

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
BIOTECNOLOGIA

Lucas Marmitt Dias

**Investigando o papel do hipocampo na memória através  
de quimiogenética**

Trabalho de Conclusão de Curso da graduação em Biotecnologia

Orientador: Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre, setembro de 2023

## Introdução

Por décadas, a inativação de regiões específicas do cérebro têm sido uma ferramenta importante para estudar suas funções<sup>1</sup>. Essa inativação pode ser temporária, com drogas como muscimol<sup>2, 3, 4</sup> e lidocaína<sup>5, 6</sup>, ou permanente com cirurgia<sup>7</sup>.

A importância do hipocampo na memória é conhecida desde a metade do século XX, quando foi observado que pacientes humanos com lesões no hipocampo, devido à acidente ou deliberada cirurgia, sofriam grandes efeitos de amnésia<sup>8</sup>. O famoso caso do paciente H.M., que passou por uma cirurgia experimental de remoção do hipocampo na tentativa de controlar sua epilepsia severa, mostrou que esse paciente sofria amnésia para alguns tipos de memória, mas não para outros. Por exemplo, ele era incapaz de lembrar o que havia comido apenas 30 minutos antes, mas conseguia lembrar vividamente de detalhes de sua vida de muitos anos atrás<sup>9</sup>. Esse caso extremo motivou um intenso interesse em estudar as funções do hipocampo, principalmente seu papel na formação e recordação de diferentes tipos de memória. Nas décadas seguintes, o hipocampo foi extensivamente estudado, tanto em humanos quanto em animais<sup>10</sup>. Algumas das conclusões importantes dessas décadas são que o hipocampo está envolvido em certos tipos de memória, como a memória declarativa<sup>11</sup>, e não em outros; que o hipocampo tem um papel importante na consolidação desses tipos de memória<sup>12</sup> e a ideia geral dessa memória vai ficando cada vez mais independente do hipocampo com o tempo<sup>13</sup>. Além da função na consolidação da memória, o hipocampo está envolvido na integração de vários aspectos de uma memória, armazenados em diferentes regiões<sup>14</sup> e através disso tem um importante papel na generalização de elementos de uma memória<sup>15</sup> que são aplicáveis a novas situações e de atualização da memória antiga<sup>16</sup>, incorporando conceitos de novas experiências<sup>17</sup> que sejam relevantes à experiência antiga<sup>18</sup>.

O condicionamento aversivo clássico é um modelo proeminente para investigar os processos neuronais do aprendizado e memória<sup>19, 20</sup>. No condicionamento aversivo, o rato é treinado para associar um estímulo neutro, como um tom (estímulo explícito) ou um ambiente (estímulo contextual) com algo naturalmente aversivo, como a dor de um choque elétrico nas patas. O tom, inicialmente neutro, torna-se um estímulo condicionado aversivo, relacionado ao choque e, portanto, causa uma reação comportamental de medo. No caso no rato, essa reação é conhecida como freezing, um estado de imobilidade, apenas com movimentos de respiração, normalmente observado quando o rato encontra uma ameaça imediata, como um predador<sup>21</sup>.

O estudo do papel do hipocampo na memória formada pelo condicionamento aversivo clássico sugere papéis distintos das regiões dorsal e ventral do hipocampo. A parte dorsal do hipocampo recebe mais informações derivadas dos córtices sensoriais<sup>22</sup> (com exceção do olfatório) e dos córtices entorrinal e perirrinal<sup>23</sup>, e isso parece estar relacionado funcionalmente<sup>24</sup> a aspectos espaciais e visuais de uma memória<sup>25</sup>, enquanto a parte ventral está fortemente conectada à amígdala<sup>26, 27</sup> e a outras estruturas associadas ao eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal<sup>28, 29</sup> e parece estar mais envolvida em aspectos olfatórios<sup>30</sup> e emocionais<sup>31, 32</sup> da memória.

A inativação de regiões inteiras do cérebro permite relacionar processos e comportamentos amplos a certas regiões, mas permanece a questão importante de como uma memória

específica é formada e armazenada. Estudos recentes mostram que apenas uma pequena fração de menos 5% dos neurônios do hipocampo estão ativos no momento de aquisição de uma memória aversiva<sup>33</sup> e que a sua destruição resulta em supressão da resposta de medo<sup>34</sup>, demonstrando a necessidade dessas células específicas para essa memória. Também foi demonstrado que a ativação seletiva dessas mesmas células leva à expressão da resposta de medo, mesmo sem o estímulo ou contexto, indicando sua suficiência<sup>35</sup>. Em ambos os casos, a inativação ou ativação da mesma quantidade de células aleatórias do hipocampo não levava à supressão ou indução da resposta de medo, indicando que memórias específicas estão relacionadas a populações específicas de neurônios. Essas populações de neurônios relacionados a uma certa memória foram chamadas de “engramas”<sup>36,37</sup>.

