélio esofágico humano canceroso, sendo descobertos quatro novos genes, *Ecrq1*, *Ecrq2*, *Ecrq3* e *Ecrq4* (González *et al.*, 2011; Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018; Zhou *et al.*, 2019).

O *Ecrq4* é altamente conservado em vertebrados, sugerindo um papel importante em células eucarióticas. A pesquisa em banco de dados revelou, no entanto, que ele não pertence a nenhuma família maior de genes relacionados, o que indicaria um rígido controle evolutivo entre os ortólogos *Ecrq4* e uma função biológica única para esse gene (González *et*

al., 2011; Podvin *et al.*, 2011; Ozawa *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013; Morigushi *et al.*, 2018).

Uma análise inicial de bioinformática utilizando o modelo oculto de Markov seguida de caracterização bioquímica demonstrou que o *EcrG4* codificava um peptídeo pró-hormônio que é processado e secretado como um hormônio peptídico (González *et al.*, 2011; Porzionato *et al.*, 2015; Podvin *et al.*, 2016; Qin; Zhang, 2018). Por esse modelo, foi previsto que o gene *EcrG4* apresenta uma fase de leitura aberta e codifica uma proteína precursora de 148 aminoácidos que pode ser clivada em múltiplos peptídios (Figura 3). Até agora, foram identificados peptídios derivados de *EcrG4* de 17, 14, 10, 8, 6, 4 e 2 kDa, correspondentes a ECRG4 (resíduos 1-148), augurina (resíduos 31-148), CΔ16-augurina (resíduos 31-130), argilina (resíduos 71-148), CΔ16-argilina (resíduos 71-130) e CΔ16 (resíduos 134–148) (González *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2012; Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018).

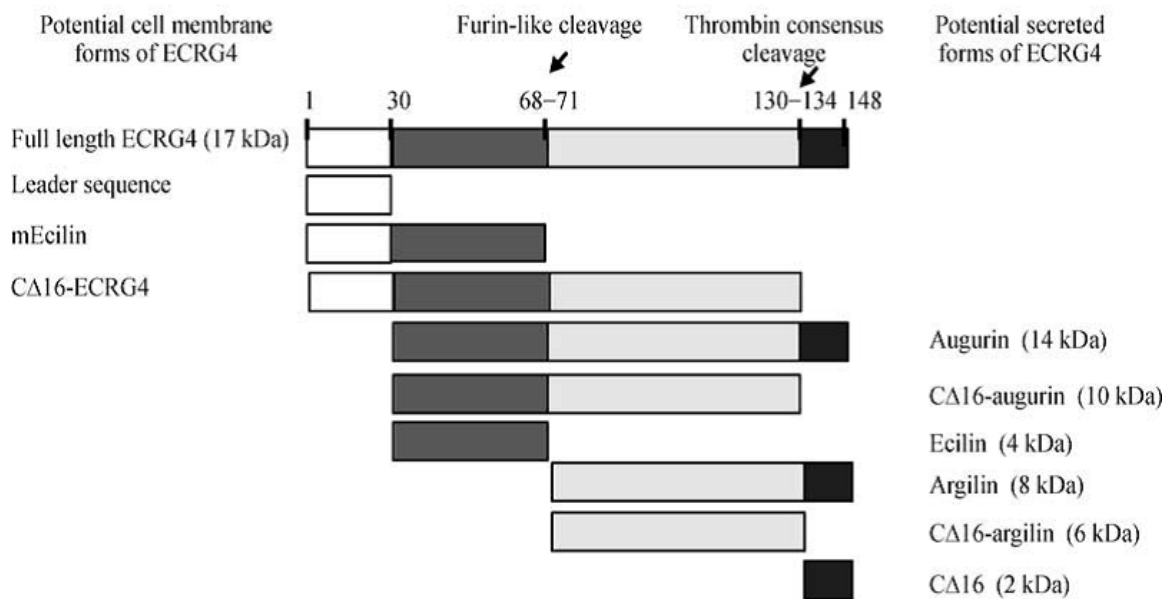


Figura 3- Processamento da proteína ECRG4. O gene *EcrG4* codifica uma proteína de 148 aminoácidos que consiste de uma sequência líder de 30 aminoácidos e a augurina de 14 kDa. ECRG4 contém presumivelmente dois locais de clivagem, um local de clivagem semelhante à furina, que se localiza entre 68-71 e um local de clivagem de consenso de trombina que está localizado entre 130-134. Esse processamento gera os peptídios: CΔ16 (2 kDa), ecilina (4 kDa), CΔ16-argilina (6 kDa), argilina (8 kDa), CΔ16-augurina (10 kDa), augurina (14 kDa) e ECRG4 (17kDa). Retirado de Qin; Zhang, 2018.

A ECRG4 contém uma sequência inicial de 30 aminoácidos que funciona como um peptídeo sinal e um único sítio putativo de clivagem pró-

hormônio, seguido por uma sequência de clivagem para a furina, uma convertase pró-hormônio presente na região intermediária de ECRG4, e um sítio de clivagem de trombina que ocorre próximo da extremidade C-terminal (Figura 3). O processamento de ECRG4 por furina foi relatado como essencial para a inibição da proliferação de células tumorais. A ECRG4 também contém um domínio de homologia porina/canal ânion seletivo voltagem-dependente (VDAC), um domínio de homologia de ciclo de divisão celular e um promotor de anáfase, indicando envolvimento na permeabilidade da membrana mitocondrial e ciclo celular (Dang *et al.*, 2012; Porzionato *et al.*, 2015; Podvin *et al.*, 2016; Qin; Zhang, 2018; Morigushi *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019).

A augurina é produzida por processamento pós-traducional da proteína ECRG4 e constitui o seu principal produto de expressão. Ela é composta por muitos aminoácidos aromáticos, uma característica típica dos hormônios peptídicos (Mirabeau *et al.*, 2007; González *et al.*, 2011; Porzionato *et al.*, 2015). Embora dados mostrem que os resíduos 71-148 apresentem um efeito biológico, também é possível que fragmentos mais curtos de augurina possam ser biologicamente ativos. O segmento amino terminal adjacente ao sítio de clivagem dibásico da augurina tem conservação interespecies substancialmente maior do que o resto do peptídeo (Tadross *et al.*, 2010).

Estudos recentes mostraram que, ao contrário dos precursores neuropeptídicos tradicionalmente secretados, a ECRG4 se localiza na superfície de célula epitelial e permanece ancorada ali após a secreção, podendo ser posteriormente processada proteoliticamente para a atividade biológica célula-específica (Dang *et al.*, 2012; Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018). Essa hipótese foi confirmada por biotinylation da superfície celular que estabeleceu de forma inequívoca a presença de ECRG4 na superfície celular das células transduzidas e também pelo resultado da imunorreatividade de ECRG4 localizada predominantemente nas membranas das células neuroepiteliais. O ancoramento celular de ECRG4 é mediado por uma sequência líder hidrofóbica amino terminal, que permite o tráfego para a superfície e medeia a secreção do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi, onde ocorre a O-tirosina-sulfatação e clivagem

pela furina por via secretora constitutiva, para a posterior translocação e retenção na membrana celular. (Ozawa *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2012; Porzionato *et al.*, 2015).

