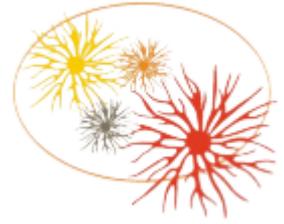




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG



PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Neurogênese hipocampal e separação de padrões:

uma meta análise de estudos comportamentais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Discente: Thiago F. A. França

Orientador: Professor Dr. José Maria Monserrat

Coorientadora: Professora Dra. Daniela Martí Barros

Rio Grande, 08 de Fevereiro de 2017

We are drowning in information and starving for knowledge.

– Rutherford D. Roger

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família: minha companheira, Naiana Maximilla, e meu filho, Liam Maximilla França, além de meus pais, Ayres e Rubia França, meus irmãos, Thalles e Thais França, e meus sogros, Paulo Sérgio Maximilla e Bárbara Lúcerio. Todos eles foram, cada qual à sua maneira, essenciais para que eu pudesse progredir (em todos os aspectos) nesses dois anos de mestrado.

Agradeço aos meus amigos, Alexandre Bittencourt, Matheus Bandeira e Lennon Brongar, que também compartilharam das alegrias e dos sofrimentos dessa jornada.

Agradeço também ao meu orientador, José Maria Monserrat, que me deu a liberdade e o suporte necessários para seguir meus interesses científicos, e a minha coorientadora, Daniela Barros, que aceitou participar dessa empreitada conosco.

1	Sumário	
2		
3	Resumo geral	6
4	Introdução geral	7
5	O trabalho em contexto: teoria, experimento e ciência	7
6	Neurogênese	10
7	Aspectos gerais da formação hipocampal	11
8	Separação de padrões	14
9	Aspectos anatômicos e funcionais da neurogênese no giro dentado	15
10	Objetivos	20
11	Em busca de dados: o método de revisão sistemática	20
12	Síntese quantitativa: os métodos de meta análise	22
13	Avaliando a qualidade da meta análise	26
14		
15	Manuscrito	29
16	Title page	30
17	Abstract	31
18	1.Introduction	31
19	2.Methods	33
20	Systematic literature search	33
21	Inclusion criteria	34
22	Study selection	35
23	Data extraction	35
24	Quality assessment	36
25	Meta-analysis	36

26	Publication bias	37
27	3.Results	38
28	Characteristics of included studies	39
29	Study quality	41
30	Effect of HN ablation on pattern separation	42
31	4.Discussion	44
32	The outliers	44
33	The consistent results	46
34	From behavior to cognition and problem of memory	47
35	From cognition to neurons and networks: finding a unifying hypothesis	48
36	Testing the hypothesis	51
37	5.Concluding remarks	52
38	References	53
39	Figures and Tables	57
40	Supplementary information	69
41		
42	Discussão geral	88
43	Os resultados em contexto: holismo x reducionismo	88
44	De moléculas a células: as bases bioquímicas e biofísicas dos neurônios	
45	imatuross	90
46	De neurônios a redes neurais: neurônios imatuross no circuito hipocampal ..	90
47	Neurogênese, comportamento e problemas de interpretação	92
48	Interlúdio: como funciona a formação hipocampal?	95
49	Processos computacionais na formação hipocampal	96
50	Combinando comportamento e fisiologia	97

51	Um teste para a hipótese	99
52	Conclusão e perspectivas	102
53	Bibliografia geral	103
54	Apêndice	109
55		

56 **Resumo geral**

57 Neurogênese hipocampal é o processo pelo qual novos neurônios são gerados no hipocampo de
58 mamíferos adultos. Esses novos neurônios passam por um processo de maturação durante o
59 qual se tornam funcionalmente integrados ao circuito hipocampal. Apesar do grande número de
60 estudos a respeito da neurogênese hipocampal, o papel funcional desse fenômeno ainda não foi
61 totalmente elucidado. Uma das hipóteses mais aceitas atualmente é de que a neurogênese
62 hipocampal contribui para a separação de padrões, um processo pelo qual estímulos similares
63 são transformados em representações neurais distintas, evitando interferência na formação e
64 recuperação de memórias. As principais evidências para essa hipótese vêm de estudos
65 comportamentais nos quais se realiza a ablação da neurogênese hipocampal em animais, os
66 quais são então submetidos a testes comportamentais de separação de padrões. Alguns desses
67 estudos comportamentais, porém, apresentam resultados que vão contra a hipótese de separação
68 de padrões, de modo que a validade da mesma permanece motivo de debate. O objetivo desta
69 dissertação foi revisar todos os estudos comportamentais disponíveis a respeito do papel da
70 neurogênese na separação de padrões e realizar uma síntese quantitativa dos resultados desses
71 estudos, de modo a ganhar uma visão mais ampla a respeito do efeito da neurogênese no
72 comportamento dos animais. Para tanto, foi realizada uma revisão sistemática da literatura para
73 encontrar todos os estudos disponíveis. Em seguida, os resultados dos estudos encontrados
74 foram combinados usando métodos de meta análise, um conjunto de métodos estatísticos que
75 permitem a análise combinada dos resultados de diferentes estudos. Os resultados indicaram
76 que, a despeito da presença de alguns resultados controversos, a literatura como um todo aponta
77 para um efeito da neurogênese em comportamentos dependentes de separação de padrões.
78 Esses resultados são discutidos dentro de um contexto mais amplo envolvendo as
79 manifestações da neurogênese hipocampal em diferentes níveis de organização biológica. Por
80 fim, é proposta uma hipótese a respeito do mecanismo pelo qual a neurogênese afeta o

81 comportamento dos animais baseado na combinação de duas das hipóteses atualmente
82 discutidas na literatura, sendo também sugerido um teste para essa nova hipótese.

83 **Palavras-chave:** Neurogênese adulta, formação hipocampal, giro dentado, separação de
84 padrões comportamental, revisão sistemática.

85

86 **Introdução**

87 **O trabalho em contexto: teoria, experimento e ciência**

88 O que é ciência? Por muitos anos filósofos tem debatido a respeito da natureza da
89 ciência. Ao longo da história, diferentes filósofos propuseram diferentes definições de ciência
90 (Okasha, 2002). Algumas foram acusadas de serem muito exclusivas, enquanto outras sofreram
91 a crítica oposta: foram julgadas amplas demais. As definições mais amplas, porém, fornecem
92 um bom ponto de partida para essa introdução, pois elas captam apenas a essência do que é
93 ciência, o aspecto fundamental que está presente em todas as áreas da ciência. Uma dessas
94 definições ressalta essa essência de maneira bastante sucinta: ciência é a tentativa de entender
95 a natureza por meio da combinação de raciocínio e observação/experimentação (Russell, 1961).
96 De maneira complementar, nas palavras do físico Carl Sagan, "a ciência é mais uma forma de
97 pensar do que um corpo de conhecimento". Mas afinal, o que é essa forma de pensar? Como os
98 cientistas usam a razão, observação e experimentação para entender a natureza?

99 Ao longo da história da ciência, cientistas fizeram uso de uma variedade de métodos
100 para compreender a natureza. A estrutura geral dessa empreitada, porém, permaneceu
101 relativamente constante ao longo dos séculos (Bynum, 2012). A abordagem científica para o
102 estudo da natureza consiste na observação dos fenômenos naturais seguida de uma alternância

103 entre experimento e teoria para compreender e explicar tais fenômenos (Feynman *et al.*, 1964).
104 A etapa experimental requer o uso de raciocínio e criatividade na tarefa de desenvolver técnicas
105 e desenhar experimentos para testar hipóteses sobre os fenômenos observados, levantando
106 novas hipóteses com base nos seus resultados. A etapa teórica parte dos resultados das
107 observações e do trabalho experimental, sintetizando os dados oriundos de diferentes
108 experimentos, procurando por padrões para estender e combinar as hipóteses originais e gerar
109 hipóteses mais abrangentes, por vezes convertendo tais hipóteses em modelos formais para
110 inferir suas consequências por meio de dedução matemática ou inferência probabilística. A
111 próxima etapa experimental completa o ciclo da abordagem científica, usando os modelos
112 teóricos e suas previsões para desenhar novos experimentos. Como mencionado acima, em
113 muitas áreas da ciência, o processo de combinação dos resultados e geração de hipóteses é
114 suplementado por métodos matemáticos tanto para combinar os dados, quanto para formalizar
115 as hipóteses, gerando previsões que podem ser testadas de maneira mais eficiente que as
116 previsões oriundas de métodos não formais, pois apresentam maior rigor e especificidade em
117 relação aos resultados experimentais esperados (Cohen, 2004; Phillips, 2015).

118 A constância da abordagem científica ao longo da história não implica em uma rigidez
119 nos métodos de investigação da natureza, muito pelo contrário. Assim como a unidade
120 bioquímica coexiste com a diversidade biológica, a constância da abordagem científica coexiste
121 com uma enorme diversidade de técnicas e desenhos experimentais, além de uma enorme
122 diversidade de abordagens teóricas para análise de resultados e desenvolvimento de hipóteses.
123 De fato, ao longo do tempo, os avanços no conhecimento e na tecnologia levaram a um enorme
124 aumento no número de técnicas tanto teóricas quanto experimentais, além de um concomitante
125 aumento na complexidade dessas técnicas. Como preço do progresso, tornou-se cada vez mais
126 difícil para um único indivíduo dominar ambas as técnicas (experimentais e teóricas) em
127 qualquer área do conhecimento. Felizmente, a ciência não é uma empreitada individual, mas

128 sim um esforço coletivo. Assim, o que aconteceu em muitas áreas (mais notavelmente na física)
129 foi uma divisão de trabalho entre teóricos e experimentalistas. Nenhum dos dois grupos é capaz
130 de avançar a ciência por si só, pois teoria sem experimento é uma pergunta sem resposta e
131 experimento sem teoria é informação sem conhecimento. Juntos, porém, teóricos e
132 experimentalistas conseguem resultados extraordinários. Como abelhas em uma colmeia, as
133 pequenas contribuições de cada indivíduo se somam para gerar algo muito maior do que
134 qualquer trabalho individual.

135 O campo da biologia possui em sua história alguns exemplos notáveis de combinações
136 bem sucedidas entre observações, abordagens experimentais e abordagens teóricas. Esses
137 exemplos incluem a teoria celular e a teoria da evolução por seleção natural. Modelos formais
138 também tiveram aplicações muito bem sucedidas, como a formulação do modelo de Hodgkin-
139 Huxley para explicar o funcionamento dos potenciais de ação em neurônios (Hodkin & Huxley,
140 1990), as equações de Lotka-Volterra usadas para entender a interação entre predadores e
141 presas em ecologia (Wangersky, 1978), a simples análise matemática realizada por William
142 Harvey (Bynum, 2012) para demonstrar que o coração, e não o fígado, era o responsável pela
143 circulação do sangue, ou ainda a formulação da lei da conservação da energia por Hermann von
144 Helmholtz a partir de dados de experimentos sobre metabolismo muscular (Hoffmann, 2012).

145 A aplicação de qualquer abordagem teórica, porém, deve começar com a análise dos
146 dados disponíveis. Essa tarefa pode ser extremamente complicada atualmente devido ao
147 enorme volume de dados disponíveis para grande parte dos tópicos de pesquisa. Além disso,
148 muitas vezes esses dados são inconsistentes entre si, ou até completamente contraditórios.
149 Logo, o primeiro passo para transformar dados experimentais em hipóteses abrangentes e
150 testáveis sobre um fenômeno é sintetizar os dados disponíveis e tentar encontrar os fatores que
151 estão causando as inconsistências nos mesmos. O objetivo do presente trabalho é dar esse

152 primeiro passo com a questão do papel funcional da neurogênese no hipocampo, a qual
153 discutiremos a seguir.

154 **Neurogênese**

155 Em 1963, Joseph Altman demonstrou pela primeira vez a ocorrência de neurogênese
156 (*i.e.*, a geração de novos neurônios) no cérebro de mamíferos adultos (Altman *et al.*, 1963).
157 Altman usou um método de marcação baseado na incorporação de timidina radioativa ao DNA
158 de células em divisão, demonstrando a existência de um sítio proliferativo no giro dentado da
159 formação hipocampal de ratos e gatos. O trabalho de Altman, hoje considerado um marco, foi
160 recebido com intenso ceticismo (Colucci-D'amato *et al.*, 2006). Apesar de serem conhecidos na
161 época exemplos de neurogênese adulta em outros vertebrados, o que prevalecia era uma visão
162 dogmática de que tal fenômeno não ocorria em mamíferos, uma visão fortalecida pelo apoio de
163 gigantes como Santiago Ramón y Cajal (Ramon y Cajal, 1914). Com o passar dos anos, porém,
164 evidências a favor da neurogênese adulta em diferentes espécies de mamíferos foram se
165 acumulando, levando à ampla aceitação da neurogênese adulta pela comunidade científica na
166 década de 1990 (Colucci-D'amato *et al.*, 2006).

167 Conforme a neurogênese adulta foi sendo caracterizada nas diferentes espécies de
168 vertebrados, percebeu-se que esse fenômeno ocorre de maneira bem mais restrita em
169 mamíferos quando comparado a outros grupos (Barker *et al.*, 2011). Peixes e anfíbios, por
170 exemplo, possuem diversas regiões proliferativas espalhadas pelo cérebro, e a neurogênese
171 adulta nesses animais parece ter função regenerativa, o que não é o caso com a neurogênese
172 adulta em mamíferos. Apesar de haverem relatos sobre neurogênese em regiões variadas no
173 cérebro de mamíferos, tais como o neocórtex, o hipotálamo e o septo, esse processo só parece
174 ocorrer em números expressivos em duas regiões no cérebro desses animais: na zona
175 subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e na zona subgranulosa (ZSG) do giro dentado na

176 formação hipocampal (Molina-Navarro & Garcia-Verdugo, 2016). Os neurônios gerados na
177 ZSV migram quase que exclusivamente para o bulbo olfatório, enquanto que os neurônios
178 produzidos na ZSG migram alguns poucos micrômetros para integrar o circuito do giro
179 dentado.

180 O foco deste trabalho é, especificamente, a neurogênese na formação hipocampal. A
181 neurogênese hipocampal (NH), como é comumente chamada, tem sido objeto de intensa
182 pesquisa devido à reconhecida importância da formação hipocampal nos processos de formação
183 de memórias, especialmente as memórias episódicas (Lazarov & Hollands, 2016). Portanto,
184 antes de tentar entender o papel da NH, é necessário revisar os aspectos gerais da formação
185 hipocampal.

186 **Aspectos gerais da formação hipocampal**

187 A formação hipocampal (FH) é uma estrutura situada no lobo temporal médio, se
188 posiciona logo abaixo do neocórtex e apresenta um formato similar a uma castanha de caju
189 (Knierim, 2015). A FH é dividida em subestruturas (**Figura 1**), dentre as quais estão o giro
190 dentado (GD) e as regiões *cornu Ammonis* (CA) 1 a 3, possuindo também importantes
191 estruturas anexas, tal como o córtex entorrinal (CE) (Amaral & Lavenex, 2007).