A quimiogenética é um termo geral para o uso de técnicas químicas e genéticas para modificar certas proteínas para que sejam moduladas por um fármaco específico<sup>38</sup>. No contexto da neurociência, as proteínas em questão são neuroreceptores que causem ativação ou inibição do neurônio afetado<sup>39</sup> e são conhecidas como DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs). O mais utilizado consiste em um receptor muscarínico acoplado à proteína G<sup>40</sup>, modificado para não ser mais sensível ao seu ligante original (acetilcolina) e para ser ativado por clozapina<sup>41</sup>. Dependendo do tipo de proteína G utilizada, esse sistema pode induzir um prolongado silenciamento ou ativação dos neurônios afetados<sup>42</sup>. Podemos escolher em quais neurônios o DREADD será expresso através da escolha de promotor. Um promotor como o da sinapsina humana (hSyn) afeta tanto neurônios excitatórios quanto inibitórios<sup>43</sup>; outros promotores poderiam ser usados para afetar apenas neurônios excitatórios (promotor CaMKII) ou apenas inibitórios (promotor PV). Também existem promotores dependentes de atividade neuronal, que afetariam apenas neurônios ativos em certo momento. Para afetar células específicas de um potencial engrama, podemos usar uma técnica recente chamada TRAP<sup>44</sup> (Targeted Recombination in Active Populations), que combina um promotor dependente de atividade, com o sistema de recombinase Cre-loxP<sup>45</sup> dependente de tamoxifeno. Células que estavam ativas no momento do efeito do tamoxifeno terão o cassete do DREADD modificado para a orientação correta, e partir daí terão expressão permanente. Isso permite selecionar células de um engrama<sup>46</sup>, o que não é possível com muscimol ou lidocaína.

Neste trabalho investigamos o efeito da inibição ou excitação dos neurônios do hipocampo dorsal através de DREADDs durante os experimentos comportamentais de reconhecimento de objeto e condicionamento aversivo ao tom.

## **Materiais e métodos**

### **Animais e cirurgia estereotáxica**

Ratos Wistar (350g-450g) foram anestesiados com xilasina e cetamina e submetidos a cirurgia estereotáxica. 0,5 µL de vírus (ou salina, para os controles) foram infundidos no hipocampo dorsal (coordenadas AP: -4,0mm; ML: ±3,0mm; DV: -2,6mm).

Para os experimentos de Reconhecimento de Objeto e Condicionamento Aversivo, foram utilizados 8 animais que receberam o DREADD inibitório, 8 que receberam o DREADD excitatório e 5 animais controle que receberam cirurgia, mas com apenas solução salina injetada.

Para o experimento de atividade locomotora em campo aberto, foram utilizados 5 ratos Wistar *naïve* por grupo, que não passaram por nenhum procedimento antes do teste.

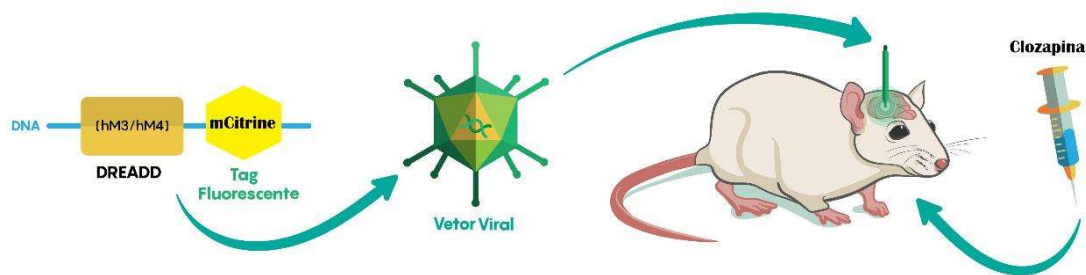


Figura 1: Ilustração do processo de quimiogenética usando vetor viral<sup>47</sup>

### Vetor viral

O vetor viral utilizado, AAV2, é derivado de um vírus Adeno-Associado<sup>48</sup> não-patogênico da família dos *Parvovirus*<sup>49</sup>, que tem um DNA de fita simples, mas com *hairpin loops*<sup>50</sup> nas duas pontas, que criam uma pequena região de fita dupla que também tem a característica de servir como seu próprio primer para replicação do genoma. Originalmente, o vírus tem 2 genes, que com *splicings* alternativos e múltiplos ORFs acabam gerando 8 produtos finais<sup>51</sup>. Um desses genes, o *VP* (também chamado de *cap*), é responsável por toda a parte estrutural do capsídeo<sup>52</sup>, e todas as funções que dependem da interação desse capsídeo com a célula hospedeira<sup>52</sup>, que definem seu o tropismo<sup>53</sup>, como interação com receptores na membrana celular para entrada na célula, capacidade de interagir com dineínas e cinesinas para chegar até o núcleo, entrada no núcleo e desempacotamento do DNA dentro do núcleo<sup>54</sup>. O segundo gene, o *Rep*, gera proteínas com característica principal de interação direta com DNA<sup>55</sup>, que são responsáveis por diversas funções relacionadas à regulação de expressão gênica<sup>56</sup>, tanto do vírus quanto de genes da célula hospedeira, e replicação do DNA viral. A replicação usa uma variante do sistema de *rolling circle replication*, muito comum em vírus, aqui chamado *rolling hairpin replication*<sup>57</sup>, que cria uma grande molécula de DNA com várias cópias do genoma viral, que são depois cortadas em genomas individuais pela *Rep* no momento de empacotar esse genoma dentro do capsídeo<sup>55</sup> – nesse momento uma única cópia da enzima *Rep* fica ligada covalentemente ao DNA viral e é empacotada dentro do capsídeo<sup>58</sup>. Para a transformação desse vírus natural em um vetor viral incapaz de formar novos vírus, ambos os genes foram removidos do genoma e em seu lugar é inserido o gene de interesse (de até 4.7kb), mantendo apenas a parte de *hairpins* nas duas pontas do genoma, que permitem a esse genoma ser seu próprio primer e replicar-se dentro do núcleo da célula hospedeira. Como na célula hospedeira não existem enzimas *Rep*, o genoma inicia o *rolling hairpin replication*, mas em vez da grande molécula geradas ser cortada em vários genomas individuais, ela forma uma molécula de DNA circular contendo centenas de cópias do gene de interesse, chamada de concatêmero<sup>59</sup>, que é responsável pela alta expressão prolongada do gene de interesse<sup>60</sup>. Como também não existe mais o gene *VP* responsável por formar novos capsídeos, não são gerados mais novos vírus, o que faz o vetor infectar a célula hospedeira e ser capaz de expressão prolongada do gene de interesse, mas incapaz de continuar se reproduzindo e infectando novas células.