No que diz respeito aos mecanismos moleculares, estudos com carcinoma nasofaríngeo demonstraram que a ECRG4 inibiu a sinalização de AKT/GSK3 β / β -catenina e ativou a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR (Yang *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2022). Além disso, em outros estudos foi observado que a expressão de *EcrG4* inibiu a expressão e atividade do fator nuclear κ -amplificador da cadeia leve de células B ativadas (NF- κ B) e sua ciclooxigenase-2 (COX-2), (Lee *et al.*, 2015; Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018;; Zhou *et al.*, 2019).

Morigushi *et al.* (2018) identificaram o receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidado semelhante a lectina (LOX-1) como uma proteína de membrana que se liga aos resíduos de aminoácidos 71-132 de *EcrG4* (*EcrG4*(71-132)). Além disso, no mesmo estudo, outros receptores do tipo *scavenger*, como Scarf1, Cd36 e Stabilin-1, facilitaram a internalização eficiente de *EcrG4*(71-132) nas células e foi observado que a transdução do sinal era feita juntamente com receptores do tipo *toll-like* (TLR) em micróglias.

O *EcrG4* é expresso constitutivamente em células epiteliais quiescentes e regulado negativamente durante a tumorigênese, sendo os seus níveis de expressão diretamente correlacionados com o prognóstico (Mirabeau, *et al.*, 2007; Donahue *et al.*, 2010; Ozawa *et al.*, 2011; González *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2019). A diminuição da expressão de *EcrG4* está correlacionada com a transição do crescimento de células tumorais benignas para malignas e o maior grau de supressão desse gene corresponde ao crescimento tumoral agressivo (González *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2019). Níveis diminuídos de *EcrG4* foram observados na maioria dos cânceres, como de esôfago, gástrico, de próstata, de mama, glioma, hepatocelular, nasofaríngeo, colorretal e de tireoide (Mirabeau, *et al.*, 2007; Donahue *et al.*, 2010; Ozawa *et al.*, 2011; González *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2019).

Foi demonstrado que a superexpressão de *EcrG4* inibe a proliferação celular ao bloquear a transição G1/ S do ciclo celular, por meio

do aumento da expressão das proteínas p21 e p53 (Jiang *et al.*, 2013; Qin; Zhang, 2018). Além disso, a co-expressão de *EcrG4* e da enzima extracelular *EcrG1* demonstrou aumentar ainda mais a expressão de p21, reforçando o bloqueio da fase G1 do ciclo celular e sugerindo fortes interações entre ambas na ação supressora de tumor (Li *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2012; Porzionato *et al.*, 2015, Zhou *et al.*, 2019).

A expressão de *EcrG4* é regulada negativamente pela hipermetilação de ilhas CpG de seu promotor (Mirabeau, *et al.*, 2007; González *et al.*, 2011; Porzionato *et al.*, 2015, Qin; Zhang, 2018; Zhou *et al.*, 2019). Esse tipo de controle epigenético está em nítido contraste com outros genes supressores de tumor conhecidos, nos quais ocorre mutações ou polimorfismos de DNA que são geralmente responsáveis pela diminuição ou perda da função supressora de tumor na tumorigênese (Zhou *et al.*, 2019). Modificações epigenéticas semelhantes na metilação do DNA são agora bem descritas após isquemia e lesão do SNC e podem estar relacionadas ao reparo tecidual (Podvin *et al.*, 2010). Além disso, a expressão de *EcrG4* é também regulada negativamente por hipóxia, mas positivamente pela proteína específica-1 (Sp1) (Zhou *et al.*, 2019).

1.3.1. Sistema imune e ECRG4

Progressos recentes no estudo de ECRG4 mostraram que esta proteína apresenta grande relação com o sistema imunológico. Ela é altamente expressa em leucócitos polimorfonucleares (PMNs) isolados a fresco e células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs) e em linfócitos T CD4 e CD8 positivos e linfócitos B CD19 positivos. Em PMNs e PBMCs humanos, a ECRG4 está localizada na superfície celular e se colocaliza com o complexo de imunidade inata TLR4-MD2-CD1425, podendo ser liberada em formas inteiras ou clivadas, em resposta à estimulação celular por lipopolissacarídeo e peptídios N-formil (Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018; Morigushi *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019)

Um papel importante da ECRG4 relacionado ao sistema imunológico seria seu possível envolvimento na inibição do crescimento do tumor por imunovigilância, através da regulação do microambiente imune tumoral

(Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018). Alguns autores propuseram que a ECRG4 possa ser considerada como um fator de crescimento semelhante a citocinas ou quimiocinas. (Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018; Morigushi *et al.*, 2018).

Em estudos realizados com modelo de lesão neural, verificou-se que a expressão do gene *EcrG4* e a imunorreatividade à augurina diminuíram acentuadamente no PC de 1 a 3 dias após a lesão cortical traumática, retornando aos níveis normais no dia 7 (González *et al.*, 2011; Zappaterra; Lehtinen, 2012). Com esses dados, foi proposto que a augurina participe da fase aguda da recuperação da lesão a partir da desinibição das células nervosas e promoção da proliferação de células neuroprogenitoras (NSPCs) (Zappaterra; Lehtinen, 2012; Porzionato *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que a superexpressão de *EcrG4* através de injeção intracerebroventricular de vetores de adenovírus contendo o cDNA de *EcrG4* no ventrículo lateral, levou à redução significativa do número de células positivas para a bromodesoxiuridina (BrdU) ao longo da zona subventricular de ratos lesionados (González *et al.*, 2011; Zappaterra; Lehtinen, 2012; Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018). Inversamente, o silenciamento gênico por *knockdown* funcional de *EcrG4* no desenvolvimento de embriões de *zebrafish* causou o aumento da proliferação celular positiva para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e induziu um fenótipo semelhante à hidrocefalia dose-dependente (González *et al.*, 2011; Porzionato *et al.*, 2015; Qin; Zhang, 2018).

Estas observações corroboram a hipótese de que a augurina pode afetar o destino celular no SNC, controlando e regulando as taxas de proliferação celular de NSPCs. Assim, a metilação epigenética do gene ECRG4 que caracteriza a produção de augurina pode prever a resposta do progenitor à lesão e, portanto, pode implicar o PC na definição da capacidade regenerativa do SNC (González *et al.*, 2011).

Levando em consideração que o aumento da expressão de *EcrG4* diminui a proliferação celular de NSPCs, foi sugerido que ECRG4 pudesse atuar como um indutor secretado de senescência celular no SNC. (Porzionato *et al.*, 2015).