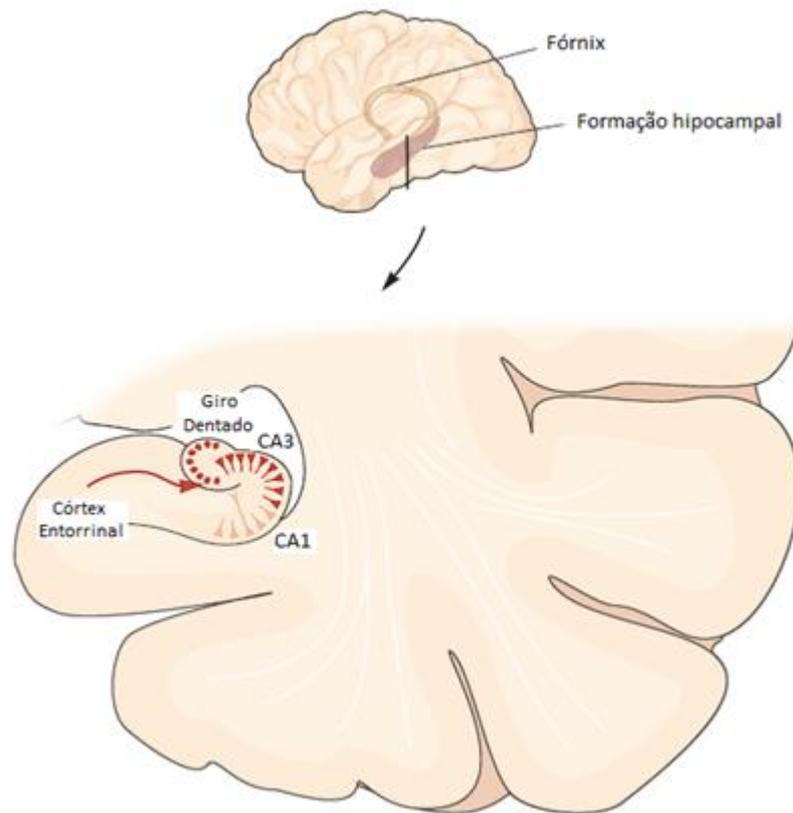
192

193

194

195

196



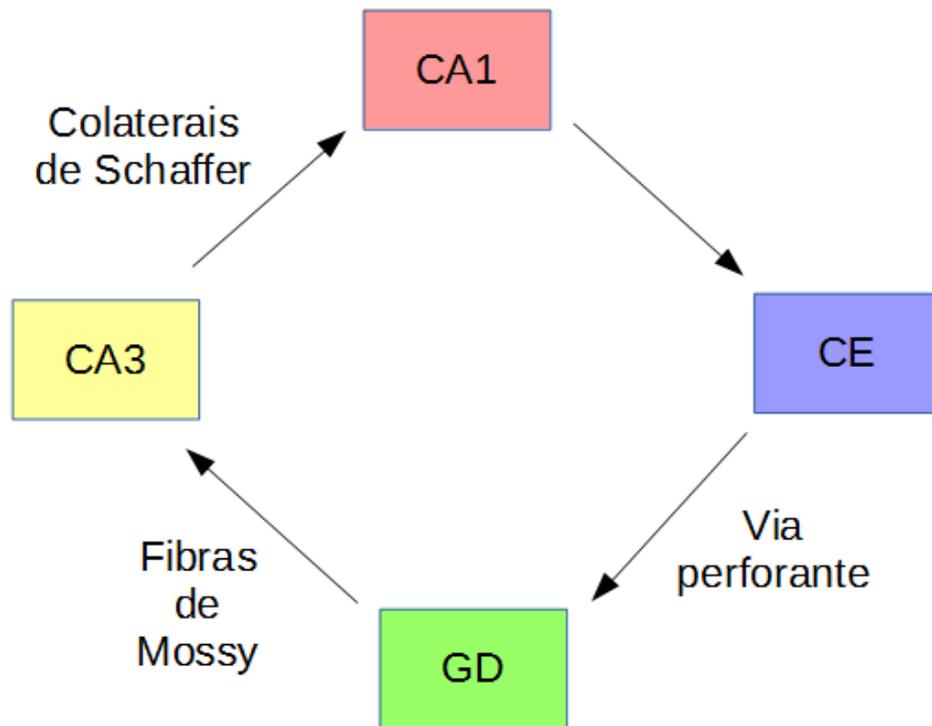
197

198 **Figura 1.** Estrutura geral da FH. Adaptado de Kandel *et al.*, 2012.

199

200 Uma das características marcantes da FH é o seu padrão geral de conectividade,
201 conhecido como *loop* trissináptico (**Figura 2**); (Knierim, 2015). Esse *loop* é formado pelo CE,
202 GD e regiões CA. Os neurônios do CE enviam seus axônios pela chamada via perforante e
203 terminam em conexões sinápticas com as células granulosas, o principal tipo neuronal do GD.
204 As células granulosas enviam axônios por meio das fibras de Mossy para neurônios na região
205 CA3, a qual é a região CA fisicamente mais próxima ao GD. Os neurônios da região CA3, por
206 sua vez, projetam seus axônios para a região CA1 (via CA2) por meio da via colateral de
207 Schaffer, além de formar inúmeras sinapses entre si. Por fim, os neurônios da região CA1
208 projetam seus axônios para o CE, completando assim o chamado loop trissináptico (Amaral &
209 Lavenex, 2007; Knierim, 2015). É importante ressaltar que o padrão de conexão apresentando
210 aqui é uma simplificação, pois o verdadeiro conectoma é muito mais complexo, envolvendo

211 não apenas outras conexões entre sub-regiões da FH como também conexões com outras áreas
212 do cérebro.



213

214 **Figura 2.** Esquema ilustrativo do *loop* trissináptico. GD: giro dentado; CE: córtex entorrinal.

215

216 Acredita-se que o sítio para o armazenamento de memórias na FH seja a região CA3. A
217 estrutura da CA3, com inúmeras sinapses excitatórias entre os neurônios principais (i.e.,
218 conexões recorrentes), permitiria que os diferentes aspectos contextuais da memória sendo
219 formada fossem representados pela ativação conjunta de uma subpopulação de células dessa
220 região (Marr, 1971). As conexões recorrentes dessas células seriam então fortalecidas por
221 plasticidade Hebbiana, um processo pelo qual neurônios que disparam potenciais de ação
222 juntos tem suas sinapses mútuas fortalecidas. Desse modo, a subsequente ativação de parte das
223 células da subpopulação em questão seria suficiente para reativar toda a subpopulação referente

224 à memória que foi armazenada. Esse modelo de funcionamento é conhecido como dinâmica do
225 atrator e permitiria a recordação da memória com base na apresentação incompleta do estímulo
226 original (Seung & Yuste, 2013)

227 **Separação de padrões**

228 Uma das limitações de redes neurais que armazenam memórias com base em dinâmica
229 do atrator é o risco de interferência. Visto que as memórias sendo armazenadas são
230 representadas por conjuntos de células e que a ativação de parte do conjunto leva a reencenação
231 da atividade original, a existência de duas memórias representadas por populações de células
232 parcialmente sobrepostas geraria interferência na recuperação de qualquer uma das memórias
233 com base em informações incompletas (Hvovslef-Eide & Oomen, 2016). Trabalhos com
234 modelos computacionais da FH demonstraram a necessidade de um dispositivo de “separação
235 de padrões” de modo a evitar a interferência no armazenamento de memórias similares (Gilbert
236 *et al.*, 1998). O objetivo da separação de padrões seria tornar distintos padrões de atividade
237 neural similares, gerando representações com menor sobreposição que poderiam ser
238 armazenadas sem interferência (Seung & Yuste, 2013). A nível comportamental a separação de
239 padrões está relacionada à capacidade do animal de discriminar, a partir da memória, contextos
240 espaciais similares. Diferentes testes comportamentais foram usados para avaliar tais
241 comportamentos, focando na capacidade dos animais de discriminar contextos espaciais
242 similares com base na memória de exposições prévias. Os testes comportamentais mais
243 utilizados para esse fim são a discriminação de medo contextual e o teste de localização no
244 labirinto de braços radiais (no inglês, *delayed non matching to place in the radial arms maze*,
245 ou DNMTTP). O teste de discriminação de medo contextual consiste em expor os animais dois
246 contextos similares. No primeiro contexto o animal recebe um choque elétrico nas patas após
247 um determinado intervalo de tempo. No segundo contexto nada acontece ao animal. Realizando

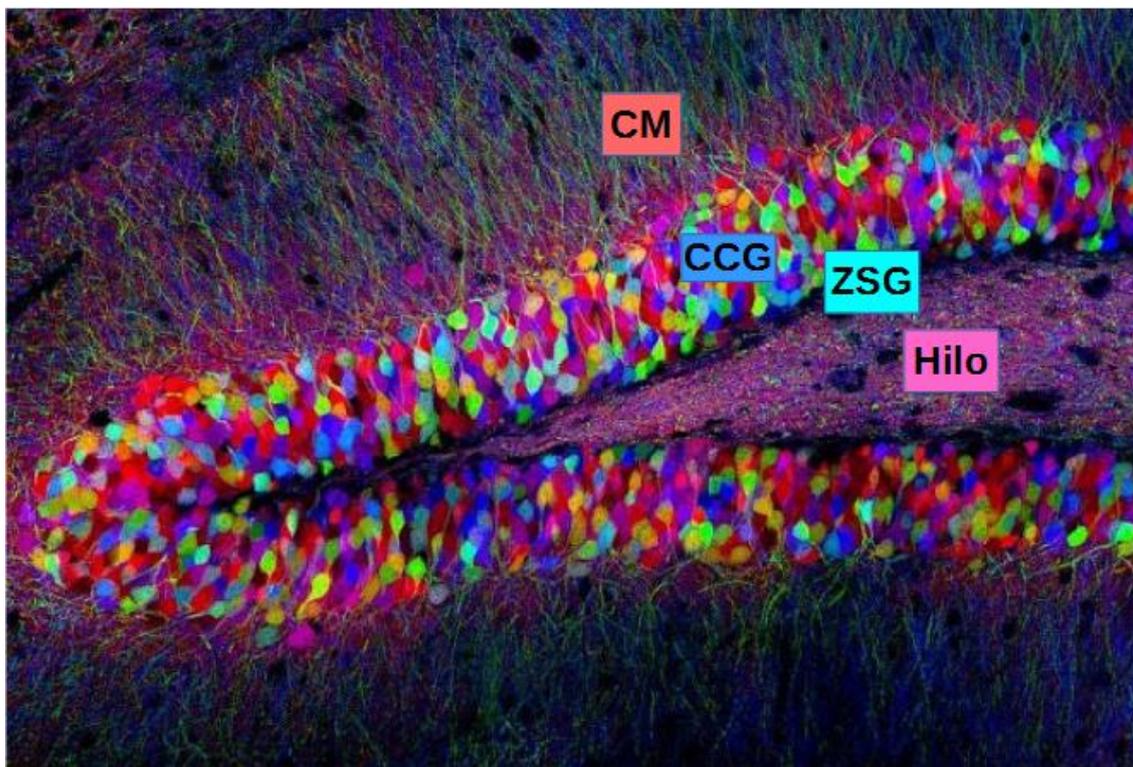
248 reexposições alternadas é possível avaliar a resposta comportamental de medo do animal (ficar
249 imóvel) nos dois contextos, sendo possível avaliar se o animal é capaz de diferenciar entre os
250 contextos com e sem choque elétrico (Sahay *et al.*, 2011). Já no teste DNMTTP, a animal é
251 colocado um dos braços de um labirinto de braços radiais com apenas mais um braço do
252 labirinto aberto (além daquele no qual o animal se encontra). É permitido ao animal explorar
253 esse outro braço aberto, ele encontra uma recompensa (geralmente algum alimento). Após obter
254 a recompensa o animal é retirado do labirinto para ser recolocado no mesmo após um intervalo
255 de tempo. Na segunda exposição, porém, o animal encontra mais um braço do labirinto aberto,
256 adjacente àquele que o animal explorou anteriormente. O objetivo aqui é entrar no braço que
257 não foi explorado na exposição anterior. Isso exige que o animal seja capaz de comparar os
258 dois contextos aos quais foi exposto, o que por sua vez requer que ambos sejam representados
259 sem interferência (Clelland *et al.*, 2009).

260 A combinação de modelos computacionais com evidências anatômicas e fisiológicas
261 levou à ideia de que esse processo de separação de padrões era realizado pelo GD (Wiskott *et*
262 *al.*, 2006). O GD está situado entre o CE e a região CA3, possui um número de neurônios muito
263 maior do que essas duas regiões e apresenta um padrão de atividade extremamente esparsa –
264 exatamente as características esperadas de um dispositivo de separação de padrões (Deng *et al.*,
265 2010). Além disso, a hipótese do GD como separador de padrões recebeu suporte experimental
266 de estudos com animais. Roedores submetidos a lesões no GD apresentaram um desempenho
267 inferior ao grupo controle em testes comportamentais de separação de padrões como aqueles
268 descritos acima (Gilbert *et al.*, 2001).

269 **Aspectos anatômicos e funcionais da neurogênese no giro dentado**

270 O GD é classicamente dividido em três regiões: (i) a camada molecular, onde estão os
271 dendritos das células granulosas e os terminais axonais da via perforante, além dos corpos

272 celulares de interneurônios GABAérgicos; (ii) a camada de células granulosas, contendo os
273 corpos celulares das células que conferem seu nome; e (iii) o hilo, onde residem os corpos
274 celulares de diversos interneurônios e por onde passam as fibras de Mossy (Drew *et al.*, 2016a);
275 (Figura 3).



276
277 **Figura 3.** Imagem de microscopia do giro dentado de camundongos transgênicos *Brainbow*
278 (Lichtman *et al.*, 2008). CM: camada molecular; CCG: camada de células granulosas; ZSG:
279 zona subgranulosa. Imagem adaptada de J. Lichtman, disponível em
280 <http://cbs.fas.harvard.edu/science/connectome-project/brainbow>.