No nosso caso, o gene de interesse é todo o cassete de quimiogenética descrito a seguir.

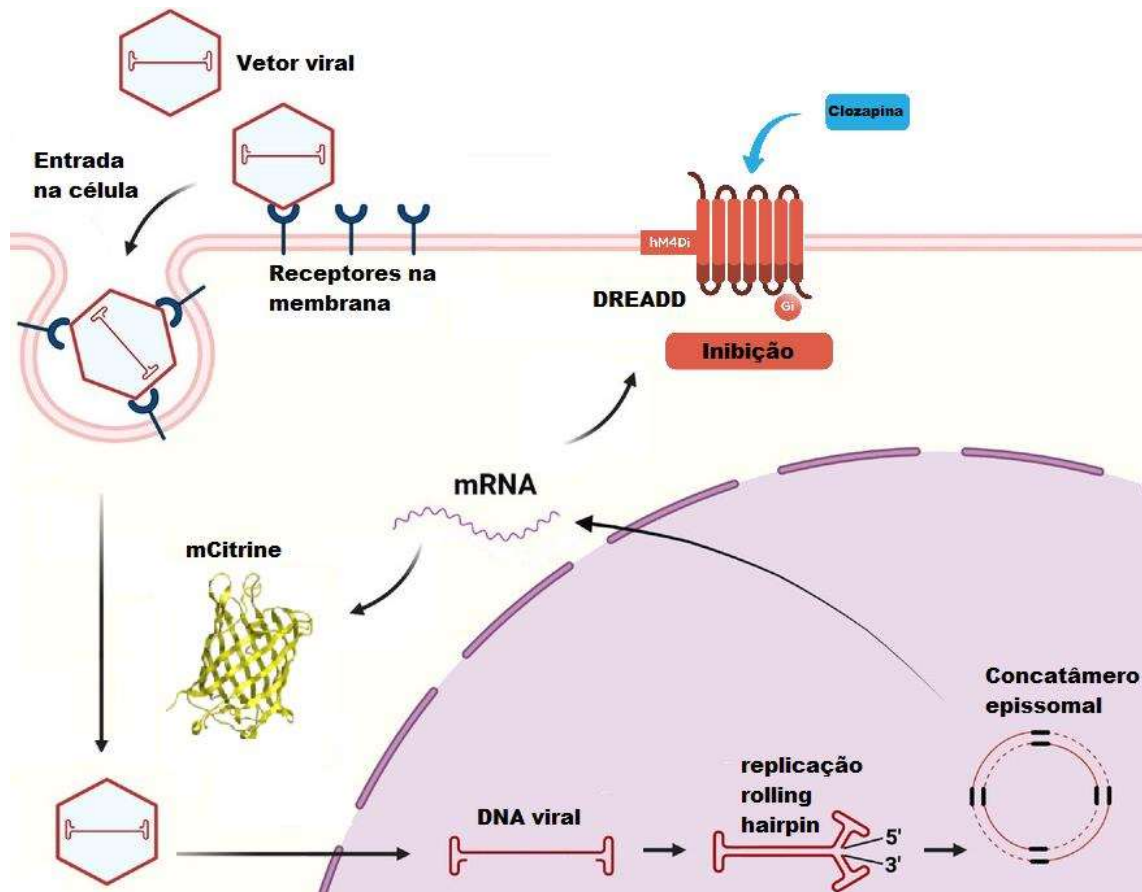


Figura 2: Ilustração do processo de transdução, expressão e ativação do DREADD<sup>61</sup>

### Quimiogenética

DREADD excitatório: AAV2-hSyn-HA-hM3D(Gq)-IRES-mCitrine

DREADD inibitório: AAV2-hSyn-HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrine

Utilizamos uma ferramenta chamada de DREADD<sup>40</sup> que consiste em um neuro receptor muscarínico, modificado para ser ativado por clozapina<sup>41</sup> ao invés do ligante original acetilcolina, acoplado a uma proteína G que é responsável por seu efeito: dependendo da proteína G utilizada podemos ter um efeito excitatório no neurônio (Gq)<sup>62 63</sup> ou inibitório (Gi)<sup>64</sup>.