Em estudo desenvolvido por Kujuro et al (2010) foi observado que forma secretada de ECRG4 estava presente no meio de cultura de células precursoras de oligodendrócitos senescentes e a adição de *EcrG4* recombinante induziu a senescência de células precursoras de oligodendrócitos e células progenitoras neurais do giro denteado de camundongos. Além disso, a expressão de ECRG4 é maior em algumas populações de células do encéfalo de camundongos idosos, tais como células precursoras de oligodendrócitos no corpo caloso, células progenitoras neurais na zona subgranular do giro denteado, células granulares do hipocampo, células de Purkinje e células NeuN do tronco encefálico.

1.3.2. Distribuição tecidual de ECRG4

A análise da expressão de RNAm do gene da augurina foi realizada em diversos tecidos do camundongo, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). O RNAm da augurina se mostrou presente em vários tecidos estudados com expressão mais significativa no esôfago, estômago, músculo esquelético, coração, útero, bexiga, cérebro, hipotálamo, PC, glândula adrenal e tireoide, (Mirabeau *et al.*, 2007; Ozawa *et al.*, 2011; Porzionato *et al.*, 2015). Já a análise de *microarray* indicou maior expressão na tireóide, hipófise, testículos e glândulas adrenais em humanos, e nas glândulas adrenais, ovários, retina e traqueia em camundongos, enquanto a hibridização *in situ* em camundongos revelou expressão proeminente de *EcrG4* no lobo intermediário da hipófise, camada glomerular do córtex adrenal, PC e nodo atrioventricular do coração. (Tadross *et al.*, 2010; Porzionato *et al.*, 2015).

1.3.3. Distribuição de ECRG4 no sistema nervoso central

No encéfalo humano e de rato adulto, ensaios imuno-histoquímicos demonstraram que a presença de ECRG4 é mais alta nos bulbos olfatórios, cerebelo, hipotálamo e amígdala, embora uma avaliação adicional por qPCR mostrasse a expressão mais alta quantitativamente no PC. Já a

hibridação *in situ* em camundongos revelou expressão proeminente de *Ecrq4* no lobo intermediário da hipófise e no PC (Tadross *et al.*, 2010; Porzionato *et al.*, 2015).

No hipotálamo, os neurônios dos núcleos supraóptico (SO) e paraventricular (Pa) mostraram imunorreatividade citoplasmática moderada, se colocalizando com a vasopressina e a ocitocina, porém os outros núcleos hipotalâmicos foram principalmente negativos (Porzionato *et al.*, 2015).

Na adeno-hipófise, algumas células apresentaram imunomarcção citoplasmática fraca. Na neuro-hipófise, fibras e pituícitos mostraram imunomarcção fraca/moderada. As células do lobo intermediário mostraram imunomarcção citoplasmática fraca. Além disso, observou-se imunorreatividade à augurina na eminência mediana e nos corpos de Herring na neuro-hipófise, indicando uma possível ação como um neuropeptídeo hipotalâmico (Mirabeau *et al.*, 2007; Tadross *et al.*, 2010; Porzionato *et al.*, 2015).

No córtex cerebral e no hipocampo (Corno de Amon – CA - CA1, CA2, CA3, CA4, nas lâminas dorsal e ventral do giro denteado (DG)), os neurônios eram negativos ou apresentavam imunorreatividade citoplasmática fraca. Foi observada também uma baixa expressão do RNAm de *Ecrq4* no quiasma óptico (Mirabeau *et al.*, 2007; Porzionato *et al.*, 2015).

No córtex cerebelar, as células de Purkinje mostraram uma imunomarcção citoplasmática moderada. Nas camadas granular e molecular, a maioria das células foi negativa, embora também tenham sido detectadas algumas células exibindo imunomarcção citoplasmática (Porzionato *et al.*, 2015).

No tronco encefálico, vários núcleos mostraram diferentes porcentagens de neurônios imunomarcados e intensidade de marcação diferente, sendo o complexo olivar o que apresentou porcentagens mais elevadas de imunorreatividade (Porzionato *et al.*, 2015).

As células da glia não apresentaram imunomarcção, exceto para as células endimárias ventriculares e células epiteliais do PC, que

apresentaram imunorreatividade alta (González *et al.*, 2011; Porzionato *et al.*, 2015).

As bases de dados genômicos disponíveis publicamente, incluindo Genepaint, o Mapa de Expressão Gênica do Cérebro St. Jude e o *Allen Brain Atlas*, mostraram que a expressão do gene *Ecr4* foi significativamente maior no PC do que em outros tecidos do SNC em ratos em desenvolvimento e adultos (Mirabeau *et al.*, 2007; González *et al.*, 2011).

No encéfalo em desenvolvimento do embrião de camundongo, a ECRG4 foi encontrada principalmente em células epiteliais do PC, em ratos, em células endoteliais ventriculares (Porzionato *et al.*, 2015).

No PC humano tanto as células fetais como as do adulto demonstraram uma imunomarcção robusta na superfície apical sugerindo uma localização de superfície celular polarizada (Donahue *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011).

1.3.4. Distribuição de ECRG4 no sistema cardiovascular

No sistema cardiovascular (SCV), o *Ecr4* é expresso em cardiomiócitos, artéria coronária, artéria aórtica, as células glômicas do corpo carotídeo, átrios e ventrículos. A expressão de *Ecr4* é maior nos átrios e no nodo sinusal do que nos ventrículos, com expressão mais elevada no lado esquerdo do que no lado direito do coração. Esses dados foram validados por análises imuno-histoquímicas, que demonstraram alta imunorreatividade para ECRG4 no nodo sinusal, nodo atrioventricular, átrios e cardiomiócitos ventriculares isolados. A expressão mais alta de *Ecr4* no átrio do que no ventrículo é ainda confirmada por conjuntos de dados de *microarray* (Huang *et al.*, 2017; Shakeel *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019).

Em humanos, a expressão de *Ecr4* ocorre constitutivamente nos apêndices atriais e é regulada negativamente nas amostras de pacientes com fibrilação atrial, observando-se nesses pacientes aumento do estado de metilação das ilhas CpG de seu promotor. Dessa forma, o *Ecr4* pode estar envolvido no controle da frequência/ritmo do coração e ser o elo

relacionado à maior incidência de fibrilação atrial em pacientes com tumor (Huang et al, 2017; Zhou *et al*, 2019).

1.4. Eixo “encéfalo-corção”

Existe uma interação complexa entre o SNC e o SCV (Rahmouni, 2016, Tahsili-Fahadan; Geocadin, 2017). Tradicionalmente, acredita-se que haja uma conexão hierárquica entre eles, com o encéfalo comandando o coração por meio da rede autonômica central. No entanto, embriologicamente o coração bate antes que o encéfalo seja formado e um coração transplantado pode funcionar mesmo sem a conexão com o SNC do receptor (Kubota *et al.*, 2001; Billones *et al.*, 2018).