281
282 Entre a camada de células granulosas e o hilo está a ZSG, onde se situam as células
283 progenitoras neurais. Os neurônios gerados nessa região migram para a camada de células
284 granulosas, onde passam por um processo de maturação. Esse processo de maturação possui
285 duração variável dependendo da espécie animal (*e.g.*, cerca de oito semanas em camundongos,
286 seis semanas em ratos); (Cameron, 2009; Molina-Navarro & Garcia-Verdugo, 2016). Durante a

287 maturação, os novos neurônios estabelecem as suas conexões sinápticas; para tanto, eles
288 competem com os neurônios antigos pelas sinapses com o CE e com os neurônios na região
289 CA3. A maioria dos neurônios nascidos no animal adulto (entre 80-90% na maioria das
290 espécies animais analisadas) morre durante o processo de maturação; os que sobrevivem
291 passam a integrar o circuito hipocampal (Lie & Jessberger, 2016). Ao término do processo de
292 maturação, os neurônios nascidos no animal adulto tornam-se indistintos daqueles nascidos
293 durante o desenvolvimento embrionário. Acredita-se que seja durante uma janela de tempo
294 específica durante o período de maturação que os novos neurônios realizam suas contribuições
295 para o funcionamento do GD. Isso por que, durante um determinado período da maturação, os
296 novos neurônios já apresentam sinapses funcionais, porém possuem propriedades diferentes
297 daquelas encontradas nos neurônios maduros: eles possuem maior excitabilidade, resistência à
298 inibição e disparam potenciais de ação em um campo espacial mais amplo (Sahay *et al.*,
299 2011b).

300 Considerando o fato de que os neurônios gerados na ZSG são integrados ao GD, foi
301 sugerida a hipótese de que o papel da neurogênese no hipocampo de mamíferos adultos era de
302 auxiliar a separação de padrões pelo GD (Clelland *et al.*, 2009). Existem diferentes hipóteses a
303 respeito do mecanismo pela qual novos neurônios poderiam afetar o GD (revisado em Aimone,
304 2016), porém é possível classificar a maioria dessas hipóteses em duas categorias amplas: as
305 hipóteses diretas e as hipóteses indiretas. As hipóteses diretas sugerem que os novos neurônios
306 contribuem para o funcionamento do GD como unidades computacionais autônomas, i.e., eles
307 contribuem codificando informação diretamente e de maneira distinta devido às suas
308 propriedades especiais. Já as hipóteses indiretas sugerem que os novos neurônios contribuem
309 para o funcionamento do GD modulando a atividade da rede neural, em especial tornando a
310 atividade do GD mais esparsa por meio da ativação de circuitos inibitórios do GD, uma
311 característica crucial para a função do GD como separador de padrões. O que ambas as

312 hipóteses tem em comum é que elas fazem a mesma previsão: reduções nos níveis de NH
313 levariam a um pior desempenho dos animais em testes comportamentais de separação de
314 padrões.

315 Diversos estudos empíricos foram conduzidos visando avaliar a previsão feita pelas
316 hipóteses discutidas acima. A estrutura geral desses estudos consiste na ablação total ou parcial
317 da neurogênese no animal adulto por meio de diferentes métodos. Em seguida, os animais são
318 submetidos a testes comportamentais para inferir se houve prejuízo à capacidade de separação
319 de padrões pelo GD (Vadodaria & Jassberger, 2014). Os primeiros estudos com essa
320 abordagem deram suporte à hipótese de um papel da neurogênese hipocampal na separação de
321 padrões (Clelland *et al.*, 2009; Sahay *et al.*, 2011a), e tal hipótese ganhou considerável
322 aceitação entre os pesquisadores da área (Sahay *et al.*, 2011b). Alguns estudos, porém, sugerem
323 que a neurogênese não desempenha nenhum papel no processo de separação de padrões
324 (Groves *et al.*, 2013), levantando dúvidas a respeito da hipótese mencionada acima. Além
325 disso, mesmo entre os estudos cujos resultados suportam a mesma hipótese, a avaliação da
326 consistência nos resultados é dificultada pela ênfase posta nos p-valores (Nuzzo, 2014).

327 O p-valor representa a probabilidade de obter um resultado tão ou mais extremo do que
328 o obtido pelo estudo, assumindo que a hipótese nula esteja correta e que as amostras retiradas
329 da população se comportem de acordo o modelo estatístico especificado (na maioria dos casos,
330 assume-se que, devido ao erro amostral aleatório, as amostras seguem uma distribuição normal
331 ao redor do parâmetro estimado); (Nuzzo, 2014). O p-valor foi criado por Ronald Fisher, cuja
332 ideia era usá-lo como para auxiliar na decisão entre diferentes hipóteses. Na visão de Fischer,
333 porém, o p-valor não era a palavra final, mas sim uma evidência a ser considerada, juntamente
334 com outros fatores, durante o processo de tomada de decisão (Biau *et al.*, 2010). Nessa
335 abordagem não há uma grande distinção entre um p-valor de 0.049 e um p-valor de 0.051, pois

336 o p-valor seria uma medida contínua da força da evidência contra a hipótese nula. Apesar disso,
337 o p-valor é usado atualmente seguindo a abordagem de teste de hipóteses proposta por Jerzy
338 Neyman e Egon Pearson (Neyman e Pearson, 1933). Esses autores argumentam que nenhum
339 teste baseado na teoria das probabilidades é capaz de fornecer alguma informação valiosa a
340 respeito da verdade ou falsidade de qualquer hipótese. Logo, o objetivo da abordagem desses
341 autores não é decidir corretamente entre as hipóteses analisadas em cada estudo, mas sim
342 garantir que, a longo prazo, será tomada a decisão certa na maioria das vezes. Isso contrasta
343 com o objetivo da abordagem de Fisher, o qual, nas palavras do próprio Fisher, é “avançar o
344 conhecimento natural” (Fisher, 1956, pp.7). Porém, acontece que o nível de significância
345 usualmente adotado na abordagem de Neyman e Pearson (isto é, o valor aceitável para a
346 probabilidade de rejeitar erroneamente a hipótese nula) coincide com o p-valor de 0.05. Foi
347 assim que o p-valor acabou sendo incorporado ao teste de hipóteses de Neyman e Pearson e
348 passou a ser usado como a palavra final para a rejeição ou não da hipótese nula. De fato, a
349 abordagem filosófica de Neyman e Pearson possui um impacto tão forte que, na maioria das
350 vezes, estudos nem sequer relatam o p-valor exato, informando-se apenas se o mesmo é maior
351 ou menor que 0.05. O problema desse foco excessivo nos p-valores é que isso leva os
352 pesquisadores a ignorar outros aspectos importantes dos resultados, como a intensidade do
353 efeito observado (Borenstein, 2009). Por exemplo, um p-valor de 0.05 pode estar refletindo
354 tanto um efeito enorme estimado com pouca precisão quanto um efeito insignificante estimado
355 com muita precisão.

356 O problema dos p-valores discutido acima gera dificuldades ao avaliar a consistência da
357 literatura com base em p-valores, já que p-valores iguais não implicam, necessariamente,
358 efeitos iguais. De fato, no caso da avaliação do efeito da neurogênese no comportamento, seria
359 esperado que os diferentes estudos diferissem nos efeitos observados, dadas as várias
360 diferenças entre eles, tais como o sexo e a idade dos animais, a espécie e a cepa dos animais, os

361 métodos de ablação e os tipos de teste comportamental de separação de padrões, dentre
362 outros. Tais incertezas a respeito do real efeito da NH no comportamento dificultam o avanço
363 conceitual a respeito do papel funcional NH e dos seus mecanismos.

364 **Objetivos**

365 Para transformar os dados disponíveis em hipóteses abrangentes a respeito do papel
366 funcional da neurogênese hipocampal é necessário sintetizar os dados dos diferentes estudos,
367 avaliar a consistência entre eles e procurar fontes de heterogeneidade e padrões que expliquem
368 quaisquer inconsistências na literatura. Assim, o objetivo desse trabalho é encontrar todos os
369 estudos comportamentais disponíveis avaliando o efeito da ablação da NH no processo de
370 separação de padrões e, em seguida, combinar essas informações de forma quantitativa, usando
371 medidas mais informativas que os p-valores dos testes estatísticos de estudos isolados. Para
372 tanto, serão usados os métodos de revisão sistemática e meta análise, os quais serão discutidos
373 a seguir.

374 **Em busca de dados: o método de revisão sistemática**

375 O primeiro passo para analisar os dados disponíveis é encontrar os estudos relevantes
376 em meio aos milhões de estudos disponíveis na literatura científica. Para isso é usado o método
377 de revisão sistemática (Leenaars et al., 2012). O método consiste em quatro passos principais.
378 Primeiramente, é necessário formular uma questão de pesquisa. No presente trabalho, essa
379 questão foi: “*Qual a influência da neurogênese no hipocampo de adultos nos comportamentos*
380 *dependentes de separação de padrões espaciais em modelos animais?*”. O passo seguinte é
381 encontrar as bases de dados relevantes ao tópico de pesquisa; neste trabalho foram escolhidas
382 as bases PubMed, Scopus, Web of Science e Science Direct. Em seguida, é necessário
383 transformar a questão de pesquisa em uma estratégia de busca para cada uma das bases de

384 dados. Para tanto, a questão de pesquisa é dividida em componentes e os termos de busca
385 relativos a esses componentes são usados para construir uma linha de busca, observando a
386 sintaxe usada em cada base de dados. A questão de busca neste trabalho foi dividida em dois
387 componentes: (1) neurogênese no giro dentado do hipocampo, (2) comportamentos
388 dependentes de separação de padrões espaciais. Além disso, foram adicionados mais dois
389 componentes relativos às características dos estudos procurados: (3) modelo animal (apenas
390 para PubMed) e (4) artigos de pesquisa originais. Após a seleção de termos relevantes a cada
391 um desses componentes foram montadas as linhas de busca. Para ilustrar, segue um exemplo de
392 linha de busca (usada para a base de dados Web of Science):

393 *(Neurogenesis OR "New neurons" OR adult born neurons OR adult neurogenesis OR*
394 *hippocampal neurogenesis OR adult born granule cells OR adult born dentate granule cells)*
395 *AND (Neurogenesis OR "New neurons" OR adult born neurons OR adult neurogenesis OR*
396 *hippocampal neurogenesis OR adult born granule cells OR adult born dentate granule cells*
397 *OR Hippocamp* OR Hippocampus OR "Hippocampal formation" OR Dentate gyrus) AND*
398 *(Behavior OR Behaviour OR Behavi* OR "Pattern separation" OR Pattern discrimination OR*
399 *"Spatial discrimination" OR "spatial behavior" OR "spatial behaviour" OR "Spatial*
400 *Learning" OR "Spatial memory" OR "discrimination learning") NOT Review.*

401 O passo final da revisão sistemática consiste em analisar os resultados obtidos em todas
402 as bases de dados procurando por trabalhos relevantes à questão de estudo. A seleção de
403 trabalhos é feita com base em critérios de inclusão definidos de acordo com o objetivo da
404 busca. No caso deste trabalho foram usados critérios como “*ser artigo de pesquisa original*”,
405 “*avaliar o efeito da ablação da neurogênese em testes comportamentais de separação de*
406 *padrões*” e “*realizar estudo in vivo com mamíferos juvenis/adultos saudáveis*”. A seleção de
407 estudos é feita em três partes: primeiro pela leitura dos títulos dos trabalhos, depois pela leitura

408 dos resumos dos trabalhos aprovados pelo título e finalmente pela leitura do texto completo dos
409 trabalhos aprovados pelo resumo. Os dados dos estudos relevantes encontrados por meio do
410 método de revisão sistemática são então usados para a síntese quantitativa por meta análise.

411

412 **Síntese quantitativa: os métodos de meta análise**

413 A meta análise consiste em um conjunto de métodos estatísticos usados para realizar a
414 síntese quantitativa dos resultados de diferentes estudos (Vesterinen et al., 2014). De maneira
415 simplificada, a meta análise consiste em converter os dados dos diferentes estudos em uma
416 mesma métrica e em seguida combinar esses resultados para obter uma estimativa geral do
417 efeito estimado pelos estudos individuais.

418 Os resultados obtidos a partir da meta análise possuem uma interpretação que varia de
419 acordo com o modelo utilizado para a análise. Existem dois tipos de modelo: o modelo de
420 efeitos fixos e o modelo de efeitos aleatórios (Borenstein, 2009). O modelo de efeitos fixos
421 assume que todos os estudos na meta análise estão estimando o mesmo efeito, com suas
422 amostras pertencendo à mesma população. Na maioria das situações esse não é um pressuposto
423 muito realista. Portanto, no presente trabalho, foi usado o modelo de efeitos aleatórios. Esse
424 modelo assume que os diferentes trabalhos sendo combinados não estimam exatamente o
425 mesmo efeito real (i.e., o efeito real da ablação da NH varia de um estudo para o outro). Esse é
426 um pressuposto bastante lógico, devido à presença de fatores que podem influenciar o efeito da
427 NH (como o sexo e a idade dos animais) que variam de um estudo para o outro, de modo que
428 os diferentes estudos estão avaliando populações diferentes (o quão diferentes é uma questão
429 que será avaliada adiante na análise). De acordo com o modelo, o valor do efeito obtido em
430 cada estudo é uma amostra aleatória proveniente de uma distribuição de valores. Essa

431 distribuição possui dois parâmetros importantes: uma média, a qual é a média populacional, e
432 um desvio padrão, o qual reflete a variabilidade real da população. Esses parâmetros são
433 estimados, respectivamente, pela média da amostra analisada no estudo e pelo erro padrão da
434 distribuição de amostras estimado no estudo. O efeito real dos diferentes artigos, por sua vez,
435 vem de uma segunda distribuição cuja média é a média de todos os efeitos reais nas diferentes
436 populações e o desvio padrão é τ (a letra grega “tau”), o qual reflete o grau de heterogeneidade
437 entre os resultados dos diferentes estudos. Discutiremos agora os aspectos gerais de uma meta
438 análise. Uma descrição dos cálculos realizados ao longo da meta análise é fornecida no
439 **Apêndice.**

440 Visto que o objetivo da meta análise é combinar os resultados de diferentes estudos, é
441 necessário que os estudos analisados apresentem medidas que sejam comparáveis entre si. Se
442 os efeitos relatados por diferentes estudos estiverem baseados em medidas ou escalas distintas,
443 será impossível comparar os resultados, visto que não haverá uma relação linear entre os
444 valores numéricos relatados pelos diferentes estudos (ou seja, números maiores não implicarão
445 efeitos maiores). Logo, primeiro passo para realizar a análise é encontrar uma medida para a
446 intensidade do efeito observado em cada estudo que seja comparável entre os diferentes
447 estudos. Para o presente trabalho, a estatística adotada foi escolhida considerando que
448 diferentes estudos fizeram uso de diferentes testes comportamentais usados para avaliar
449 separação de padrões e que os diferentes testes comportamentais utilizam diferentes medidas de
450 desempenho. Portanto, a estatística escolhida para a combinação dos dados foi a diferença de
451 médias padronizada. Apesar de existirem diferentes fórmulas usadas para calcular a diferença
452 de médias padronizada, o g de Hedges é o mais recomendado para estudos com pequeno
453 tamanho amostral, o qual é comum em estudos com animais (Vesterinen *et al.*, 2014). O g de
454 Hedges consiste na diferença entre as médias do grupo experimental e do grupo controle
455 relativizada pelo desvio padrão combinado dos grupos. A transformação dos resultados dos

456 diferentes estudos em valores do g de Hedges converte todos os resultados para uma mesma
457 métrica, com a intensidade dos efeitos observados sendo quantificada em número de desvios
458 padrões.