O promotor utilizado é o da sinapsina humana (hSyn), que é um promotor de expressão forte em neurônios, tanto excitatórios quanto inibitórios, mas sem expressão em astrócitos<sup>65</sup>. Outros elementos do construto utilizado são dois tipos diferentes de repórteres: um gene de proteína fluorescente mCitrine, que é uma variante da GFP modificada para ter uma emissão mais para o lado amarelo do espectro<sup>66</sup> (15nm de diferença entre os picos de emissão de mCitrine e GFP), e hemaglutinina (HA), que é usada como um antígeno para imuno-histoquímica. A mCitrine é precedida por um elemento IRES<sup>67</sup>, que permite ao ribossomo iniciar a tradução diretamente por esse elemento IRES em vez de pela ponta do mRNA<sup>68</sup>, o que faz a mCitrine ser produzida como uma proteína separada, não fundida fisicamente ao DREADD (o que poderia alterar sua função<sup>69</sup>), mas sua presença indica que o DREADD foi pelo menos transcrito, já que os dois partem do mesmo mRNA. Já o elemento HA está sim fundido ao DREADD na parte C-terminal do receptor muscarínico<sup>70</sup>, que fica para dentro da célula<sup>71</sup>, e pode ser usado para determinar sua presença e localização por imuno-histoquímica<sup>69</sup>.

Para ativação dos DREADDs, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 0.5mg/kg de clozapina (ou veículo: 20% DMSO, 80% salina), 1 hora antes do experimento comportamental. A clozapina é um fármaco antipsicótico muito utilizado na psiquiatria, que tem efeitos em um grande número de neuro receptores. O DREADD tem uma afinidade pela clozapina muito maior que a dos receptores endógenos<sup>72</sup>, então é necessário usar uma dose de clozapina que possa ativar suficientemente o DREADD, mas não grande o suficiente para causar efeitos colaterais através da ativação de outros receptores. Por isso, fizemos um experimento piloto usando uma dose de 1mg/kg de clozapina no experimento de atividade locomotora, que é o experimento comportamental onde o efeito da clozapina é mais evidente e seria o primeiro efeito a ser notado em doses baixas. Também incluímos no experimento principal um grupo controle sem DREADD, mas com clozapina, para garantir que o efeito observado é de fato causado pelo DREADD e não um efeito colateral da clozapina.

## **Experimentos comportamentais**

### **Atividade locomotora em campo aberto**

Para avaliar possíveis efeitos colaterais da clozapina, animais naïve foram utilizados. Os animais foram habituados à arena por 10 minutos, um dia antes do teste. Um grupo recebeu 1mg/kg de clozapina i.p. e o grupo controle recebeu o mesmo volume de veículo i.p., 30 minutos antes do teste.

Os animais foram colocados na arena por 5 minutos e sua atividade locomotora medida pelo número de quadrantes percorridos nesse tempo.

### **Reconhecimento de Objeto**

Os animais foram habituados à uma arena do teste em duas sessões de 10 minutos em dias consecutivos. A arena consiste em uma caixa de madeira escura, 60cm x 60 cm x 60cm, com diferentes padrões em cada parede para permitir aos animais diferenciar as 4 paredes.

No terceiro dia, dia do treino, foram colocados na mesma arena, agora com 2 objetos idênticos, e deixados 10 minutos para explorar os objetos.

No quarto dia, dia do teste, um dos objetos foi substituído por um novo objeto e os animais foram colocados por 5 minutos na arena de teste para explorar livremente os objetos.

Os primeiros 30 segundos de exploração ativa (não contando o tempo em que o animal não estava explorando nenhum dos objetos) foram contados e a porcentagem de tempo explorando o objeto novo foram calculados para cada animal. Consideramos exploração quando o animal estava cheirando o objeto ou tocando com suas vibrissas.

A diferença entre os grupos foi calculada utilizando ANOVA.

### **Condicionamento aversivo ao tom.**

Duas sessões de habituação de 10 minutos cada no contexto B

3 choques de 0,5mA, 3 tons de 30 segundos no contexto A

Extinção: 24 tons de 30 segundos com 1 minuto de intervalo entre um tom e outro, contexto B.

Clozapina i.p. injetada 1 hora antes nos grupos Controle e Dredd inibitório.

Renewal. 3 tons de 30 segundos com 1 minuto de intervalo entre tons. Contexto A.