A literatura mostrou que a causa mais frequente do acidente vascular encefálico (AVE) é a arritmia cardíaca, na maioria das vezes devido à fibrilação atrial (Manea *et al.*, 2015) e que várias patologias do SNC podem levar a uma ampla gama de alterações na função e estrutura do SCV, desde alterações transitórias e benignas no eletrocardiograma (ECG) até lesão miocárdica, cardiomiopatia e morte cardíaca (Tahsili-Fahadan; Geocadin, 2017). O estudo da conexão entre esses sistemas tem ganhado cada vez mais importância nas últimas décadas, gerando o conceito de neurocardiologia (Manea *et al.*, 2015; Billones *et al.*, 2018).

A importância do SNC na regulação cardiovascular está bem estabelecida. O encéfalo é responsável pela percepção contínua do estado homeostático na circulação periférica por meio de vários mecanismos, incluindo reflexos neurais aferentes e sinais humorais. Uma grande rede de regiões encefálicas corticais e subcorticais controlam a função cardiovascular modulando a liberação de fatores hormonais críticos, mensageiros químicos e neurotransmissores. Esse controle é feito em conjunto com a alteração da atividade dos ramos simpáticos e parassimpáticos do SNA que atendem a diferentes órgãos e tecidos por todo o corpo (Rahmouni, 2016; Tahsili-Fahadan; Geocadin, 2017; Kin; Jeong, 2019).

1.4.1. Potenciais evocados pelos batimentos cardíacos

No estado de repouso, os batimentos cardíacos evocam respostas corticais chamadas de potenciais evocados por batimentos cardíacos (HEPs), que refletem o processamento interoceptivo cardíaco cortical e níveis intrínsecos de excitação (Perogamvros et al., 2019; Kin; Jeong, 2019). A amplitude das HEPs é aumentada em estados de alta excitação emocional, motivação elevada e estresse e reduzida na depressão (Perogamvros *et al.*, 2019).

Estudos recentes mostraram que os sinais viscerais são acoplados e impulsionam a dinâmica encefálica espontânea, indicando que as vísceras e o encéfalo formam um sistema único complexo (Azzalini *et al.*, 2019). Kin e Jeong (2019) observaram que o batimento cardíaco induz a sincronização de fase teta das regiões corticais, gerando uma estrutura de rede no estado de repouso que não reflete a sincronização induzida artificialmente, nem em outras bandas de frequência.

1.4.2. Ritmo teta

O ritmo teta é registrado pelo eletroencefalograma (EEG) como um potencial de campo síncrono extracelular com frequência de 4 a 10-12 ciclos/s que pode produzir descargas rítmicas ou com fases bloqueadas em várias regiões do SNC devido à comunicação intraneural. (Pedemonte *et al.*, 2003; Billones *et al.*, 2018; Kowalczyk *et al.*, 2021). Ele foi descrito pela primeira vez em 1938 por Jung e Kornmuller que observaram que um estímulo nociceptivo periférico reduzia o ritmo sincronizado de ondas lentas no hipocampo dorsal (*Apud* Gottesmann, 1992).

As oscilações teta estão presentes em várias espécies de roedores bem como em humanos (Komisaruk, 1970; Heynen; Sainsbury, 1990; Kowalczyk *et al.*, 2021).

Há muitas evidências experimentais que conectam oscilações teta de roedores a vários processos neurais, como potenciação de longo prazo, aprendizado espacial e de navegação, atenção e alerta, movimentos

voluntários e integração sensório-motora (Pedemonte *et al.*, 2003; Kowalczyk *et al.*, 2021).

Em roedores, existem dois tipos distintos de oscilações teta no hipocampo que possuem perfis neurofarmacológicos diferentes e aparecem durante estados comportamentais específicos (Heynen; Sainsbury, 1990; Abe, Toyosawa, 1999; Kowalczyk *et al.*, 2021).

O ritmo teta tipo 1 está associado ao movimento voluntário, tem natureza não colinérgica, isto é, não é afetada pela administração de sulfato de atropina, desaparece após a administração de anestésicos, como éter dietílico, uretano, pentobarbital e outros e tem uma faixa de frequência de 6-12 Hz. O perfil neurofarmacológico exato desse ritmo não foi determinado, porém provavelmente está relacionado a sistemas complexos de neurotransmissores, com destaque para o serotoninérgico, e sabe-se que requer também uma conexão com o isocórtex através do córtex entorrinal (Heynen; Sainsbury, 1990; Abe; Toyosawa, 1999; Kowalczyk *et al.*, 2021).

O ritmo teta tipo 2 possui natureza colinérgica e muscarínica (é abolida pelo sulfato de atropina) e está presente durante a completa ausência do movimento do animal, sendo observada durante o sono do tipo *Rapid Eyes Movements* (REM) e anestesia, mas também pode ocorrer durante atividades motoras automáticas, como lambe ou mastigar. Apresenta uma faixa de frequência de 4-9 Hz, possui um componente GABAérgico e pode ser induzido por estimulação hipotalâmica (Heynen; Sainsbury, 1990; Abe; Toyosawa, 1999; Kowalczyk *et al.*, 2021).

Em humanos, estudos com EEG mostraram que as oscilações rítmicas teta são proeminentes durante a vigília ativa, a navegação espacial, a memória de trabalho, o sono REM e o sono de ondas lentas (NREM). Além disso, foi demonstrado que há forte correlação entre as oscilações teta humanas e a resposta ao estresse. (Pedemonte *et al.*, 2003; Kowalczyk *et al.*, 2021).

A partir de estudos correlacionando o ECG e o EEG observou-se que durante o sono REM ocorrem picos de frequência cardíaca e pressão arterial associados a uma maior incidência de ondas teta hipocampais, bem como grande variabilidade na atividade simpática associada a alterações

fásicas na descarga parassimpática tônica (Rowe *et al.*, 1999; Pedemonte *et al.*, 2005).

O envolvimento primário da ativação do SNC nesses eventos é demonstrado pelo aumento concomitante e notável da frequência teta do hipocampo, atividade das ondas ponto-geniculoocipitais (PGO) e movimentos oculares durante o sono REM. (Rowe *et al.*, 1999; Pedemonte *et al.*, 2005).

A ocorrência do ritmo teta do hipocampo está associada, neuroanatomicamente, à ativação de várias estruturas límbicas que formam a via de sincronização ascendente do tronco encefálico-hipocampo (Komisaruk, 1970; Gottesmann 1992; Abe; Toyosawa, 1999; Kowalczyk *et al.*, 2021).

1.4.3. Sistema límbico e ondas teta

O sistema límbico (SL) é composto por um grupo de estruturas corticais e subcorticais interconectadas que medeiam emoções, estados viscerais, aprendizado e memória. Ele conecta diretamente as funções encefálicas inferiores e superiores e influencia as emoções, as respostas autonômicas a essas emoções, motivação, humor e sensações de dor e prazer (Papez, 1958; Catani *et al.*, 2013; Gunbey *et al.*, 2014).