459 O passo seguinte na meta análise é combinar os valores do g de Hedges dos diferentes
460 estudos e estimar o efeito combinado e sua variância. Para tanto, foi usado o método da
461 variância inversa, o qual consiste em calcular uma média ponderada dos efeitos observados em
462 cada estudo, com o peso atribuído a cada estudo sendo inversamente proporcional à variância
463 do mesmo (Borenstein, 2009). O mesmo método é usado tanto com o modelo de efeitos fixos
464 quanto com o modelo de efeitos aleatórios. A diferença nas duas situações está na forma como
465 os pesos são atribuídos aos diferentes estudos. Enquanto que no modelo de efeitos fixos o peso
466 de cada estudo é simplesmente o inverso da sua variância, no modelo de efeitos aleatórios o
467 peso é a soma do inverso da variância e do inverso do τ^2 (a variância entre os diferentes
468 estudos). Visto que o valor do τ^2 é o mesmo para todos os estudos, o efeito dessa mudança nos
469 cálculos é uma redução na diferença de peso entre os diferentes estudos. Esse é um ponto
470 importante, pois no modelo de efeitos aleatórios assume-se que diferentes estudos fornecem
471 informação a respeito de diferentes populações, de modo que não seria interessante que uma
472 parte dos estudos tivesse um peso muito maior no efeito final. Por outro lado, também não seria
473 interessante que todos os estudos tivessem o mesmo peso, pois a precisão de cada estudo é
474 inversamente proporcional à sua variância, de modo que estudos com menor variância
475 contribuem com informações mais precisas a respeito das suas respectivas populações e,
476 portanto, essas informações devem ter mais peso no resultado final.

477 O primeiro passo para realizar uma meta análise de efeitos aleatórios é combinar os
478 resultados dos diferentes estudos assumindo que os resultados de todos os estudos são oriundos
479 de uma mesma população (i.e., usando o modelo de efeitos fixos). Parte dos resultados dessa

480 análise é usada para realizar os cálculos relativos ao teste de heterogeneidade, de modo a
481 avaliar se a variação entre os resultados dos diferentes estudos é maior do que se esperaria ao
482 acaso. O passo seguinte é usar parte dos resultados obtidos até então para estimar o τ^2 . Tendo
483 em mãos a estimativa do τ^2 é possível então refazer a análise com o método de variância
484 invertida usando o modelo de efeitos aleatórios (Borenstein, 2009).

485 O resultado final da meta análise consiste então na média combinada obtida pelo
486 modelo de efeitos aleatórios, juntamente com seu intervalo de confiança (calculado com base
487 na variância do efeito combinado, a qual é o inverso do somatório dos pesos de todos os
488 estudos). Além disso, calcula-se também um intervalo de previsão (calculado com base na
489 variância do efeito combinado e do τ^2), o qual reflete o intervalo dentro do qual se espera
490 encontrar os valores de uma próxima amostra tirada da população. Outro dado extremamente
491 importante são os valores do teste de heterogeneidade, os quais geralmente são expressos
492 usando o I^2 . Essa medida de heterogeneidade possui uma vantagem sobre as outras medidas
493 disponíveis por ser bastante intuitiva, refletindo a porcentagem da variação entre os resultados
494 que excede o esperado caso toda a variação fosse oriunda de erro aleatório (ou seja, a
495 porcentagem da variância que corresponde à heterogeneidade real e não à variação aleatória);
496 (Vesterinen *et al.*, 2014).

497 Dada a presença de heterogeneidade nos resultados, existem procedimentos que podem
498 ser executados para tentar determinar a fonte de tais variações (Borenstein, 2009). Esses
499 procedimentos incluem a análise de sub-grupos e a análise de sensibilidade. A análise de sub
500 grupos consiste em dividir os estudos com base em fatores que possam estar causando a
501 heterogeneidade (e.g., sexo e idade dos animais, tipo de teste de separação de padrões, dentre
502 outros) e avaliar se os sub grupos são, de fato, estatisticamente diferentes. A análise de
503 sensibilidade consiste em retirar parte dos dados incluídos na análise original e em seguida

504 refazer a análise, avaliando como os resultados são afetados pelos critérios de inclusão. Essa
505 análise pode ser usada tanto para avaliar fontes de heterogeneidade quanto para determinar o
506 impacto de determinados critérios de inclusão no resultado final.

507 **Avaliando a qualidade da meta análise**

508 O fator limitante para a qualidade de uma meta análise é a qualidade dos estudos
509 incluídos. Logo, é necessário avaliar a qualidade dos estudos individuais para ter uma ideia da
510 confiabilidade dos resultados finais. Para tal finalidade, o presente trabalho fez uso de um
511 questionário desenvolvido por Hooijmans et al. (2014) para avaliar o risco de diferentes vieses
512 nos estudos incluídos na análise. Esse questionário consiste em dez perguntas, cada uma
513 questionando a respeito de determinadas medidas que devem ser tomadas pelos autores dos
514 estudos para evitar certos tipos de vieses nos resultados obtidos. Uma descrição geral das
515 perguntas do questionário é dada na **tabela 1**.

516

517 **Tabela 1. Descrição do questionário de Hooijmans *et al.* (2014).**

Questão	Viés analisado	Descrição do viés	Pergunta
1	Viés de seleção	Viés causado por qualquer tipo de interferência no experimento ou análise de dados que tornam as amostras analisadas não representativas da população	A sequência de alocação dos animais nos diferentes grupos experimentais foi gerada de maneira a ser aleatória e foi aplicada corretamente?
2	Viés de seleção	Viés causado por qualquer tipo de interferência no experimento ou análise de dados que tornam as	Os grupos avaliados eram similares nos níveis basais dos parâmetros relevantes?

		amostras analisadas não representativas da população	
3	Viés de seleção	Viés causado por qualquer tipo de interferência no experimento ou análise de dados que tornam as amostras analisadas não representativas da população	A alocação dos animais foi adequadamente ocultada?
4	Viés de atuação	Viés causado por diferenças no tratamento dado aos diferentes animais (excetuando a manipulação experimental sendo analisada)	Os animais foram alojados aleatoriamente durante os experimentos?
5	Viés de atuação	Viés causado por diferenças no tratamento dado aos diferentes animais (excetuando a manipulação experimental sendo analisada)	Os investigadores estavam cegos em relação ao grupo experimental ao qual cada animal pertencia?
6	Viés de detecção	Viés causado por qualquer fator que torne mais ou menos provável a detecção de algum efeito em parte dos animais avaliados	Os animais foram selecionados aleatoriamente para a avaliação dos resultados?
7	Viés de detecção	Viés causado por qualquer fator que torne mais provável a detecção de algum efeito em parte dos animais avaliados	O investigador que avaliou os resultados estava cego em relação ao grupo experimental ao qual cada animal pertencia?
8	Viés de desgaste	Viés causado pela perda de	Resultados incompletos

		animais nos grupos experimentais (uma variante do viés de seleção)	foram adequadamente justificados?
9	Viés de relato	Viés causado pelo relato seletivo de resultados	O estudo estava livre de relato seletivo de resultados?
10	Outros	--	O estudo estava livre de outros problemas que poderiam causar algum tipo de viés?

518

519 Outra questão com implicações para a qualidade de meta análise é o viés de publicação
520 (Borenstein, 2009). Sabe-se que estudos com resultados estatisticamente significativos possuem
521 maior chance de publicação, o que faz com que revisões da literatura publicada, por mais
522 sistemáticas que sejam, corram o risco de obterem uma amostra não representativa da
523 população estudada. Existem diferentes métodos usados para avaliar a ocorrência de viés de
524 publicação e estimar seus efeitos nos resultados da meta análise. Boa parte desses métodos é
525 baseada no *funnel plot*, o qual consiste em um gráfico no qual se representa horizontalmente a
526 distribuição dos resultados dos diferentes estudos ao redor da média. A posição vertical dos
527 estudos é definida com base na sua variância, sendo os estudos mais altos aqueles com menor
528 variância. O resultado é um gráfico com uma forma de funil, onde os estudos com menor
529 variância (e, portanto, maior precisão) se situam próximos da média e estudos com maior
530 variância (e, portanto, menor precisão) apresentam uma maior dispersão ao redor da média.
531 Analisando possíveis assimetrias no *funnel plot* é possível avaliar se existe uma tendência a
532 superestimar a média em estudos menos precisos (uma das características esperadas no caso de
533 viés de publicação). Existem também outros métodos disponíveis, como, por exemplo, as
534 diferentes variantes do *fail-safe N* (Orwin, 1983). Esse teste avalia o efeito da adição de estudos

535 hipotéticos no efeito observado, e é geralmente usado para informar quantos estudos com
536 resultados neutros seriam necessários para reduzir o efeito observado na meta análise a um
537 efeito nulo (ou próximo de nulo). Quanto maior o número obtido, menor a probabilidade de que
538 os efeitos observados na meta análise sejam causados inteiramente por viés de publicação.

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

-- Manuscrito—

558

A ser submetido para a revista Hippocampus

559

(Fator de impacto 4.07, Qualis A2)

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576 **Title page**

577 **Title:** Hippocampal neurogenesis and pattern separation: a meta-analysis of behavioral data

578 **Authors:** Thiago F. A. França¹; Alexandre M. Bitencourt¹; Naiana R. Maximilla²; Daniela M.
579 Barros^{1,3}; José M. Monserrat^{1,3}.

580 **Author affiliations:** ¹Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade
581 Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil. ²Curso de graduação em Ciências
582 Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande -FURG, Rio Grande, RS, Brazil. ³Instituto
583 de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil

584 **Abbreviated title:** Meta-analysis of neurogenesis and pattern separation

585 **Number of pages:** 30 pages of main text (with references), 19 pages of supplementary
586 material.

587 **Number of figures:** 7

588 **Number of tables:** 3

589 **Correspondence information:** Correspondence should be addressed to Thiago F. A. França.
590 Address: Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande -
591 FURG, Av Itália, Km 8 s/n- Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil. Phone number: +55 53
592 984625616. Email: tfafranca@furg.br

593
594 **Funding:** TFAF and AMB receive masters scholarships from the Brazilian national council
595 for scientific and technological development (CNPq) and the Coordination for improvement
596 of higher education personnel (CAPES), respectively. JMM and DMB receive a productivity
597 research grant from CNPq.

598 **Keywords:** Adult neurogenesis, hippocampal formation, dentate gyrus, behavioral pattern
599 separation, systematic review

600 **Abstract**

601 The generation of new neurons in the hippocampus of adult mammals has become a widely
602 accepted phenomenon, but the functional significance of the adult neurogenesis in the
603 hippocampus is not fully understood. One of the main hypotheses currently investigated
604 suggests that neurogenesis contributes to pattern separation in the dentate gyrus. Many
605 behavioral studies were conducted aiming to test this hypothesis, most of them using rodents
606 as animal model. The results of these studies are varied, with most supporting a role for
607 neurogenesis in pattern separation, but some others not. To address this controversy, it was
608 performed a systematic review and meta-analysis of studies evaluating the effect of
609 neurogenesis ablation on behavioral pattern separation. Analysis results indicated that most of
610 the literature on the topic is surprisingly consistent and, although there are two studies with
611 divergent results, the bulk of the literature supports a role for hippocampal neurogenesis on
612 pattern separation. Those findings are discussed considering recent electrophysiological
613 experiments and currently debated hypothesis regarding the mechanistic bases of
614 hippocampal neurogenesis effects on behavior. Finally, it is proposed a hypothesis to unify
615 the direct and indirect hypothesis currently debated in the literature and a test to evaluate
616 hypothesis which would make possible to differentiate between direct and indirect
617 contributions of neurogenesis to pattern separation and memory.

618

619 **1. Introduction**

620

621 Hippocampal neurogenesis (HN) is the process by which new principal neurons are
622 generated in the dentate gyrus (DG) and are functionally integrated into the hippocampal
623 circuitry of the adult mammalian brain (Molina-Navarro & Garcia-Verdugo, 2016). Despite

624 the enormous amount of research in this topic, there are still many open questions regarding
625 the functional significance of HN (Gonçalves et al., 2016). One of the hypotheses considers
626 that the functional role of HN is to aid pattern separation. Pattern separation is a
627 computational process that consists in disambiguating similar inputs so as to produce
628 dissimilar outputs (Treves et al., 2008). Such computational process has long been implicated
629 as a function of the DG within the hippocampal formation, and so it was suggested that HN
630 played a role on the disambiguation of inputs by the DG (Wiskott et al., 2006). Over the last
631 decade, many researchers have attempted to evaluate this hypothesis, ablating HN and
632 submitting the animals to behavioral tests which are, in theory, dependent on the
633 computational process of pattern separation. Most of the results of those studies have
634 supported the patterns separation hypothesis, and as such the hypothesis gained increase
635 acceptance in the field (Hvoslef-Eide & Oomen, 2016). Despite that, some contradictory
636 findings exist in the literature (Cushman et al., 2012; Groves et al., 2013). Furthermore, an
637 evaluation of the consistency of the results regarding HN and pattern separation is hindered
638 by a pervasive problem: the over reliance on statistical p values (Nuzzo, 2014). When testing
639 hypothesis, the criterion used to reject the null hypothesis in most of the literature in
640 biological sciences is the p value, but evaluating the consistency of the literature based on the
641 p value of the different studies is a treacherous task because equal p-values do not implicate
642 equal effects (Borenstein, 2009). In fact, one would not expect a high level of consistency in
643 the literature of HN and pattern separation, given the variation between studies in many
644 potentially relevant factors such the employed animal model (rat or mice), its strain, sex and
645 age, methods of HN ablation and behavioral paradigm used to access pattern separation.

646 To gain a better understanding of the role of HN on pattern separation it is necessary
647 to look beyond the individual studies and beyond the simple dichotomy of being or not being
648 statistically significant. It is important to look at the whole data, using more informative

649 measures about the effects found on each study and evaluate the consistency of those effects
650 across studies, as well as the patterns which may point to possible sources of variation
651 (Borenstein, 2009). In the present study, it was performed a systematic review and a meta-
652 analysis of the studies evaluating the effect of HN ablation on behavioral pattern separation in
653 rodents. After the relevant studies were found through a systematic search of the literature, the
654 data from these studies was combined to yield a quantitative synthesis of the literature.
655 Moreover, since the metric used to combine the results was the effect size, not the p-value, it
656 was possible to better evaluate the consistency between results of different studies. It was
657 observed that, despite the presence of two outliers, the bulk of the data is surprisingly
658 consistent and indicate a strong effect of HN on pattern separation-dependent behaviors. The
659 results were discussed in the light of the other behavioral effects of HN ablation and in regard
660 to data about the mechanistic basis of the effects of HN on behavior.