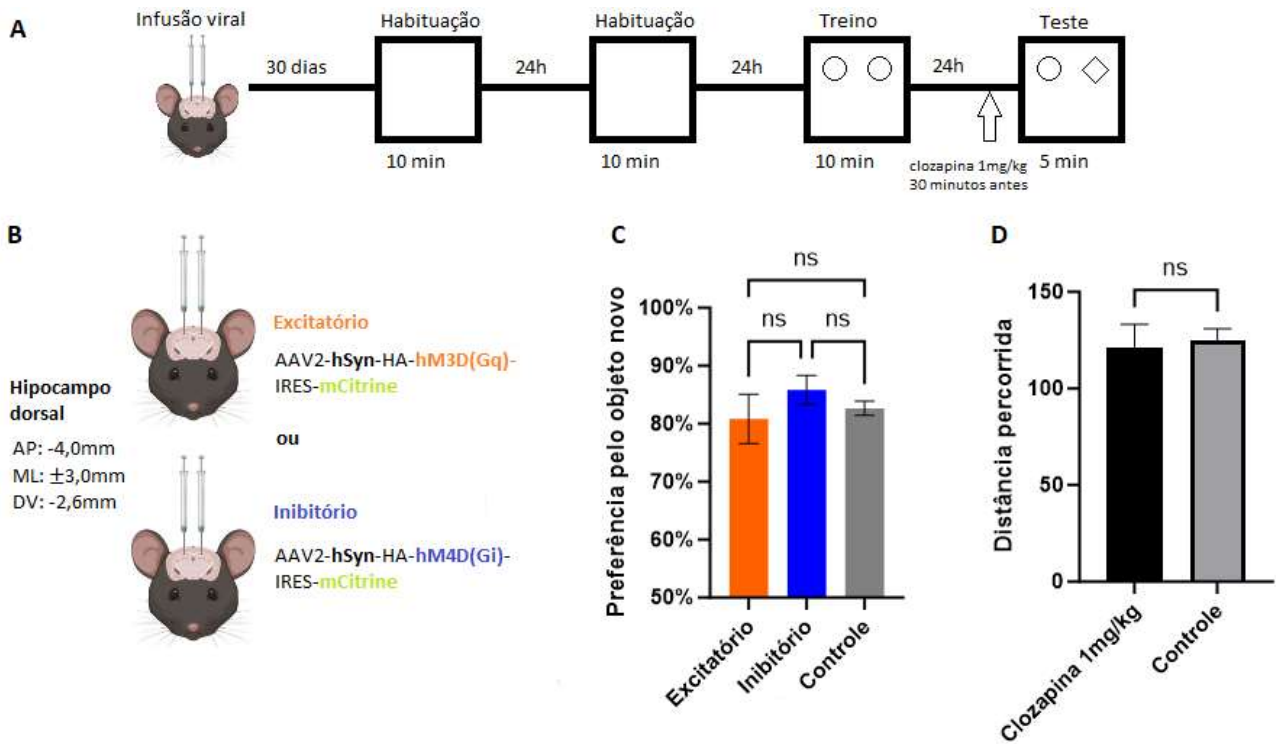
Reteste. 3 tons de 30 segundos com 1 minuto de intervalo entre tons. Contexto B.

### **Perfusão transcárdíaca**

Os animais receberam uma injeção de 1mg/kg de clozapina para ativação dos DREADDS, entre

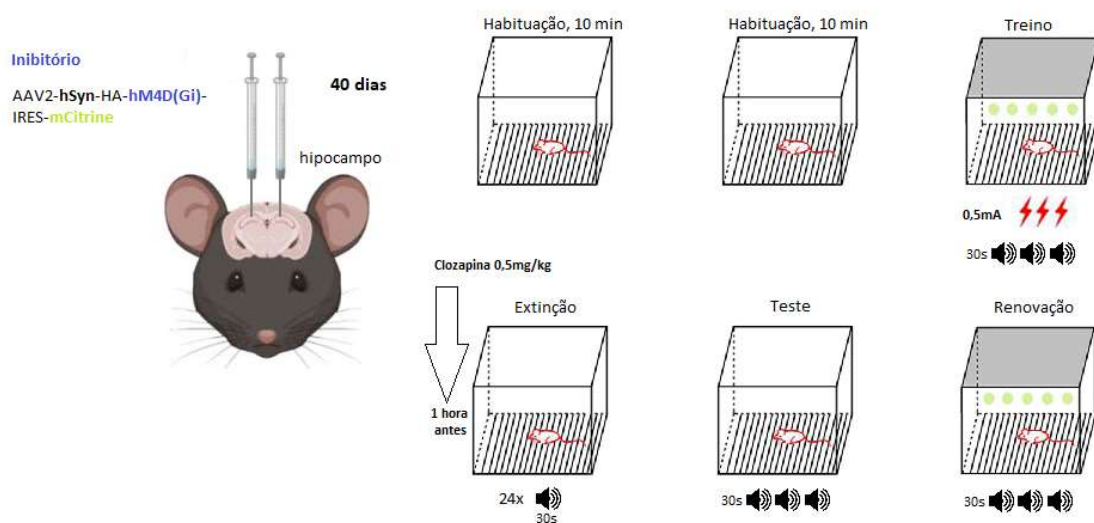
1 e 4 horas antes da perfusão transcardíaca com 300ml de PBS seguido de 300mL de paraformaldeído 4%.

Os encéfalos foram removidos e guardados em uma solução de PFA 4% por 24 horas.



**Figura 3.** A) Protocolo de Reconhecimento de Objeto. B) Coordenadas e vírus utilizados nas cirurgias.<sup>lxiii</sup>[1]

Em C e D, um resultado foi considerado estatisticamente não significativo quando  $p > 0.05$ . Colunas representam as médias dos grupos e as barras representam o erro padrão da média. C) Resultado do Reconhecimento de Objeto. D) Resultado da atividade locomotora em campo aberto. A distância percorrida está representada como a quantidade de seções de 15cm da arena de teste percorridas durante 5 minutos. Teste t de Student, não pareado, bicaudal.



**Figura 4.** Protocolo de condicionamento aversivo ao tom. Um grupo recebeu DREADD inibitório e clozapina; um grupo controle recebeu DREADD, mas sem clozapina; um segundo grupo controle recebeu clozapina, mas sem DREADD.

### **Microscopia de fluorescência**

Para crioproteção, os encéfalos foram colocados em uma solução tamponada de 15% sacarose por 24 horas, e então em uma solução de 30% sacarose. Em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido e cortados com um criostato em fatias coronais de 30  $\mu$ M.

Para visualizar a fluorescência do repórter mCitrine, as amostras foram visualizadas em um microscópio confocal, excitadas com luz de comprimento de onda 468nm e observada a fluorescência no comprimento de onda 525nm.