O SL é filogeneticamente uma das partes encefálicas mais primitivas e é composto por um grupo de estruturas interconectadas de substância cinzenta e branca. O componente de substância cinzenta é formado por hipocampo, núcleos amigdalóides, hipotálamo, núcleo *accumbens* (Acb), núcleos habenulares, núcleos talâmicos (anterior, intralaminar e medial dorsal), núcleos olfatórios, núcleos septais, *substantia innominata* (SI), córtex cingulado (Cg), áreas do córtex pré-frontal (Prf), córtex parahipocampal (Ph e núcleos do mesencéfalo. Os componentes do feixe de fibras da substância branca incluem o cíngulo (cg), as estrias longitudinais, o fórnice (f), a comissura anterior (aca), os tratos mamilotalâmico (mt) e mamilotegmentar (mtg), a estria terminal (st), as estrias medulares do tálamo (sm), a banda diagonal (DB), o fascículo retroflexo (fr), a *ansa peduncularis*, o fascículo longitudinal dorsal (dlf) e o

feixe medial prosencefálico (mfb) (Papez, 1958; Shah *et al.*, 2012; Catani *et al.*, 2013; Gunbey *et al.*, 2014).

Christfried Jakob em 1906 e James Papez em 1937 formularam que a base anatômica das emoções ocorria em um modelo de rede unificada. Papez descreveu que o conjunto de interconexões entre hipocampo, corpos mamilares, núcleos talâmicos anteriores, giro cingulado e parahipocampal formavam um circuito que vinculava percepção à emoção e reação, posteriormente denominado “Circuito de Papez”. Em 1949, MacLean concluiu que o córtex límbico, juntamente com as estruturas subcorticais límbicas, é um sistema funcionalmente integrado interconectado por feixes de fibras de curto e longo alcance (Shah *et al.*, 2012; Catani *et al.*, 2013; Gunbey *et al.*, 2014)

Atualmente, em modelo revisado a partir do uso de métodos de neuroimagem funcional, identificam-se três redes distintas, mas parcialmente sobrepostas: (i) a rede hipocampal-diencefálica e parahipocampal-retroesplênica dedicada à memória e orientação espacial; (ii) A rede temporo-amígdala-órfito-frontal para a integração da sensação visceral e emoção com memória semântica e comportamento; (iii) a rede de modo padrão envolvida em memórias autobiográficas e pensamento autodirigido introspectivo (Catani *et al.*, 2013).

As células de disparo ritmicamente relacionadas às oscilações teta do hipocampo foram encontradas em várias regiões encefálicas diferentes, incluindo a formação hipocampal, núcleo septal medial (MS), córtex entorrinal, córtex cingulado, núcleo dorsal da rafe (DRC), região pontina, núcleo rubro (RN) e hipotálamo posterior (Kowalczyk *et al.*, 2021).

O núcleo septal medial e o ramo vertical da banda diagonal de Broca (MS-VDB) são conhecidos por serem o marca-passo dos ritmos teta do hipocampo (Gottesmann, 1992; Abe, Toyosawa, 1999; Kowalczyk *et al.*, 2021). Em termos gerais, são responsáveis por combinar as entradas do tronco encefálico e dos núcleos diencefálicos caudais e por distribuir saídas rítmicas para estruturas límbicas, incluindo a formação hipocampal (Abe, Toyosawa, 1999; Kowalczyk *et al.*, 2021). Assim, uma vez que uma proporção substancial de neurônios piramidais (eferentes) do hipocampo e neurônios septais disparam em rajadas que são sincronizadas com o ritmo

teta, provavelmente existe uma saída neuronal pulsada do SL que é sincronizada com teta (Komisaruk, 1970).

O ritmo teta é necessário para o processamento de sinais, podendo atuar tanto como comparador para impulsos sensoriais que surgem através de vias neurais de diferentes comprimentos funcionais como também um modulador ou gerador de atividade motora, pulsando um ritmo de marcapasso eferente através do sistema límbico-hipotalâmico-mesencéfalo (Kraines, 1963; Komisaruk, 1970; Philippu, 2019).

O processamento de sinais é imprescindível para a ativação de mecanismos relacionados à manutenção homeostática (Azzalini *et al.*, 2019). Como a augurina está relacionada à capacidade regenerativa do tecido nervoso (González *et al.*, 2011) e à capacidade de contração cardíaca (Zhou *et al.*, 2019), possivelmente represente um importante papel como regulador do eixo encéfalo-coração.

6. CONCLUSÃO

Observados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a ECRG4/augurina :

- a) Apresenta as características bioquímicas e secretoras de um peptídeo neuroendócrino;
- b) É expressa principalmente nas regiões límbicas;
- c) Está relacionada à propagação do ritmo teta;
- d) Tem ação no SNA e no eixo HPA;
- e) É afetada pelas variáveis sexo e idade.

7. REFERÊNCIAS

ABE, Y; TOYOSAWA, K. Age-Related Changes in Rat Hippocampal Theta Rhythms: A Difference between Type 1 and Type 2 Theta. **J. Vet. Med. Sci.** v. 61, n.5, p.543–548, 1999.

AZZALINI, D.; REBOLLO, I.; TALLON-BAUDRY, C. Visceral Signals Shape Brain Dynamics and Cognition. **Trends Cogn Sci.** v.23, n.6, p.488-509, 2019.

BAILEY A, M.; SILVER; R. Sex Differences in Circadian Timing Systems: Implications for disease. **Front Neuroendocrinol.** v.35, n.1, p.111–139, 2014.

BENARROCH, E.E, Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. **Clin Auton Res.** v.15, p.254–263, 2005.

BILLONES, R.K.C.; BEDRUZ, R.A.R.; CAGUICLA, S.M.D.; ILAGAN, K.M.S.; MONSALE, K.R.C.; SANTOS, A.G.G.; VALENZUELA, I.C.; VILLANUEVA, J.P.; DADIOS, E.P. Cardiac and Brain Activity Correlation Analysis Using Electrocardiogram and Electroencephalogram Signals. **2018 IEEE 10th International Conference on Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment and Management.** Conference Paper. 2018.

BRICKMAN, A.L; CALARESU, F.R; MOGENSON, G.J. Bradycardia during stimulation of the septum and somatic afferents in the rabbit. **Am. J. Physiol.** n.236, v.3 p. 225-230, 1979.

BUIJS, F.N.; GUZMÁN-RUIZ, M.; LEÓN-MERCADO, L; BASUALDO, M.C.; ESCOBAR, C.; KALSBECK, A.; BUIJS, R.M. Suprachiasmatic Nucleus Interaction with the Arcuate Nucleus; Essential for Organizing Physiological Rhythms. **eNeuro.** v.4, n.2, p.1-14, 2017.

CARSON, D.S; BERQUIST, S.W; TRUJILLO, T.H; GARNER, J.P; HANNAH, S.L; HYDE, S.A; SUMIYOSHI, R.D; JACKSON, L.P; MOSS, J.K; STREHLOW, M.C; CHESHER, S.H, PARTAP, S; HARDAN, A.Y; PARKER, K.J. Cerebrospinal fluid and plasma oxytocin concentrations are positively correlated and negatively predict anxiety in children. **Molecular Psychiatry.** v.20, p.1085–1090, 2015.