661 **2. Methods**

662 **Systematic literature search**

663

664 The literature search was conducted on July 20th, 2016. Four databases were search:
665 PubMed, Web of Science, Scopus and Science Direct. The search string for each database was
666 elaborated based on the research question and using the tutorial of Leenaars et al. (2012) as a
667 general guideline. The research question was: “what is the effect of HN ablation on behavioral
668 correlates of pattern separation in mammals?” Therefore, the search strings were based on
669 terms related to “adult neurogenesis”, “hippocampus”, “dentate gyrus”, “behavioral pattern
670 separation” and, specifically in the case of PubMed, there were terms regarding animal
671 models. There was also a term to exclude review articles and, in Scopus, there were terms to
672 exclude publications from unrelated research topics. The search was limited to publications
673 from 2009 onwards, since the first report of HN ablation and behavioral pattern separation

674 (Clelland et al., 2009) was published that year. Additionally, all studies in the four databases
675 that cited Clelland et al. (2009) were included for selection (except Science Direct, in which
676 the study from Clelland *et al.* (2009) was not indexed). The complete search string for each
677 database can be found in Supplementary Table 1 (**Table S1**).

678

679 **Inclusion criteria**

680

681 We included in the meta-analysis all studies which evaluated the effect of HN ablation on
682 behavioral tests of pattern separation in juvenile/adult healthy mammals. Additionally,
683 specific criteria were employed to decide on the inclusion of different ablation methods and
684 different behavioral tests of pattern separation, discussed below.

685 Regarding the method of HN ablation, we included studies which performed the ablation
686 by either focal X-ray irradiation of the hippocampus or by transgenic/pharmacogenetic
687 methods and excluded those who used chemostatic agents or whole brain irradiation. The
688 rationale for this choice was the fact that ablation by chemostatic agents or whole brain
689 irradiation have very low selectivity and widespread side effects (Drew et al., 2016a). It is
690 true that both focal X-ray irradiation and transgenic/pharmacogenetic methods also have side
691 effects, but those seem to be more restricted than the side effects of the excluded methods
692 (Drew et al., 2016a). Were also excluded transgenic or knockout models that ablated
693 neurogenesis but also model neuropathological states (e.g., Guo et al., 2011; Park et al.,
694 2015b).

695 The criteria for inclusion of behavioral tests was the accordance of the test design with the
696 general definitions of a pattern separation behavioral test given by Kirwan and Stark (2007)
697 and Hagen et al. (2014). Therefore, we included behavioral tests which exposed the animals
698 to two highly similar contexts with small spatial changes between them, requiring the animal

699 to present a different behavioral response in each context. Based on this criterion and
700 considering only the behavioral tests used in the studies that met the other selection criteria,
701 the included behavioral tests were: contextual fear discrimination, delayed non-matching-to-
702 place in the radial arms maze, spatial metric processing, and spontaneous location recognition
703 tests.

704

705 **Study selection**

706

707 The references retrieved from the systematic search were loaded into the reference
708 manager software JabRef 3.6 (JabRef development team, 2016). They were screened by two
709 independent investigators (TFAF and AMB or NRM) in three steps: (a) screening by title, (b)
710 screening by abstract and finally, (c) full text reading. In the first two steps, were excluded
711 papers which: (1) were off topic, (2) were not original papers, (3) did not perform *in vivo*
712 studies with mammals, (4) used animal models of disease, (5) evaluate the effects of drugs or
713 toxins or (6) did not report behavioral data. Therefore, studies selected for the third step were
714 those which dealt with behavioral effects of neurogenesis manipulation in healthy mammals.
715 Studies in which any of these criteria could not be evaluated based on the abstract were also
716 selected for full text reading. In the third step the accordance with the specific inclusion
717 criteria regarding the behavioral tests and methods of HN ablation was evaluated.

718

719 **Data extraction**

720 After the selection process, relevant data from the selected studies was extracted to a
721 LibreOffice spreadsheet. Such data included sample sizes, means and standard
722 deviations/errors from the pattern separation behavioral tests, the sex, species, and strain of
723 the animals used in the study, the method of neurogenesis ablation, the behavioral test used,

724 the outcome measure, the time between ablation and behavioral testing and the duration of the
725 behavioral test. When any relevant data was not reported in the text, the data in question was
726 requested to the authors; in the absence of reply, the data was marked as unknown. In case of
727 means and standard deviation/error, when data was not presented in the text, it was extracted
728 from the graphs using the software PlotDigitizer (Rohatgi, 2016).

729

730 **Quality assessment**

731 Included studies were submitted to risk of bias assessment by SYRCLE's risk of bias tool
732 (Hooijmans et al, 2014). This tool consists of ten questions, each of which addresses a
733 different form of bias that may affect the reliability of the results from the study. During study
734 evaluation, missing data was considered as not performed (*e.g.* no mention of blinded animal
735 caregivers was interpreted as not performed).

736

737 **Meta-analysis**

738 Given the differences in behavioral tests used to assess pattern separation, the chosen
739 measure of effect size was the standardized mean difference (SMD) calculated using Hedge's
740 *g* (Hedges & Odkin, 1985). The effect size from the different studies was combined into a
741 summary effect size (accompanied by confidence interval) using the inverse variance method
742 with the random effects model, with τ being estimated by the restricted maximum likelihood
743 estimator (Borenstein, 2009). Presence of heterogeneity was evaluated by the Cochran's Q
744 method and the percentage of observed variation corresponding to true heterogeneity was
745 calculated using the I^2 measure (Vesterinen *et al*, 2014). To evaluate possible sources of
746 heterogeneity in the results, a stratified meta-analysis was planned *a priori* (Vesterinen *et al*,
747 2014). Factors considered in this analysis would be sex, species and strain of the animals used

748 in the study, the method of neurogenesis ablation, the behavioral test used, outcome measure,
749 time between ablation and behavioral testing, the duration of the behavioral test and the
750 methodological quality of studies. The stratified meta-analysis ended up not being performed
751 because a sensitivity analysis carried out before it was able to pinpoint the sources of
752 heterogeneity. The sensitivity analysis in question was not planned *a priori*, as its execution
753 was only suggested after a visual inspection of the results of the first analysis; it consisted in
754 the exclusion of two data sets followed by the calculation of new estimate of summary effect
755 and heterogeneity. Another sensitivity analysis (planned *a posteriori*, before the first meta-
756 analysis but after the data extraction) was performed to evaluate the effect of the inclusion of
757 different time points in the meta-analysis. In this sensitivity analysis, we aggregated data,
758 when available, from the multiple days of behavioral testing within studies to compute a
759 combined effect size using the procedure outlined in Borenstein (2009b). As a conservative
760 measure, we assumed the correlation between multiple time points to be 1. All statistical
761 analysis was performed on R (R development core team, 2008) and all the codes used, as well
762 as the data used in the analysis, are in the Supplementary Information as **Annex 1**.

763

764 **Publication bias**

765 The original plan was to assess the possibility of publication bias and its impact on the
766 results using funnel plot and funnel plot-based methods such as Egger regression and trim-
767 and-fill (Borenstein, 2009a). Unfortunately, those methods could not be applied due to the
768 small number of studies. As an alternative, Orwin's fail-safe N (Orwin, 1983) was employed
769 to evaluate the robustness of results to the addition of hypothetical unpublished studies. This
770 method consists in calculating the number of hypothetical studies with a give effect size
771 needed to add so as to reduce the unweighted summary effect size to a given target effect size
772 (usually set at a value that would indicate a small or irrelevant effect).

773 It is important to highlight that the method works with the unweighted summary effect, or
774 equivalently, the summary effect obtained when all studies are given the same weight. This is
775 different from the summary effect in the main analysis – although not by much in this case,
776 since the variance of the studies included in the meta-analysis (and therefore their weights)
777 was similar.

778

779 **3. Results**

780

781 We identified a total of 13,317 articles through the literature search (PubMed=2,371 plus
782 323 that cited Clelland et al. (2009); Web of Science=3,187 plus 547 that cited Clelland et al.
783 (2009); Scopus=5,841 plus 592 that cited Clelland et al. (2009); Science Direct=456) (**Figure**
784 **1**). After removing the duplicates 10,706 articles remained for the first screening. After
785 carefully reading the titles, 10,192 articles were excluded for being off topic, being review
786 papers, not being *in vivo* studies, using animal models of disease or evaluating the effects of
787 drugs or toxins. The 514 articles left were then submitted to careful abstract reading and 428
788 articles were then excluded (156 were not original research papers, 24 did not deal with
789 mammals, 33 did not report behavioral data and 215 did not report neurogenesis ablation). We
790 then read the full text of the remaining 86 articles and 75 of those were excluded (39 did not
791 met the criteria for the pattern separation test and 36 did not met the criteria for the method of
792 HN ablation). Of the remaining 11 articles, two (Nakashiba et al., 2012 and Wu and Hen,
793 2014) were later excluded because they did not report a comparable outcome measure (see
794 details in the next section). The other nine articles were then included in the analysis; two of
795 those articles (Clelland et al., 2009 and Cushman et al., 2012) had two independent datasets
796 within them and those datasets were treated as separate studies in the meta-analysis, yielding
797 a total of 11 data sets.

798

799 **Characteristics of included studies**

800 The main characteristics of each selected study are summarized in **Table 1**. The general
801 structure of all the studies was the same, with animals with and without HN being submitted
802 to behavioral tests of pattern separation. Despite the generality of design, there were
803 differences between the studies in all the factors evaluated. For example, there were seven
804 different methods of HN ablation used, with varying side effects ranging from temporary
805 hippocampal inflammation in the case of focal X-ray irradiation (Monje *et al.*, 2003) to
806 collateral ablation of neurogenesis in the olfactory bulb (e.g., Pan *et al.*, 2012; Kesner *et al.*,
807 2014) or ablation of gliogenesis (e.g., Groves *et al.*, 2013) in some of the transgenic models.

808 Seven of the studies used contextual fear discrimination as the behavioral test, other four
809 studies used delayed non-matching-to-place in radial arms maze (DNMTP), and special
810 metric processing and spontaneous location recognition were used in one study each. The
811 outcome measure used to estimate the effect size was the percentage of correct responses in
812 the DNMTP test and the discrimination ratios in the other tests. Two of studies that used
813 contextual fear discrimination to assess pattern separation (Nakashiba *et al.*, 2012 and Wu and
814 Hen, 2014) did not report a discrimination ratio, reporting only the percentage of time the
815 animals spent freezing in each context. Given the nature of contextual fear discrimination test,
816 comparison of effects between studies was only possible with a single outcome measure that
817 encompassed the behavior of the animals in both contexts to which they were exposed, since
818 the capacity of the animal to discriminate between the different contexts can only be
819 measured by considering the behavior in one context relative to the behavior on the other
820 context. For that reason, that data from Nakashiba *et al.* (2012) and Wu and Hen (2014) were
821 excluded from the analysis. Importantly, the conclusion of those two studies, based on the %
822 of freezing time data, support a negative effect of HN ablation on behavioral performance in

823 tests of pattern separation and therefore are in accordance (at least in the direction of the
824 effect) with the results from the meta-analysis based on the remaining studies.

825 Most of the studies used behavioral tests with a duration of multiple days. Some of them
826 presented outcome data combined from all testing days, others presented data from individual
827 days or blocks of days and some presented only data from the last day of testing. In those
828 studies, which reported data from individual days or blocks of days, the discrimination ratios
829 tended to change over time, sometimes showing improvements consistent with learning
830 (Sahay et al., 2011; Cushman et al., 2012; Tronel et al., 2012). In fact, in those studies that
831 reported data from individual days but did not report discrimination ratios, it was possible to
832 see a pattern of improvement in discrimination with time (as indicated by increasingly
833 different percentage freezing in the different contexts; Nakashiba et al., 2012; Wu and Hen,
834 2014). There is evidence that HN affects learning (reviewed in Deng et al., 2010) and,
835 consistent with those data, control animals seem to achieve the capacity to discriminate
836 between contexts faster than HN ablated animals (Nakashiba et al., 2012; Wu and Hen, 2014).
837 This implies that, at least in the contextual discrimination test (used by all the studies), there is
838 a learning component affecting the results of the tests. In fact, it would be reasonable to
839 expect a learning component in other tests as well, such as DNMTTP. To minimize interference
840 of a possible learning delay in HN ablated animals, whenever possible we used only results
841 from the last day of testing in the meta-analysis. Some of the studies did not provide
842 individualized data (Clelland et al, 2009; Groves et al, 2013), but fortunately such studies
843 have behavioral tests of very long duration, which may have dampened the delayed learning
844 effect. To evaluate the bearing of this decision on the result, we performed a sensitivity
845 analysis in which the effect size of those studies that reported outcome from multiple time
846 points (Sahay et al., 2011; Cushman et al., 2012; Tronel et al., 2012) was calculated from the
847 aggregate data of all time point.

848

849 **Study quality**

850 The results of the application of SYRCLES's risk of bias tool are summarized in **Table 2**.
851 As expected, both the percentage of qualified studies in most criteria and the unweighted
852 score of individual studies were low. Two factors may have contributed to those results. One
853 is the fact that some criteria evaluated are still not common practice in animal studies, such as
854 the use of an algorithm for random allocation of the animals within the experimental groups
855 (Hooijmans et al, 2014). The other factor is the poor reporting quality in animal studies
856 (Kilkenny et al., 2009). In most studies, there were various criteria that could not be
857 adequately judged due to lack of information in the material and methods section. Since
858 unreported qualitative missing data was presumed as not performed, the overall results
859 possibly underestimate the quality of studies.

860 Another relevant point is the presence of unclear answers to two of the questions in the
861 risk of bias tool. The first one asks if the animals used in the study were similar at relevant
862 baseline characteristics. This questions is impossible to address, since parameters such as the
863 natural levels of neurogenesis in the animals cannot be evaluated without killing them. Since
864 this is a methodological limitation, it was marked as unclear for all studies. Another question
865 which contained unclear responses was the one regarding justification for incomplete data. In
866 this question, studies were evaluated as unclear when there was doubt of whether there were
867 incomplete data in the study (e.g., in cases of uneven number of animals in control and
868 treatment groups, which may or may not reflect the exclusion of animals from the
869 experiment).

870 Interestingly, two of the studies had an unusually high individual score (Cushman et al.,
871 2012 and Kesner et al., 2014). This was due to the transgenic ablation method used by those

872 studies. In those studies, it was only possible to know whether an animal had reduced HN or
873 normal HN after histological analysis, which had to be done after behavioral testing.
874 Therefore, all procedures were carried out blind to the genotype of the animals, resulting in a
875 positive score in various criteria and thus a higher overall score.