## **Resultados**

### **Efeito da clozapina na atividade locomotora**

Médias dos grupos clozapina 1mg/kg e controle foram, respectivamente, 121,4 e 125. Não houve diferença significativa ( $p=0.7925$ ) entre a atividade locomotora de ratos injetados com 1mg/kg de clozapina ou o mesmo volume de veículo. Como a diminuição da atividade locomotora é o efeito comportamental da clozapina mais notável em ratos, isso indica que as doses de clozapina utilizadas para a ativação dos DREADDs não são altas o suficiente para causar efeitos colaterais.

### **Reconhecimento de Objeto**

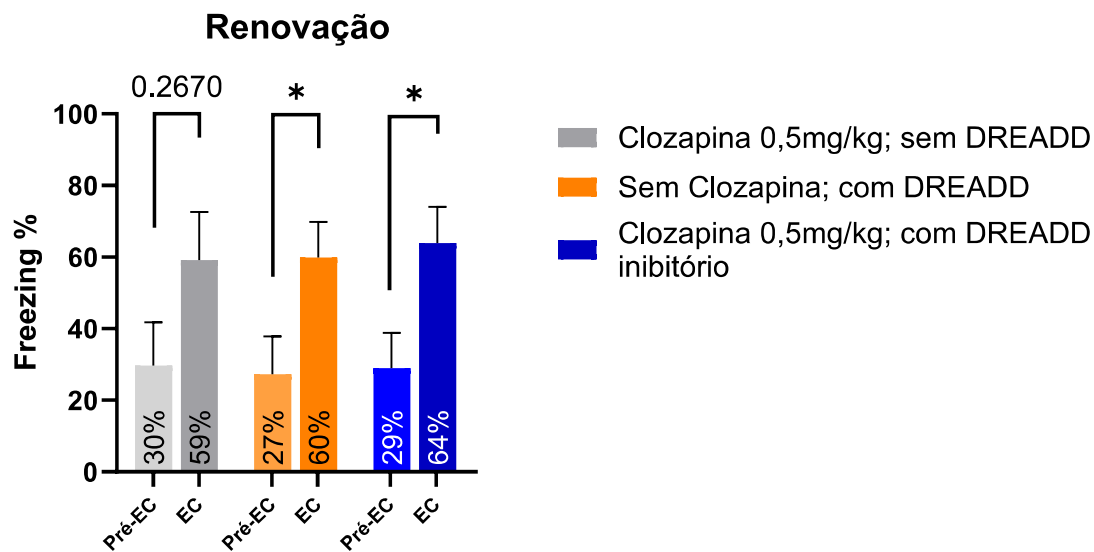
Médias dos grupos Excitatório, Inibitório e Controle foram, respectivamente, 80,8%, 85,8% e 82,7%. Não houve diferença significativa de preferência pelo objeto novo entre os três grupos de animais (Inibitório vs Excitatório  $p= 0,5058$ . Inibitório vs Controle  $p= 0,8055$ . Excitatório vs Controle  $p= 0,9295$ )

Apesar de a preferência pelo objeto novo não poder ser atribuída com certeza à memória, seria esperado encontrar alguma diferença entre os grupos controle e DREADDs se o protocolo de inibição/excitação do hipocampo fosse bem sucedido.

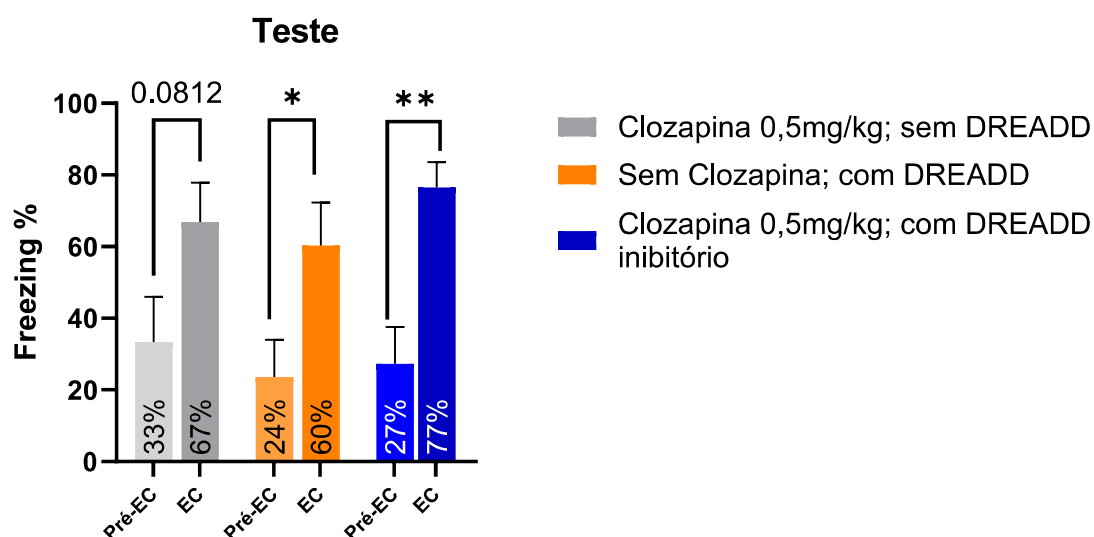
### **Condicionamento aversivo ao tom**

O resultado da comparação entre os valores de freezing o pré-EC no Teste e na Renovação indicam que não houve nenhum efeito dos tratamentos com DREADD inibitório ativado por clozapina, nem efeitos colaterais da clozapina em si, nem efeitos colaterais do processo de infecção pelo vírus e expressão do DREADD. Também não houve diferença entre o freezing provocado pelo Estímulo Condicionado em um contexto ou em outro.