CATANI, M; DELL'ACQUA, F; DE SCHOTTEN, M.T. A revised limbic system model for memory, emotion and behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** v. 37, p. 1724–1737, 2013.

CHITRAVANSHI, V.C; PRODDUTUR, A; SAPRU, H. N. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-12) in the hypothalamic paraventricular nucleus of

the rat are mediated via angiotensin II. **Exp Physiol.** n. 97, v.9, p. 1001–1017, 2012.

CHOMCZYNSKY, P; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.** v.162, p.156-159, 1986.

COOTE, J. H. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. **Exp Physiol.** v.90.2, p. 169–173, 2004.

CORA, M.C; KOOISTRA, L; TRAVLOS, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology.** v.43, p. 776-793, 2015.

CUTLER, R.W.P; SPERTELL, R.B. Cerebrospinal Fluid: A Selective Review. **Annals of Neurology.** v.11, n.1, p. 1-10, 1982.

DANG, X; PODVIN, S; COIMBRA,R; ELICEIRI, B; BAIRD, A. Cell-specific processing and release of the hormone-like precursor and candidate tumor suppressor gene product, Ecrq4. **Cell Tissue Res.** v.348, p.505–514, 2012.

DART, A.M.; DU, X.J.; KINGWELL, B.A. Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. **Cardiovascular Research.** v. 53, p. 678–687, 2002.

DONAHUE, J.E; MILLER, M.C; BREESE, V; PODVIN, S; ELICEIRI, B; JACKSON, C.L; JOHANSON, C.E; STOPA, E. G; GONZALEZ, A.M; BAIRD, A. ECRG-4 expression in normal and neoplastic choroid plexus. **Cerebrospinal Fluid Research.** v. 7, s.1, s.32, 2010.

ENGELHARDT, B; SOROKIN, L.The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Semin Immunopathol.** v.31, p.497–511, 2009.

FENTIE, I.H; GREENWOOD, M. M; WYSS, J.M; CLARK, J.T. Age-Related Decreases in Gonadal Hormones in Long–Evans Rats. Relationship to Rise in Arterial Pressure. **Endocrine.** v.25, n.1, p.15–22, 2004.

GEE, P; RHODES, C.H; FRICKER, L.D; ANGELETTI, R.H. Expression of neuropeptide processing enzymes and neurosecretory proteins in ependyma and choroid plexus epithelium. **Brain Research.** v. 617, p. 238-248, 1993.

GNUTZMANN, L.V; PLEWKA, J; SULDOFSKI, M.T; FELISBERTO, M; NESI, V. Análise dos valores de referência do líquido cefalorraquidiano. **RBAC.** v.48, n.3, p.189-97, 2016.

GOMPF, H.S.; ANACLET, C.; The neuroanatomy and neurochemistry of sleep-wake control. **Curr Opin Physiol.** v.15, p. 143-151, 2020.

GONZALEZ, A.M; PODVIN,S; LIN,S.Y; MILLER,M.C; BOTFIELD, H; LEADBEATER, W.E; ROBERTON, A; DANG, X; KNOWLING, S.E; CARDENAS- GALINDO, E; DONAHUE, J.E; STOPA, E. G; JOHANSON, C.E; COIMBRA, R; ELICEIRI, B. P; BAIRD, A. Ecr4 expression and its product augurin in the choroid plexus: impact on fetal brain development, cerebrospinal fluid homeostasis and neuroprogenitor cell response to CNS injury. **Fluids and Barriers of the CNS**. v.8, n.6, p.1-17, 2011.

GOTTESMANN, C. Theta Rhythm: The Brain Stem Involvement. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 16, p.25-30, 1992.

GUNBEY, P.H; ERCAN, K; FINDIKOGLU, A.S; BULUT, H.T; KARAOGLANOGLU, M.; ARSLAN, H. The Limbic Degradation of Aging Brain: A Quantitative Analysis with Diffusion Tensor Imaging. **The Scientific World Journal**. v.2014, p.1-7, 2014.

HECK, A.L.; HANDA, R.J. Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. **Neuropsychopharmacology**. v.44, n.1, p.45-58, 2019.

HEYNEN, A.J.; SAINSBURY, R.S. Alpha,-Noradrenergic Modulation of Hippocampal Theta Activity. **Brain Research Bulletin**. v.26, p.29-36, 1990.

HINOJOSA-LABORDE, C.; CHAPA, I.; LANGE, D.; HAYWOOD, J.R. Gender differences in sympathetic nervous system regulation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.26, n. 2, p.122-126, 1999.

HUANG, L; YU, H; FAN, X; LI, X; MAO, L; CHENG, J; ZENG, X; DANG, X. A Potential Role of Esophageal Cancer Related Gene-4 for Atrial Fibrillation. **Scientific Reports**. v.7, n.2717, p. 1-11, 2017.

HÜHMER, A.F; BIRINGER, R.G; AMATO, H; FONTEH, A. N; HARRINGTON, M.G. Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges. **Disease Markers**. v.22, p.3–26, 2006.

JEONG, J.K.; DOW, S.A.; YOUNG, C.N. Sensory Circumventricular Organs, Neuroendocrine Control, and Metabolic Regulation. **Metabolites** v.11, n.494, p.1-16, 2021.

JIANG, C.P; WU, B.H; WANG, B.Q; FU, M.Y; YANG, M; ZHOU, Y; LIU, F. Overexpression of ECRG4 enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in the human gastric cancer SGC-7901 cell line. **Tumor Biol**. v.34, p.2269–2273, 2013.

JOHANSON, C; JOHANSON, N. Merging Transport Data for Choroid Plexus with Blood-Brain Barrier to Model CNS Homeostasis and Disease

More Effectively. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**.v.15, p. 1151-1180, 2016.

JOHNSON, A. K., GROSS, P. M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **FASEBJ**. 7: 678-686; 1993.

KAISER, K; BRYJA, V. Choroid Plexus: The Orchestrator of Long-Range Signalling Within the CNS. **Int. J. Mol. Sci**, v.4760, p.1-21, 2020.

KIM, J.; JEONG, B. Heartbeat Induces a Cortical Theta-Synchronized Network in the Resting State. **eNeuro**. v.6, n.4, p.1-11, 2019.

KOMISARUK, B.R. Synchrony between limbic system theta activity and rhythmical behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. v.70, n.3, p. 482-492, 1970.

KOROBKA, I.E.; YAKOVLEVA, E.G.; BELONOSOV, S.S.; ZARUBINA, T.V.; KOROTKOV, K.G. Gender differences in the activity of the autonomic nervous systems of healthy and hypertensive patients in Russia. **J Appl Biotechnol Bioeng**. v.3, n.6, p. 459-463, 2017.