876

877 **Effect of HN ablation on pattern separation**

878 The results of the first meta-analysis are show in the forest plot in **Figure 2**. The
879 magnitude of the effect size was interpreted following Cohen's general guidelines, defining a
880 standardized mean difference of 0.2, 0.5 and 0.8 as a small, medium, and large effect,
881 respectively (Cohen, 1988). The results show a moderate-to-strong negative effect of HN
882 ablation on behavioral performance (SMD = -0.718), but although the result reached
883 statistical significance ($p = 0.0013$), the 95% confidence interval is wide and spanned both
884 values which indicate a very strong effect (upper limit = -1.156) and values that pointed to
885 very weak effect (lower limit = -0.281). Furthermore, there was a moderate heterogeneity ($p =$
886 0.0078 , $I^2 = 58.2\%$) and the 95% prediction interval was extremely wide. Visual inspection of
887 the data shows nine of the eleven data points clustered on the left of the forest plot, with only
888 two data points further on the right, suggesting that those two results may be the cause of
889 heterogeneity in the data. A sensitivity analysis performed by excluding these two data points
890 confirmed this was in fact the case, as the results of the new analysis without the data from
891 Cushman et al (2012; male dataset) and Groves et al (2013) had no detectable heterogeneity
892 ($p = 0.9223$, $I^2 = 0\%$) and were reduced to a fixed effects model (**Figure 3a**). The second
893 analysis had a higher effect size (SMD = -0.999, $p < 0.0001$) and a narrower 95% confidence
894 interval (-1.305; -0.692), showing a strong and consistent negative effect of HN ablation on

895 behavioral pattern separation. Importantly, removing the two leftmost data points do not
896 eliminate detectable heterogeneity (**Figure 3b**; $p = 0.0110$, $I^2=59.6\%$).

897 To evaluate the effect in the results of the choice of time points to be included, we
898 performed a second sensitivity analysis. The results are shown in **Figure 4**. **Figure 4a** shows
899 the results with all eleven data sets included. The summary effect was slightly smaller than
900 the summary effect of the corresponding analysis with outcomes of the final day of testing.
901 Also, the confidence interval was slightly narrower (SMD= -0.667, with a 95% confidence
902 interval of -1.05 to -0.29, $p = 0.0005$). The heterogeneity was also smaller, but still significant
903 ($p=0.0499$, $I^2= 45.44\%$), and the prediction interval was still wide. The qualitative assessment
904 is like the previous analysis: a moderate but variable effect with a fair degree of
905 heterogeneity. Visual inspection of the data in **Figure 4a** shows now three data points
906 clustered on the right of forest plot, the same two as in **Figure 2**, but now accompanied by the
907 other data set from Cushman et al. (2012). As expected, removing those data sets from the
908 analysis completely removes any detectable heterogeneity (**Figure 4b**; $p = 0.8131$, $I^2= 0\%$;
909 other details in the legend) and produces a stronger and more consistent effect, very similar to
910 the effect of the analysis including only data from the final day of test (SMD= -0.9622, 95%
911 confidence interval from -1.29 to -0.64, $p<0.0001$). Importantly, removing the three leftmost
912 data points (**Figure 4c**) do not fully removes detectable heterogeneity, as it becomes no
913 longer statistically significant ($p = 0.1322$) but remains detectable ($I^2 = 37.15\%$), suggesting
914 that there was heterogeneity but the test did not have enough power to detect it at the
915 significance level of 0.05.

916 To evaluate the possibility that the effects observed are due to publication bias, we
917 performed a series of variations of Orwin's fail-safe N (Orwin, 1983). The results of the tests
918 are summarized in **Table 3**. The target effect size was set at -0.2 (which implies a very small
919 effect) and the result shows the number of studies with a given effect size that needs to be

920 added to reduce the summary effect to the target effect size. The number of studies with null
921 effect sizes needed to achieve the target effect size is more than three times the number of
922 available studies in the literature in both the meta-analysis with data from final day of test and
923 meta-analysis with aggregated data. The smaller numbers of studies need to reach the target
924 effect were found when adding, instead of neutral studies, studies with effect sizes equal to
925 those of the excluded outliers. In the smallest of all fail-safe Ns, one would need five more
926 studies with the same extreme result as Cushman et al. (2012; male dataset) to reduce the
927 unweighted summary effect size of the analysis with outliers (i.e., already contain one such
928 extreme effect) to -0.2. Considering that in eleven studies with fourteen data sets only two
929 studies reported improvement in pattern separation with ablation of HN, and of those two,
930 only one dataset of one study had such an extreme effect size, it seems very unlikely that there
931 are another 5 or 7 results like that of Cushman et al. (2012) that were not published, especially
932 since this result was statistically significant, and therefore one would not expect that other
933 results alike remained unpublished. Overall, then, the results seem robust.

934

935 **4. Discussion**

936 The results shown here pose us two questions: what are the causes of the inconsistency
937 observed in part of the data? And what are the causes of the unexpected consistency of the
938 remaining data?

939

940 **The outliers**

941 One look at the characteristics of the studies (**Table 1**) whose data were inconsistent with
942 the rest of the literature (Cushman et al., 2012; Groves et al., 2013) reveals that there is no

943 pattern to be found regarding any of the factors that were to be evaluated as possible sources
944 of heterogeneity. Not only both studies share all their characteristics with at least one other
945 study, they also share almost no characteristics with each other. It is interesting to note that
946 the most extreme dataset (Cushman et al., 2012; male dataset) was the one that suffered the
947 greatest reduction in effect size when data was aggregated (from $SMD=0.974$ to
948 $SMD=0.230$), probably due to a strange fluctuation in the discrimination ratio of control and
949 HN ablated animals throughout the testing days (for the graphs regarding such data, see
950 Cushman et al., 2012). The significance of those fluctuations remains unknown, and a similar
951 evaluation of the data from Groves et al. (2013) could not be made since this study only show
952 the outcome combined across all 12 days of testing. Moreover, it is also interesting to see that
953 the female data set from Cushman et al. (2012) was consistent with the rest of the literature
954 (although with a smaller effect size than average), but became less consistent with the
955 leftmost studies (with an almost null effect size) when data from all time points were
956 aggregated. This was likely since discrimination ratios of control and HN ablated animals in
957 this experiment increased steadily in parallel, only becoming significantly different in the last
958 two days of testing, where the discrimination ratio of HN ablated animals showed a sudden
959 decrease (for the graphs regarding such data, see Cushman et al., 2012).

960 A possible explanation suggested by Groves et al. (2013) is that the unexpected result in
961 their test may be due to the test not being challenging enough, causing the performance of
962 both groups not to be statistically different, with the result in the opposite direction being a
963 statistical fluctuation. Although that may be a satisfactory explanation for the small effect size
964 observed by Groves et al. (2013) and some consideration regarding the difficulty of the test
965 may also hold for the data on female mice in Cushman et al. (2012), it is harder to consider
966 this possibility regarding the data from male mice in Cushman et al. (2012), since their effect
967 size of substantially larger. The explanation proposed by Cushman et al. (2012) relies on a

968 role for HN as encoding time into memories (Aimone et al., 2006). This hypothesis suggests
969 that memories formed close in time would be bound together by the activity of the cohort of
970 adult born neurons maturing at the time of encoding. Therefore, removing HN would remove
971 this source of similarity between the representations of the two similar contexts presented in
972 the test, resulting in improved discrimination by the animal. Although the hypothesis
973 proposed by Cushman et al. (2012) do make sense, it leads to an expectation of similar results
974 in other studies, at least in those using male mice (considering the possibility of a sex-specific
975 effect). The problem is that all the other studies that used male mice found results in the
976 opposite direction (Sahay et al., 2011; Tronel et al., 2012; Pan et al., 2012; Nakashiba et al.,
977 2012; Wu and Hen, 2014).

978 In summary, that is a lack of possibly informative patterns in the data and therefore a lack
979 of satisfactory hypotheses that could explain both data. As more studies are produced, it is
980 possible that other studies with similar results show up in the literature, allowing us to see
981 some pattern that may explain these results.

982 **The consistent results**

983 Given the various important differences between the studies included in the meta-
984 analysis, one would not expect a high degree of consistency in the effect sizes reported in
985 each study. In fact, it is well known that different ablation methods differ in their collateral
986 effects (Drew et al., 2016a) and that different rodent species and (at least in mice) different
987 strains have different natural levels of HN (Snyder et al., 2009; Kempermann et al., 1997).
988 Furthermore, it would be expected that different behavioral tests of pattern separation varied
989 in their sensibility and specificity in detecting behavioral correlates of pattern separation.
990 Variations within each experimental paradigm would also be expected to affect the outcome.
991 Yet, the results showed that seven out of nine studies included in the meta-analysis had no

992 detectable heterogeneity in their results, despite all the differences between them. Importantly,
993 this does not mean the studies are homogeneous, just that the heterogeneity was too small to
994 be detected in this study. Publication of more studies may allow the detection of influences
995 from one or more relevant study factors on the effect of HN on behavioral pattern separation,
996 although those differences are likely to be small as they could not be detected here.

997 Another possibility is that the combined effects of each potential interference factor
998 are quantitatively similar, despite being qualitatively distinct, which would also lead to
999 difficulty in detecting heterogeneity. The other (rather extreme) hypothesis would be that all
1000 effects observed (or at least a large proportion of those effects) are due to collateral effects of
1001 the ablation methods, but such hypothesis do not hold, since other sources of evidence such as
1002 optogenetic manipulation (Danielsson et al., 2016; Drew et al., 2016b), also point to an effect
1003 of HN on pattern separation. In the end, the results point to a robust effect of HN on
1004 behavioral correlates of pattern separation. Even if one includes the outliers the effect is still
1005 moderate-to-strong and although the predictive value of the meta-analysis becomes reduced
1006 (as the prediction interval becomes wider), one would still expect the mean effect of a
1007 sufficiently large number of new studies to be moderate-to-strong.

1008 The question remains as to the mechanism by which HN affects pattern separation. For
1009 that matter, one needs to go beyond the surface of behavioral manifestation and delve into
1010 other sources information regarding the phenomena.

1011 **From behavior to cognition and the problem of memory**

1012 The behavioral tests of pattern separation where designed to be dependent on the
1013 computational process of pattern separation. Of course, the behaviors evaluated in the test do
1014 not depend solely on pattern separation, but involve a myriad of other computational and
1015 cognitive processes. Therefore, the results of such tests can only show consistency with

1016 impairment in pattern separation but can never show unambiguously that pattern separation
1017 was impaired (Aimone, 2016). The cause for this is that other cognitive processes may be
1018 affected by a given intervention and thus impair the behavioral performance of the animals.
1019 The most evident candidate to interfere with the results of the behavioral tests is the cognitive
1020 process most closely associated with pattern separation: memory. Considering that the
1021 difference in performance between the control group and HN ablated group increases with
1022 time (as evidenced by the dilution of the effect size when data from all time points are
1023 aggregated), it is possible that the effects observed are caused by impaired memory function
1024 in the HN ablated group as much as they are caused by a difference between the two groups in
1025 their capacity to discriminate similar contexts. This possibility is strengthened by various
1026 studies pointing to an effect of HN ablation on memory (Deng et al., 2010). Such situation
1027 creates an undecidable problem that may only be solved by considering the physiological
1028 aspects of HN. Fortunately, many researchers have used complementary approaches to study
1029 HN and data regarding those different aspects of HN physiology have been accumulating in
1030 recent years (Lacefield et al., 2012; Ikar et al., 2013; Park et al., 2015a; Drew et al., 2016b).

1031 **From cognition to neurons and networks: finding a unifying hypothesis**

1032 Adult-born granule cells (abGCs) are known to pass through a maturation process with
1033 duration of several weeks (reviewed in Gonçalves et al., 2016). In this process, that is a
1034 critical time window in which abGC show high excitability and insensitivity to GABAergic
1035 input. In this critical period the abGCs already have functional synapses, receiving input from
1036 the perforant path and sending output to CA3 principal neurons and interneurons as well as to
1037 interneurons within the DG. The abGC in this stage of the maturation process are also known
1038 to be broadly tuned and this feature, along with the higher excitability of those cells, makes
1039 the population of maturing abGCs proportionately more active than the population of mature
1040 granule cells (GCs).

1041 There are many hypotheses regarding the mechanism that links the special properties
1042 of abGCs to their effects on pattern separation, but the main ones fall into two categories: the
1043 direct and the indirect hypotheses (Johnston et al., 2015; Park et al., 2015a). The direct
1044 hypothesis state that abGCs with their special transient characteristics act as autonomous
1045 coding units in the DG, while the indirect hypothesis states that abGC contribute to the
1046 function of the DG by modulating the sparsity of the DG network. The indirect hypothesis has
1047 gained increasing experimental support over the past few years. Studies have demonstrated
1048 that maturing abGC make synaptic contacts with Mossy cells and inhibitory interneurons
1049 (Ikar et al., 2013) and that stimulation of abGC activates local inhibitory circuits (Drew et al.,
1050 2016b). Moreover, increasing and ablating HN caused a decreased and increase, respectively,
1051 in DG neuronal activation in response to electrical stimulation (Ikar et al., 2013).
1052 Additionally, HN ablation increases spontaneous activity in the DG of anesthetized mice
1053 (Lacefield et al., 2012). All those sources of evidence point to modulation of the sparsity of
1054 DG network as mechanism for the effect HN on pattern separation. This mechanism could
1055 also help to elucidate the interpretation problem with behavioral tests, as the mechanism can
1056 be extended to explain both the effects of HN on pattern separation and on memory and
1057 learning.

1058 **Figure 5a** shows a graph representing the firing probability pattern in granule cells of
1059 the DG in response to a stimulus (a spatial context, for example). In x-axis we have different
1060 mature GCs, while in the y-axis we have the probability of firing of the respective GC.
1061 Mature GC possess highly tuned place fields that seem to be shaped both by lateral inhibition
1062 (Sloviter and Brisman, 1995) and the constant inhibitory tone of the DG (Leutgeb et al., 2007;
1063 Danielsson et al., 2016), both dependent on the inhibitory circuits of the DG. Therefore, given
1064 a particular stimulus, a small proportion of the GCs will have a high firing probability, while
1065 the rest will have a very low firing probability. In this way, two very similar inputs can be

1066 coded by non- overlapping populations of GCs (**Figure 5b**). According to the indirect
1067 hypothesis, when abGCs are removed, the activity of inhibitory circuits is reduced, lowering
1068 the inhibitory tone of the DG. Moreover, given the fact that the strong excitatory input from
1069 abGC from the inhibitory interneurons would also be removed (both directly and indirectly
1070 through Mossy cells; Toni et al., 2008; Ikar et al., 2013), the mechanism for lateral inhibition
1071 would be expected to become less effective. Therefore, the response of the DG to a given
1072 stimulus would be expected to look more like a Gaussian curve, with the GCs marginal to the
1073 stimulus showing a greater firing probability than before (**Figure 5c**). This would cause
1074 overlapping between the representations of similar inputs, thus consistently impairing pattern
1075 separation, as observed in most behavioral experiments.

1076 One additional consequence of the increase in firing probability of the marginal
1077 neurons is an increase in the variability of the response to the same stimulus, adding noise to
1078 the neural representation and causing a reduction in the information encoded (Borst and
1079 Theunissen, 1999). The formation of low information content memories and the attempt to
1080 recover such memories from low information representations is expected to impair not only
1081 behaviors dependent on pattern separation, but also any behavior that relies on learning and
1082 memory – but only if it is sufficiently demanding on those cognitive processes. This could
1083 explain not only the results of studies supporting a role for HN in memory (e.g., Winocur et
1084 al., 2006; Dupret et al., 2008), but also the fact that some of them do not find any significant
1085 effect of HN ablation (e.g., Meshi et al., 2006; Hernandez-Rabaza et al., 2009).