**Figura 5.** Renovação. Pré-EC: Freezing antes do tom (pré estímulo condicionado). EC: Freezing durante o tom. Teste t bicaudal não-pareado. \*:  $p < 0.05$



**Figura 6.** Teste do condicionamento aversivo. Pré-EC: Freezing antes do tom. EC: Freezing durante o tom. Teste t bicaudal não pareado. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## Discussão

Por algum motivo, a extinção falhou em todos os 3 grupos. Esse motivo não pode ter sido os DREADDs, nem a clozapina, porque estavam presentes apenas em 2 dos 3 grupos, mas algo sistemático que tenha afetado igualmente animais de todos os grupos.

Houve diferença significativa entre o freezing antes ou durante o tom nos grupos DREADD+clozapina e no controle DREADD sem clozapina. No grupo controle que recebeu cirurgia sham foi observada uma tendência ( $p = 0.08$ ) na mesma direção durante o Teste. Isso é explicado em parte pelo fato de terem sobrevivido apenas 5 dos 8 animais originalmente desse grupo.

Isso indica que os animais de todos os 3 grupos continuaram a relacionar o tom ao choque, em ambos Teste e Renovação, mesmo depois do processo de extinção.

A hipótese dependia da inativação do hipocampo durante a extinção, mas a extinção não funcionou em nenhum grupo. Também queríamos ver a influência dessa inativação quando o animal estava em contextos distintos: o do choque ou outro da habituação e teste. Mas nenhum grupo apresentou diferença significativa de freezing relacionada ao contexto.

Não podemos dizer com certeza se a inativação do hipocampo foi bem-sucedida ou não apenas com esse resultado comportamental.

### Próximos passos

Para descobrir se a ativação ou inibição do hipocampo foi bem-sucedida ou não, faremos imuno-histoquímica de cFos.

Para descobrir se houve expressão dos DREADDs, faremos microscopia de fluorescência em andamento. Imunohistoquímica de HA (hemaglutinina), antígeno repórter do construto viral do DREADD, também seria uma possibilidade.

Caso não haja fluorescência, faremos PCR para distinguir entre falha na infusão do vírus ou baixa expressão.

---

### Referências

<sup>1</sup> Ambrogio Lorenzini et al. 1999; *Neural Topography and Chronology of Memory Consolidation: A Review of Functional Inactivation Findings*

<sup>2</sup> Majchrzak and Scala 2000; *GABA and Muscimol as Reversible Inactivation Tools in Learning and Memory*

<sup>3</sup> Allen et al. 2008; *Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol*

<sup>4</sup> Muller et al. 1997, *Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli.*

<sup>5</sup> Vasconcelos et al. 2006; *Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: A comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat*

<sup>6</sup> Packard and McGaugh 1996; *Inactivation of Hippocampus or Caudate Nucleus with Lidocaine Differentially Affects Expression of Place and Response Learning*

<sup>7</sup> Dave Mumbly 2001; *Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats*

<sup>8</sup> Scoville & Milner 1957; *Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions*

<sup>9</sup> Milner & Corkin 1968. *Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of H.M.*

<sup>10</sup> Bannerman et al. 2004; *Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety*

<sup>11</sup> Larry Squire 1992; *Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans*

<sup>12</sup> James McGaugh 2000; *Memory—a Century of Consolidation*

<sup>13</sup> Zola-Morgan et al. 1990; *The primate hippocampal formation: Evidence for a time-limited role in memory storage*

<sup>14</sup> Cohen 1993; *Memory, Amnesia, and the Hippocampal System*

<sup>15</sup> H. Eichenbaum 2017; *Memory: organization and control*

<sup>16</sup> Bunsen & Eichenbaum 1996; *Conservation of hippocampal memory function in rats and humans*

<sup>17</sup> A.R. Preston, et al. 2004; *Hippocampal contribution to the novel use of relational information in declarative memory*

<sup>18</sup> D. Zeithamova, et al. 2012; *Hippocampal and ventral medial prefrontal activation during retrieval-mediated learning supports novel inference*

<sup>19</sup> Fendt & Fanselow 1999; *The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear*