KOWALCZYK, T.; STASZELIS, A.; KAZ'MIERSKA-GREZBOWSKA, P.; TOKARSKI, K.; CABAN, B. The Role of the Posterior Hypothalamus in the Modulation and Production of Rhythmic Theta Oscillations. **Neuroscience**.v.470, p.100–115, 2021.

KRAINES, S.H. Emotions: A Physiologic Process. **Psychosomatics**. v.4, n.6, p. 313-324, 1963.

KUBOTA, Y.; SATO, W.; TOICHI, M.; MURAI, T.; OKADA, T.; HAYASHI, A.; SENGOKU, A. Frontal midline theta rhythm is correlated with cardiac autonomic activities during the performance of an attention demanding meditation procedure. **Brain Res Cogn Brain Res**. v.11, n.2, p.281-287, 2001.

LEE, J; DANG, X; BORBOA, A; COIMBRA, R; BAIRD, A; ELICEIRI, B.P. Thrombin-processed Ecr4 recruits myeloid cells and induces antitumorigenic inflammation. **Neuro-Oncology**. v.17, n.5, p.685–696, 2015.

LENG, L. The endocrinology of the brain. **Endocrine Connections**. v.7, p.275-285, 2018.

LENHARD, L; DEFTOS, L. J. Adenohypophyseal Hormones in the CSF. **Neuroendocrinology**. v.34, p.303-308, 1982.

LI, L.W; LI, Y.Y; LI, X.Y; ZHANG, C.P; ZHOU, Y; LU, S.H. A novel tumor suppressor gene ECRG4 interacts directly with TMPRSS11A (ECRG1) to

inhibit cancer cell growth in esophageal carcinoma. **BMC Cancer**. v.11, n.52, p.1-7, 2011.

LIDDELOW, S.A. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. **Frontiers in Neuroscience**. v.9, n. 32, p. 1-13, 2015.

LIMA, C. M; LIMA A. K; MELO, M. G. D; DÓRIA, G. A. A; LEITE, B. L. S; SERAFINI, M. R; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia plena**. v.10, n.3, p.1-9, 2014.

LU, K. H; ANZALONE, C. R; LAPOLT, P. S. Relation of neuroendocrine function to reproductive decline during aging in the female rat. **Neurobiology of Aging**. v.15, n.4, p.541- 544, 1994.

LUCA, G.C; REIS, B.F. Espectrofotometria de proteínas totais em plasma de sangue bovino por análise em fluxo. **Scientia Agricola**. v.59, n.2, p.251-256, 2001.

MARCONDES, F. K; BIANCHI, F. J; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.** v. 62, n.4A, p.609-614, 2002.

MEHAY, D.; SILBERMAN, Y.; ARNOLD, A.C. The Arcuate Nucleus of the Hypothalamus and Metabolic Regulation: An Emerging Role for Renin-Angiotensin Pathways. **Int J Mol Sci**. v.22, n.13, p.1-12, 2021.

MANEA, M.M.; COMSA, M.; MINCA, A.; DRAGOS, D.; CONSTANTIN, P. Brain-heart axis. **Journal of Medicine and Life**. v.8, n.3, p.266-271, 2015.

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, R.; ESCOBAR, C.; BUIJS, R.M. Suprachiasmatic Nucleus-Arcuate Nucleus Axis: Interaction Between Time and Metabolism Essential for Health. **Obesity (Silver Spring)**. v.28, Suppl 1, p. S10-S17, 2020.

MIRABEAU, O; PERLAS, E; SEVERINI, C; AUDERO, E; GASCUEL, O; POSSENTI, R; BIRNEY, E; ROSENTHAL, N; GROSS, C. Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening. **Genome Research**. v.17, p.320– 327, 2007.

MOODY, D.M. The Blood-Brain Barrier and Blood–Cerebral Spinal Fluid Barrier. **Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**. v.10, n.2, p.128-131, 2006.

MORIGUCHI, T; TAKEDA, S; IWASHITA, S; ENOMOTO, K; SAWAMURA, T; KOSHIMIZU, U; KONDO, T. Ecr4 peptide is the ligand of multiple scavenger receptors. **Scientific Reports**. v.8, n.4048, p.1-9, 2018.

MYUNG, J.; SCHMAL, C.; HONG, S.; TSUKIZAWA, Y.; ROSE, P.; ZHANG, Y.; HOLTZMAN, M.J.; DE SCHUTTER, E.; HERZEL, H.; BORDYUGOV, G.; TAKUMI, T.; The choroid plexus is an important circadian clock component. **Nat Commun.** v.9, n.1062, p.1-13, 2018.

NILSSON, C; LINDVALL-AXELSSON, M; OWMAN, C. Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. **Brain Research.** v.17, p.109-138, 1992.

NIROGI, R; KANDIKERE, V; MUDIGONDA, K; BHYRAPUNENI, G; MUDDANA, N; SARALAYA, R; BENADE, VIJAY. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. **Journal of Neuroscience Methods.** v.178, p.116–119, 2009.

ORESKOVIC, D; RADOS, M; KLARICA, M. Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics. **Neuroscience.** v. 354, n.69-87, 2017.

OZAWA, A; LICK, A. N; LINDBERG, I. Processing of Proaugurin Is Required to Suppress Proliferation of Tumor Cell Lines. **Mol Endocrinol.** v.25, n.5, p.776–784, 2011

PALKOVITS, M. Stress-induced activation of neurons in the ventromedial arcuate nucleus: a blood-brain-CSF interface of the hypothalamus. **Ann N Y Acad Sci.** v.1148, p.57-63, 2008.

PAPEZ, J.W. Visceral brain, its component parts and their connections. **The Journal of Nervous and Mental Disease.** v.126, n.1, p. 40-56, 1958.

PAXINOS, G., WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates: Hard cover edition. Amsterdam: Elsevier, 2006.

PAXINOS, G., FRANKLIN, K. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Cambridge, MA: Academic Press, 2012.

PEDEMONTE, M.; GOLDSTEIN-DARUECH, N.; VELLUTI, R.A. Temporal correlations between heart rate, medullary units and hippocampal theta rhythm in anesthetized, sleeping and awake guinea pigs. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.** v.107, p. 99– 104, 2003.

PEDEMONTE, M.; VELLUTI, R.A.; El procesamiento sensorial podría estar organizado en el tiempo por ritmos cerebrales ultradianos. **Rev Neurol.** v.40, n.3, p.166-172, 2005.

PEROGAMVROS, L.; PARK, H.D.; BAYER, L.; PERRAULT, A.A.; BLANKE, O.; SCHWARTZ, S. Increased heartbeat-evoked potential during REM sleep in nightmare disorder. **Neuroimage Clin.** v.22, p.1-7, 2019.

PHILIPPU, A. Neurotransmitters are released in brain areas according to ultradian rhythms: Coincidence with ultradian oscillations of EEG waves. **Journal of Chemical Neuroanatomy.** v.96, p.66–72, 2019.