1086 The scenario described above yields remarkably similar predictions as those made by
1087 Aimone et al. (2011). These authors presented a framework for understanding the effects of
1088 HN based on the concept of memory resolution, which is related to the information content of
1089 the stored memory. They suggest that abGCs contribute unique information to memory
1090 encoding and this additional information increases the resolution of the memory stored,

1091 facilitating subsequent discrimination between similar memories. Although Aimone et al.
1092 (2011) arrived at the memory resolution approach through a fundamentally different
1093 hypothesis, their framework fits well with the indirect hypothesis as proposed here, since in
1094 both cases the loss of abGC leads to a reduction in the information content and a subsequent
1095 reduction in the resolution of memories. In fact, the two hypotheses do not seem to be
1096 mutually exclusive, and HN may as well affect memory by both mechanisms simultaneously.

1097 Is interesting to note that what unites the direct and indirect hypothesis here is the fact
1098 that both lead to a reduction of information transferred from de DG to CA3, which creates an
1099 analogy between HN and homeostatic mechanisms. Improving information transfer between
1100 different systems in the body has been proposed as one of the factors driving the evolution of
1101 homeostasis (Woods and Wilson, 2013) and we could propose a similar hypothesis regarding
1102 the evolution of HN, although any evolutionary discussion about HN must be taken carefully
1103 as there are still controversies about the evolutionary significance of neurogenesis (see Kaslin
1104 et al., (2008) and Kempermann, (2016) for two contrasting view on the matter).

1105

1106 **Testing the hypothesis**

1107 A recent study by Danielsson et al. (2016) showed that optogenetically silencing
1108 abGCs during different stages of a contextual discrimination test caused different behavioral
1109 effects. Specifically, when silencing was performed on every exposure to the unconditioned
1110 context (therefore affecting the encoding of the memory regarding the unconditioned context),
1111 the animal had difficulty discriminating the contexts. Conversely, when silencing was
1112 performed in the conditioned context, but after the first exposure in that context, the animal
1113 had no problem in discriminating the contexts. The results are consistent with the hypothesis
1114 discussed here, since less informative representations are required to discriminate between

1115 low information memories than to discriminate between high information memories.
1116 Importantly, a modification of the experimental paradigm used by Danielsson et al. (2016)
1117 could be used for a better evaluation of the hypothesis discussed here. If one could
1118 optogenetically stimulate the inhibitory interneurons while silencing the abGCs it would be
1119 possible to discriminate between the direct and indirect hypothesis of HN action and
1120 determine if both mechanism really operate in the animal's DG. If only the direct mechanism
1121 operates, than stimulating the inhibitory interneurons while silencing abGCs will have the
1122 same behavioral effect as silencing abGCs alone. On the other hand, if the only operating
1123 mechanism is the indirect one, then stimulation of inhibitory interneurons is expected to
1124 abolish the effects of abGC silencing (although see Jhonson et al. (2016) for a different
1125 hypothesis which also fits this particular scenario). Finally, if silencing abGC and stimulating
1126 inhibitory interneurons leads to a behavioral performance between that of the control group
1127 and that of the abCG silencing alone, this is indicative that both mechanisms are operating in
1128 the animals DG. Importantly, not only this experiment can evaluate the hypothesis proposed
1129 here, it can also distinguish the contributions of the different putative mechanisms of HN
1130 effect on behavior.

1131 **5. Concluding remarks**

1132 The results of this systematic review and meta-analysis demonstrated that, overall, the
1133 literature point to a robust effect of HN in behavioral pattern separation. Nonetheless, one
1134 must not forget the two studies with results in the opposite direction. Although no pattern
1135 could be found to connect both studies and offer a possible explanation for their results, they
1136 may still have important implications for role of HN on pattern separation and memory.
1137 Additionally, their presence in the literature creates heterogeneity in the results, which is
1138 reflected in the width of the prediction interval of the first analysis (**Figure 2**) compared to the
1139 analysis without the inconsistent results (**Figure 3a**). Therefore, if one considers only the

1140 consistent results, next studies in this topic would be expected to yield results within the
1141 narrow prediction interval observed in **Figure 3a**, but when one considers the studies of
1142 Cushman et al. (2012) and Groves et al. (2013), predictions about results of future studies in
1143 this topic become way less certain and span an interval far wider. As more studies are
1144 performed, we might find some pattern that allow us to understand such sporadic
1145 discrepancies.

1146 We also proposed here a unifying hypothesis that conciliates both direct and indirect
1147 hypotheses through their effects on information content of memories and suggested a way of
1148 testing such hypothesis. Finally, as more studies are carried out, we may be able better
1149 evaluate the validity of the hypothesis discussed here and find more patterns in the data that
1150 may refine the hypothesis or even point to new directions.

1151 **Acknowledgements**

1152 The authors would also like to thank the Brazilian national council for scientific and
1153 technological development (CNPq) and the Coordination for improvement of higher
1154 education personnel (CAPES) for financial support.

1155

1156 **References**

- 1157 1. Aimone, JB, Wiles J, Gage FH. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the
1158 encoding of time in new memories. *Nat.Neurosci.* 9: 723–727.
- 1159 2. Aimone JB, Deng W, Gage FH. 2011. Resolving New Memories: A Critical Look at the
1160 Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron* 70, 589–596.
- 1161 3. Aimone, JB. 2016. Computational Modeling of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb.*
1162 *Perspect. Biol.* 8: a018960.
- 1163 4. Bekinschtein P, Kent, BA, Oomen CA, Clemenson GD, Gage FH, Saksida LM, Bussey
1164 TJ. 2014. Brain-derived neurotrophic factor interacts with adult-born immature cells in the
1165 dentate gyrus during consolidation of overlapping memories: BDNF, Adult Neurogenesis
1166 and Overlapping Memories. *Hippocampus* 24: 905–911.

- 1167 5. Borenstein M. 2009a. Introduction to meta-analysis. Chichester, U.K.: John Wiley &
1168 Sons.
- 1169 6. Borenstein M. 2009b. Effect sizes for continuous data. In H. Cooper, L. V. Hedges, & J.
1170 C. Valentine (Eds.), *The handbook of research synthesis and meta analysis*. New York:
1171 Russell Sage Foundation. 279-293pp.
- 1172 7. Borst A, Theunissen FE. 1999. Information theory and neural coding. *Nat. Neurosci.* 2:
1173 947–957.
- 1174 8. Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S,
1175 Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ. 2009. A Functional Role for Adult
1176 Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science* 325: 210–213.
- 1177 9. Cohen, J. 1988. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Hillside, NJ:
1178 Lawrence Erlbaum Associates.
- 1179 10. Cushman JD, Maldonado J, Kwon EE, Garcia AD, Fan G, Imura T, Sofroniew MV,
1180 Fanselow MS. 2012. Juvenile neurogenesis makes essential contributions to adult brain
1181 structure and plays a sex-dependent role in fear memories. *Front. Behav. Neurosci* 6(3).
- 1182 11. Danielson NB, Kaifosh P, Zaremba JD, Lovett-Barron M, Tsai J, Denny CA, Balough
1183 EM, Goldberg AR, Drew LJ, Hen R, Losonczy A, Kheirbek MA. 2016. Distinct
1184 Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron* 90:
1185 101–112.
- 1186 12. Deng W, Aimone JB, Gage FH. 2010. New neurons and new memories: how does adult
1187 hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews: Neuroscience*
1188 11: 339-350.
- 1189 13. Drew LJ, Fusi S, Hen R. 2016a. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: Why the
1190 dentate gyrus? *Learning and memory* 20: 710-729.
- 1191 14. Drew LJ, Kheirbek MA, Luna VM, Denny CA, Clويدt MA, Wu M., Jain S, Scharfman
1192 HE, Hen R. 2016b. Activation of local inhibitory circuits in the dentate gyrus by adult-
1193 born neurons. *Hippocampus* 26: 763–778.
- 1194 15. Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F. 2008. Spatial Relational Memory
1195 Requires Hippocampal Adult Neurogenesis. *PLoS One.* 3: e1959.
- 1196 16. Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus:
1197 From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167: 897–914.
- 1198 17. Groves JO, Leslie I, Huang GJ, McHugh SB, Taylor , Mott R, Munafò M, Bannerman
1199 DM, Flint J. 2013. Ablating Adult Neurogenesis in the Rat Has No Effect on Spatial
1200 Processing: Evidence from a Novel Pharmacogenetic Model. *PLoS Genet* 9: e1003718.
- 1201 18. Guo W, Allan AM, Zong R., Zhang L, Johnson EB, Schaller EG, Murthy AC, Goggin SL,
1202 Eisch AJ, Oostra BA, Nelson DL, Jin P, Zhao X. 2011. Ablation of Fmrp in adult neural
1203 stem cells disrupts hippocampus-dependent learning. *Nature Medicine* 17: 559–565.
- 1204 19. Hagen BTJ, van Goethem NP, Lagatta DC, Prickaerts J. The object pattern separation
1205 (OPS) task: A behavioral paradigm derived from the object recognition task. 2015.
1206 *Behavioural Brain Research* 285: 44-52.
- 1207 20. Hedges LV, Olkin I. 1985. *Statistical methods for meta-analysis*. Orlando: Academic Press.
- 1208 21. Hernandez-Rabaza V, Llorens-Martin M, Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Arcusa A.
1209 2009. Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but

- 1210 spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal.
1211 Neuroscience 159: 59–68
- 1212 22. Hooijmans CR, Tillema A, Leenaars M, Hoitinga MR. 2010. Laboratory Animals. 44: 170-75.
- 1213 23. Hooijmans CR, Rovers MM, Vries RBM, Leenaars M, Hoitinga MR, Langendam MW. 2014.
1214 BMC Medical Research Methodology 14: a.43.
- 1215 24. Hvoslef-Eide M, Oomen CA. 2016. Adult neurogenesis and pattern separation in rodents:
1216 A critical evaluation of data, tasks and interpretation. Frontiers in Biology. 11(3): 168-
1217 181.
- 1218 25. Ikrar T, Guo N, He K, Besnard A, Levinson S, Hill A, Lee HK, Hen R, Xu X, Sahay A.
1219 2013. Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus. Front. Neural Circuits
1220 7.
- 1221 26. JabRef development team. JabRef 3.6., open source. Web: <https://www.jabref.org/>.
- 1222 27. Johnston ST, Shtrahman M, Parylak S, Gonçalves JT, Gage FH. 2016. Paradox of pattern
1223 separation and adult neurogenesis: A dual role for new neurons balancing memory
1224 resolution and robustness. Neurobiology of Learning and Memory 129: 60–68.
- 1225 28. Kaslin J, Ganz J, Brand M. 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non
1226 mammalian vertebrate brain. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363: 101–122.
- 1227 29. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. Genetic influence on neurogenesis in the
1228 dentate gyrus of adult mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the
1229 United States of America 94(19):10409-10414.
- 1230 30. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, Festing MF, Cuthill IC, Fry D, Hutton J, Altman
1231 DG. 2009. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting
1232 of research using animals. PLoS One 4(11):e7824.
- 1233 31. Kirwan CB, Stark CEL. Overcoming interference. 2007. An fMRI investigation of pattern
1234 separation in the medial temporal lobe. Learning and Memory 14:625–633.
- 1235 32. Leenaars M, Hooijmans CR, Veggel NV, Riet GT, Leeftang M, Hooft L, Wilt GJVD, Tillema
1236 A, Hoitinga MR. 2012. Laboratory Animals 46: 24–31.
- 1237 33. LibreOffice.org. LibreOffice The Document Foundation.
1238 Available: <https://www.libreoffice.org/>. (Accessed 1st July 2016).
- 1239 34. Johnston ST, Shtrahman M, Parylak S, Gonçalves JT, Gage FH. 2016. Paradox of pattern
1240 separation and adult neurogenesis: A dual role for new neurons balancing memory
1241 resolution and robustness. Neurobiol. Learn. Mem. 129: 60–68.
- 1242 35. Kempermann G. 2016. Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. Cold Spring
1243 Harb. Perspect. Biol. 8: a018986.
- 1244 36. Kesner RP, Hui X, Sommer T, Wright C, Barrera VR, Fanselow MS. 2014. The role of
1245 postnatal neurogenesis in supporting remote memory and spatial metric processing:
1246 Neurogenesis And Remote Memory. Hippocampus 24: 1663–1671.
- 1247 37. Lacefield CO, Itskov V, Reardon T, Hen R, Gordon JA. 2012. Effects of adult-generated
1248 granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. Hippocampus 22: 106–
1249 116.
- 1250 38. Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI. 2007. Pattern Separation in the Dentate
1251 Gyrus and CA3 of the Hippocampus. Science 315: 961–966.

- 1252 39. Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D. 2006. Hippocampal neurogenesis is
1253 not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nature Neuroscience*
1254 9:729-731.
- 1255 40. Molina-Navarro MM, Garcia-Verdugo JM. *Neurobiology*. In: Canales JJ. 2016. *Adult*
1256 *Neurogenesis in the Hippocampus*. Academic Press. p.1-18.
- 1257 41. Monje ML, Toda H, Palmer TD. 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal
1258 neurogenesis. *Science* 302: 1760–1765.
- 1259 42. Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, Barrera
1260 VR, Chittajallu R, Iwamoto KS, McBain CJ, Fanselow MS, Tonegawa S. 2012. Young
1261 Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old Granule Cells Facilitate
1262 Pattern Completion. *Cell* 149: 188–201.
- 1263 43. Niibori, Y, Yu TS, Epp JR, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW. 2012. Suppression of
1264 adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in hippocampal CA3
1265 region. *Nat. Commun.* 3:1253.
- 1266 44. Nuzzo R. 2014. *Nature* 506: 150-152.
- 1267 45. Orwin RG. 1983. Fail-safe N for effect size in meta-analysis. *Journal of education*
1268 *statistics* 8(2): 157-159.
- 1269 46. Pan YW, Chan GCK, Kuo CT, Storm DR, Xia Z. 2012. Inhibition of Adult Neurogenesis
1270 by Inducible and Targeted Deletion of ERK5 Mitogen-Activated Protein Kinase
1271 Specifically in Adult Neurogenic Regions Impairs Contextual Fear Extinction and Remote
1272 Fear Memory. *J. Neurosci.* 32: 6444–6455.
- 1273 47. Park EH, Burghardt NS, Dvorak D, Hen R, Fenton AA. 2015a. Experience-Dependent
1274 Regulation of Dentate Gyrus Excitability by Adult-Born Granule Cells. *J. Neurosci.* 35:
1275 11656–11666.
- 1276 48. Park H, Yang J, Kim R, Li Y, Lee Y, Lee C, Park J, Lee D, Kim H, Kim E. 2015b. Mice
1277 lacking the PSD-95–interacting E3 ligase, *Dorfin/Rnf19a*, display reduced adult
1278 neurogenesis, enhanced long-term potentiation, and impaired contextual fear conditioning.
1279 *Scientific Reports* 5: 16410.
- 1280 49. R Development Core Team. 2008. *R: A language and environment for statistical*
1281 *computing*. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-
1282 0, Web: <http://www.R-project.org>.
- 1283 50. Rohatgi A. *WebPlotDigitizer v.3.10*. 2016. Web: <http://arohatgi.info/WebPlotDigitizer>.
- 1284 51. Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O’Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA,
1285 Dranovsky A, Hen R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to
1286 improve pattern separation. *Nature* 472: 466–470.
- 1287 52. Sloviter RS, Brisman JL, 1995. Lateral inhibition and granule cell synchrony in the rat
1288 hippocampal dentate gyrus. *J. Neurosci.* 15:811–820.
- 1289 53. Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron
1290 HA. 2009. Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and
1291 More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *J. Neurosci.* 29: 14484–14495.
- 1292 54. Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH. 2008. Neurons Born in
1293 the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat.Neurosci.* 11: 901–
1294 907.