- 
- <sup>20</sup> J.E. LeDoux 1996; *The Emotional Brain: The Mysterious Underpinnings of Emotional Life*
- <sup>21</sup> Blanchard & Blanchard 1976; *Defensive reactions in the albino rat*
- <sup>22</sup> D.G. Amaral & M.P. Witter 1995; *Hippocampal formation*
- <sup>23</sup> R.D. Burwell & D.G. Amaral 1998; *Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex*
- <sup>24</sup> M.B. Moser & E.I. Moser 1998; *Functional differentiation in the hippocampus*
- <sup>25</sup> Bannerman et al. 2004; *Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety*
- <sup>26</sup> P.G. Henke 1990; *Hippocampal pathway to the amygdala and the stress ulcer development*
- <sup>27</sup> Petrovich et al. 2001; *Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems*
- <sup>28</sup> L. Jacobsen & R. Sapolsky 1991; *The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary–adrenocortical axis*
- <sup>29</sup> M.P. Witter 1986; *A survey of the anatomy of the hippocampal formation, with emphasis on the septotemporal organization of its intrinsic and extrinsic connections*
- <sup>30</sup> Bunsey & Eichenbaum 1995; *Selective damage to the hippocampal region blocks long term retention of a natural and nonspatial stimulus–stimulus association*
- <sup>31</sup> Treit et al. 1993; *Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdala lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety*
- <sup>32</sup> Kjelstrup et al. 2002; *Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus*
- <sup>33</sup> Josselyn et al. 2010 *Continuing the search for the engram: examining the mechanism of fear memories.*
- <sup>34</sup> Han et al. 2009; *Selective Erasure of a Fear Memory*
- <sup>35</sup> Liu et al. 2012; *Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall*
- <sup>36</sup> Hübener and Bonhoeffer 2010 *Searching for Engrams*
- <sup>37</sup> Tonegawa et al, 2015; *Memory engram storage and retrieval.*
- <sup>38</sup> Scott Strobel 1999 *Ribozyme chemogenetics*
- <sup>39</sup> Zhu and Roth 2014 *DREADD: A Chemogenetic GPCR Signaling Platform*
- <sup>40</sup> Urban and Roth 2015; *DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility*
- <sup>41</sup> Gomez et al. 2017; *Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine*
- <sup>42</sup> Bryan Roth 2016; *DREADDs for neuroscientists*
- <sup>43</sup> Bian et al. 2019 *Anterior Cingulate Cortex to Ventral Hippocampus Circuit Mediates Contextual Fear Generalization*
- <sup>44</sup> Guenther et al. 2013; *Permanent Genetic Access to Transiently Active Neurons via TRAP: Targeted Recombination in Active Populations*
- <sup>45</sup> Kim et al 2018; *Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes*
- <sup>46</sup> Roy et al. 2022; *Brain-wide mapping reveals that engrams for a single memory are distributed across multiple brain regions*
- <sup>47</sup> Imaem adaptada de William Ju; *Chemogenetic Methods to Examine the Brain and Behaviour*
- <sup>48</sup> Atchison et al. 1965; *Adenovirus-Associated Defective Virus Particles*
- <sup>49</sup> Berns 1990; *Parvovirus replication*
- <sup>50</sup> Snyder & Moullier 2011; *Adeno-associated virus: Methods and Protocols*
- <sup>51</sup> Meier et al 2020; *The Interplay between Adeno-Associated Virus and Its Helper Viruses*
- <sup>52</sup> Agbandje-McKenna et al. 2011; *AAV capsid structure and cell interactions.*
- <sup>53</sup> Duong et al. 2018; *Comparative AAV-eGFP Transgene Expression Using Vector Serotypes 1–9, 7m8, and 8b in Human Pluripotent Stem Cells, RPEs, and Human and Rat Cortical Neurons*
- <sup>54</sup> Sen, D. 2014; *Improving clinical efficacy of adeno associated vectors by rational capsid bioengineering*
- <sup>55</sup> Smith et al. 1998; *The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV ori sequences*
- <sup>56</sup> Kotterman & Schaffer 2014; *Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy*
- <sup>57</sup> Cotmore et al. 2005; *A rolling-hairpin strategy: basic mechanisms of DNA replication in the parvoviruses*
- <sup>58</sup> Cotmore & Tattersall 2006; *Structure and organization of the viral genome*
- <sup>59</sup> Nakai et al. 2003a. *Free DNA ends are essential for concatemerization of synthetic double-stranded adeno-associated virus vector genomes transfected into mouse hepatocytes in vivo*
- <sup>60</sup> Rabinowitz & Samulski 1998; *Adeno-associated virus expression systems for gene transfer*

- 
- <sup>61</sup> Imagem adaptada de Bellova et al. 2022; *Organoid transduction using recombinant adeno-associated viral vectors Challenges and opportunities*
- <sup>62</sup> Lee et al. 2004; *Dopamine D1 and D2 receptor coactivation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal.*
- <sup>63</sup> Rashid et al. 2007; *Neuronal Gq/11-coupled dopamine receptors: an uncharted role for dopamine*
- <sup>64</sup> Durkee et al. 2019; *Gi/o protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission*
- <sup>65</sup> Shevtsova et al. 2004; *Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo*
- <sup>66</sup> Zacharias et al. 2002; *Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells*
- <sup>67</sup> Vagner et al. 2001; *Irresistible IRES: Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites*
- <sup>68</sup> Martinez-Salas et al. 2018; *Insights into Structural and Mechanistic Features of Viral IRES Elements*
- <sup>69</sup> Galvan et al. 2019 *Ultrastructural localization of DREADDs in monkeys*
- <sup>70</sup> Budd et al. 2003; *The C-terminal Tail of the M3-muscarinic Receptor Possesses Anti-apoptotic Properties*
- <sup>71</sup> Thibeault & Ramachandran 2020; *Role of the Helix-8 and C-Terminal Tail in Regulating Proteinase Activated Receptor 2 Signaling*
- <sup>72</sup> Jendryka et al. 2019; *Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice*
- <sup>lxxiii</sup> Figura do rato adaptada a partir de: Metto et al 2022; *Magnetogenetic closed-loop reduction of seizure activity in a rat model of epilepsy*