PODVIN, S; DANG, X; KNOWLING, S; GONZALEZ, A.M; MILLER, M; STOPA, E; JOHANSON, C; COIMBRA, R; ELICEIRI, B; BAIRD, A. Augurin production in the mammalian choroid plexus: Implications for CSF and hydrocephalus. **Cerebrospinal Fluid Research**. v.7, s.1, s.30, 2011.

PODVIN, S; MILLER, M.C; ROSSI, R; CHUKWUEKE, J; DONAHUE, J.E; JOHANSON, C.E; BAIRD, A; STOPA, E.G. The Orphan C2orf40 Gene is a Neuroimmune Factor in Alzheimer's Disease. **JSM Alzheimer's Dis Related Dementia**. v.3, n.1, p.1-9, 2016.

PORZIONATO, A; RUCINSKI, M; MACCHI, V; SARASIN, G; MALENDOWICZ, L.K; DE CARO, R. ECRG4 expression in normal rat tissues: expression study and literature review. **European Journal of Histochemistry**. v.59, n.2458, p.116-128, 2015.

QIN, X; ZHANG, P; ECRG4: a new potential target in precision medicine. **Front. Med**.v.13, p.1-7, 2018.

RAHMOUNI, K. Cardiovascular Regulation by the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus: Neurocircuitry and Signaling Systems. **Hypertension**. v.6, n.67, p.1064–1071, 2016.

RODRÍGUEZ, E. M. The cerebrospinal fluid as a pathway in neuroendocrine integration. **J. Endocr**. v.71, p.407-443, 1976.

ROUSSEAU, A; PETRÉN, S; PLANNTHIN, J; EKLUNDH, T; NORDIN, C. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of melatonin:a pilot study in healthy male volunteers. **J Neural Transm**. v.106, p.883–888, 1999.

ROWE, K.; MORENO, R.; LAU, T.R; WALLOOPILLAI, U.; NEARING, B.D.; KOCSIS, B.; QUATTROCHI, J; HOBSON, J.A.; VERRIER, R.L. Heart rate surges during REM sleep are associated with theta rhythm and PGO activity in cats. **Am. J. Physiol**. v.277, p.843–849, 1999.

SCOPINHO, A.A; ALVES, F.H.F; RESSTEL, L.B.M; CORREA, F.M.A, CRESTANI, C.C. Lateral septal area α 1- and α 2-adrenoceptors differently modulate baroreflex activity in unanaesthetized rats. **Exp Physiol**. n.97, v.9, p. 1018–1029, 2012

SHAH, A; JHAWAR, S.S; GOEL, A. Analysis of the anatomy of the Papez circuit and adjoining limbic system by fiber dissection techniques. **Journal of Clinical Neuroscience**. v. 19, p.289–298, 2012.

SISÓ, S; JEFFREY, M; GONZÁLEZ, L. Sensory circumventricular organs in health and disease. **Acta Neuropathol**. v.120, p.689–705, 2010.

SKIPOR, J; THIERY, J. The choroid plexus cerebrospinal fluid system:

Undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. **Acta Neurobiol Exp.** v.68, p. 414-428, 2008.

SNIDER, R.S.; MAITI, A. Cerebellar contributions to the Papez circuit. **Journal of Neuroscience Research.** v. 2, p.133-146, 1976.

SOLÁR, P; ZAMANI, A; KUBÍČKOVÁ, L; DUBOVÝ, P; JOUKAL, M. Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. **Fluids Barriers CNS.** v.17, n.35, p.1-29, 2020.

SONG, S.Y.; LI, Y.; ZHAI, X.M.; LI, Y.H.; BAO, C.Y.; SHAN, C.J.; HONG, J.; CAO, J.L.; ZHANG, L.C. Monosynaptic Input Mapping of Diencephalic Projections to the Cerebrospinal Fluid-Contacting Nucleus in the Rat. **Front Neuroanat.** v.14, n.7, p.1-12, 2020a.

SONG, S.Y.; LI, Y.; ZHAI, X.M.; LI, Y.H.; BAO, C.Y.; SHAN, C.J.; HONG, J.; CAO, J.L.; ZHANG, L.C. Connection Input Mapping and 3D Reconstruction of the Brainstem and Spinal Cord Projections to the CSF-Contacting Nucleus. **Front Neural Circuits.** v.14, n.11, p.1-12, 2020b.

SONG, S.Y.; ZHAI, X.M.; DAI, J.H.; LU, L.L.; SHAN, C.J.; HONG, J.; CAO, J.L.; ZHANG, L.C. Novel Projections to the Cerebrospinal Fluid-Contacting Nucleus From the Subcortex and Limbic System in Rat. **Front Neuroanat.** v.14, n. 57, p. 1-14, 2020c.

TADROSS, J.A; PATTERSON, M; SUZUKI, K; BEALE, K.E; BOUGHTON, C.K; SMITH, K.L; MOORE, S; GHATEI, M.A; BLOOM, S.R. Augurin stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenal axis via the release of corticotrophin-releasing factor in rats. **British Journal of Pharmacology.** v.159, p.1663–1671, 2010.

TORDOFF, M.G; ALARCON, L.K; LAWLER, M.P. Preferences of 14 rat strains for 17 taste compounds. **Physiology & Behavior.** v.95, p.308–332, 2008.

VINOGRADOVA, O.S. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta rhythm. **Prog. Neurobiol.** v.45, p.523–583, 1995.

XIE, Z; LI, Z; AI, J; XIE,J; ZHANG, X. C2orf40 inhibits metastasis and regulates chemo-resistance and radio-resistance of nasopharyngeal carcinoma cells by influencing cell cycle and activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **J Transl Med.** v.20, n.1:264, p.1-18, 2022.

YANG, Z; YE, X; ZHANG, Y; HUANG,Y; CHEN, J; ZENG, Y; CHEN, J. *ECRG4* acts as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma by suppressing the AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. **Cytotechnology.** v.74, n.2, p.231-243, 2022.

ZANATTO, D. A.; OLIVEIRA, J. G. M. L.; FONTES, R. S.; ONG, F. M. P.; GUIZZO, C.; ARAUJO, Y. F.; NEVES, S. M. P.; MAIORKA, P. C.; MARSON,

G. A.; MORI, C.M.C. Boas Práticas em Experimentação Animal: Procedimentos em Ratos de Laboratório. 2019. Disponível em: <<http://bpeanimal.iq.usp.br>>. Acesso em: 20/02/2020.

ZAPPATERRA, M.D; LISGO, S.N; LINDSAY, S; GYGI, S P; WALSH, C.A; BALLIF, B.A. A Comparative Proteomic Analysis of Human and Rat Embryonic Cerebrospinal Fluid. **Journal of Proteome Research**. v.6, p.3537-3548, 2007.

ZAPPATERRA, M,W; LEHTINEN, M.K.The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. **Cell. Mol. Life Sci**. v.69, p. 2863–2878, 2012.

ZHOU, R; LIU, Y; HUANG, W; DANG, X. Potential functions of esophageal cancer-related gene-4 in the cardiovascular system. **Front Med**. v.13, n.6, p.639-645, 2019.