- 1295 55. Treves A, Tashiro A, Witter ME, Moser EI. 2008. What is the mammalian dentate gyrus
1296 good for? *Neuroscience* 154: 1155–1172.
- 1297 56. Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J.-M., Piazza, P.-V., Koehl, M., Abrous,
1298 D.N., 2012. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination.
1299 *Hippocampus* 22, 292–298. doi:10.1002/hipo.20895
- 1300 57. Veresteyn HM, Sena ES, Egna KJ, Hist TC, Churolov L, Currie GL, Antonic A, Howells
1301 DW, Macleoda MR. 2014. *Journal of Neuroscience Methods*. 221: 92– 102.
- 1302 58. Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. 2006. Inhibition of
1303 neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16:
1304 296–304.
- 1305 59. Wiskott L, Rasch ML, Kempermann G. 2006. A Functional Hypothesis for Adult
1306 Hippocampal Neurogenesis: Avoidance of Catastrophic Interference in the Dentate Gyrus.
1307 *Hippocampus* 16:329–343 .
- 1308 60. Wu, M.V., Hen, R. 2014. Functional dissociation of adult-born neurons along the
1309 dorsoventral axis of the dentate gyrus: Adult Neurogenesis in the Dorsal Vs. Ventral
1310 Dentate Gyrus. *Hippocampus* 24: 751–761.

1311

1312

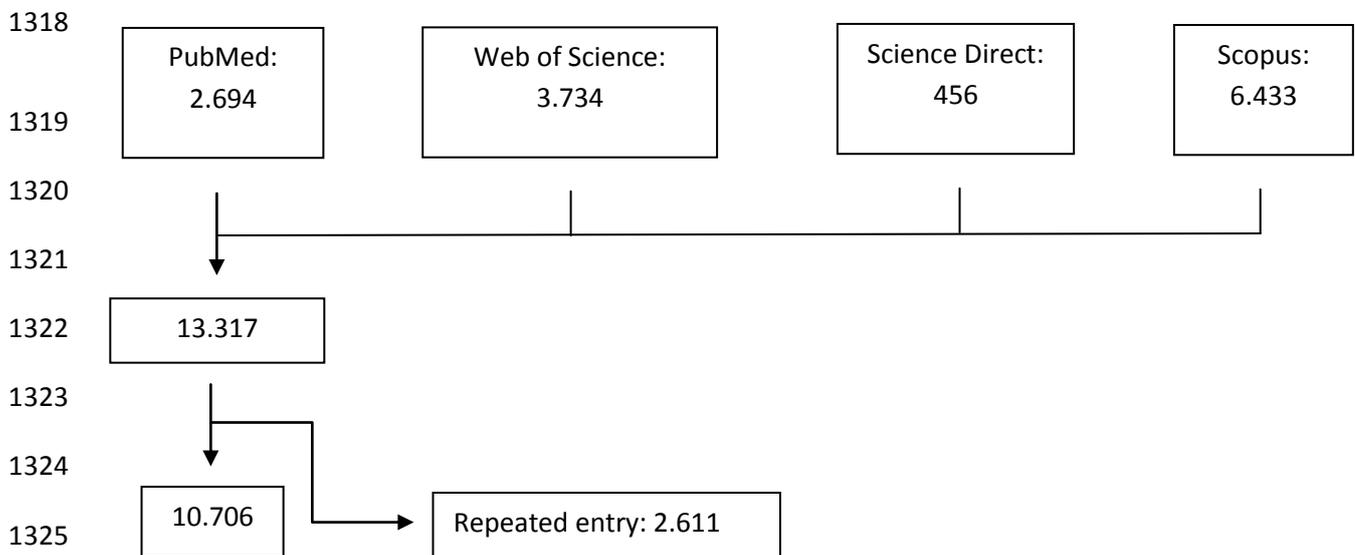
1313

1314

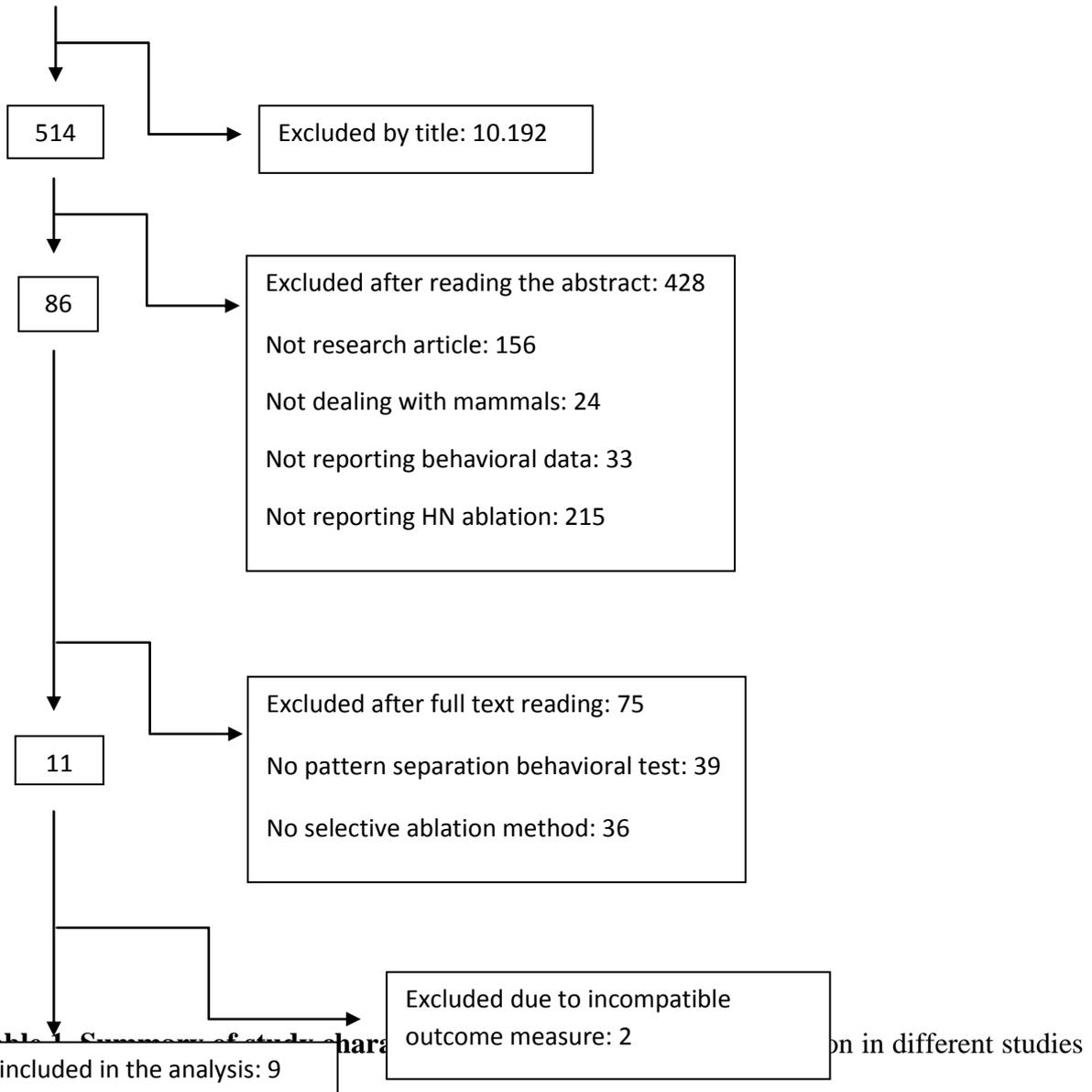
1315

1316 **Figures and Tables**

1317 **Figure 1. Flow chart** representing the process of study selection



1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358



was evaluated using different markers, which are indicated between parenthesis. dnWnt: dominant negative Wnt; rtTA: tetracycline controlled transactivator; Cre: Cre recombinase; CreER: tamoxifen dependent Cre recombinase; GFAP: glial fibrillary acidic protein; Cre; DNMT1: DNA cytosine-methyltransferase 1; TK: thymidine kinase; DCX: doublecortin; CldU: chlorodeoxyuridine; BrdU: bromodeoxyuridine.

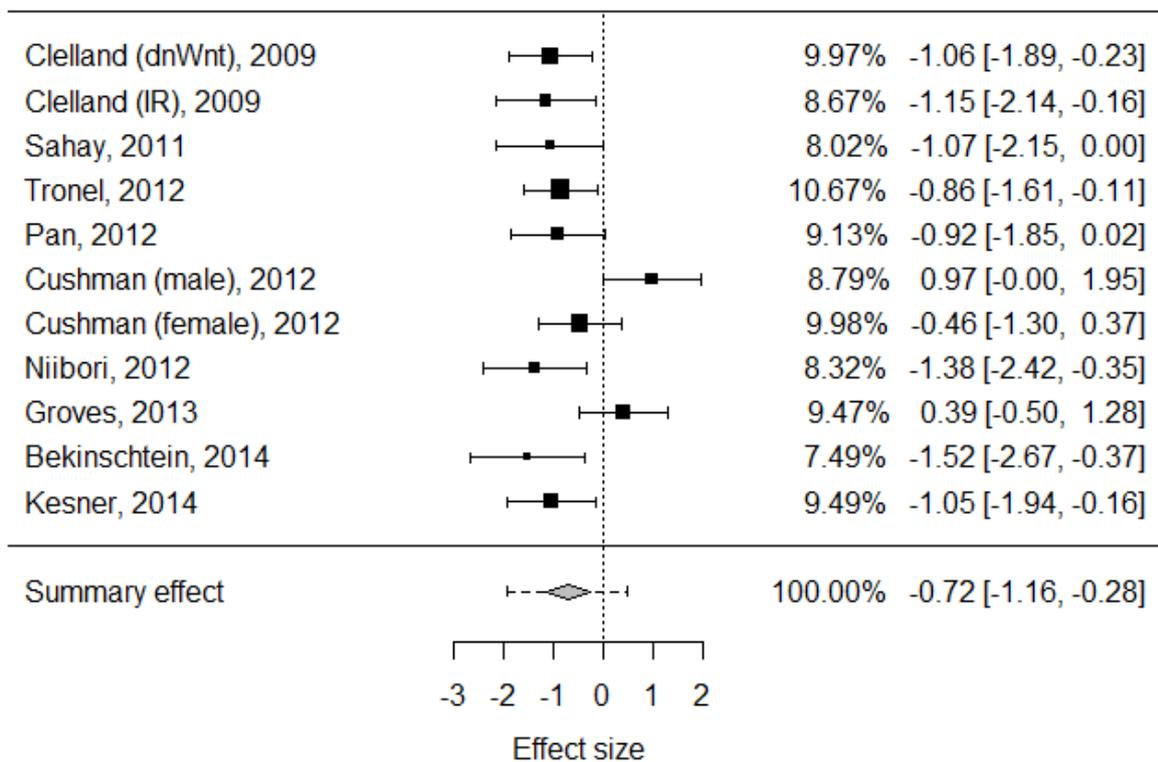
Reference	Species	Strain/Genetic background	Sex	Age at ablation	Method of ablation	Extent of ablation	Time between ablation and testing
Clelland et al., 2009	mice	C57Bl/6	female	8 weeks	Focal X-ray IR	100% (DCX)	2 months
Clelland et al., 2009	mice	C57Bl/6	female	8 weeks	dnWnt	*56% (DCX)	2 months
Sahay et al., 2011	mice	Bax ^{f/f} (C57Bl/6 w/ 129SvEv)	male	10 weeks	Focal X-ray IR	*95% (DCX)	4 months
Tronel et al., 2012	mice	C57Bl/6jxCBA	male	8 weeks	Nestin-rtTA/Bax	*33% (CldU)	9 weeks
Pan et al., 2012	mice	C57Bl/6	male	10-12 weeks	Nestin-CreER/ERK5	*55% (NeuroD)	10 weeks
Cushman et al., 2012	mice	C57Bl/6, BALB/C hybrid	male	At birth	mGFAP-Cre-DNMT1	*90% (BrdU+NeuN)	3-5 months
Cushman et al., 2012	mice	C57Bl/6, BALB/C hybrid	female	At birth	mGFAP-Cre-DNMT1	*90% (BrdU+NeuN)	3-5 months
Niibori et al., 2012	mice	C57Bl/6NTacBr, 129SvEv hybrid	both	8 weeks	TK+/Nestin	*95% (NeuroD)	4 weeks
Nakashiba et al., 2012	mice	C57Bl/6	male	9-12 weeks	Focal X-ray IR	*97% (BrdU)	6 weeks
Groves et al., 2013	rat	Sprague Dawley	--	8 weeks	TK+/GFAP	98.3% (DCX)	9 weeks
Bekinschtein et al., 2014	rat	Long-Evans	male	7-8 weeks	dnWnt	*40% (DCX)	4 weeks
Wu & Hen, 2014	mice	C57Bl6/J	male	8 weeks	Focal X-ray IR	100% (DCX)	6 weeks
Kesner et al., 2014	mice	C57Bl/6, BALB/C hybrid	male	At birth	mGFAP-Cre-DNMT1	100% (BrdU)	8-9 weeks
Reference	Behavioral test	Outcome measure	Outcome measure	Duration of test	Outcome report		
Clelland et al., 2009	DNMP in Radial arms maze	% correct choice	% correct choice	15 days	Combined (all days)		
Clelland et al., 2009	DNMP in Radial arms maze	% correct choice	% correct choice	15 days	Combined (all days)		
Sahay et al., 2011	Contextual fear discrimination	Freezing ratio ((A-B)/(A+B))	Freezing ratio ((A-B)/(A+B))	5 days	Individual days		
Tronel et al., 2012	Contextual fear discrimination	Freezing ratio (A/(A+B))	Freezing ratio (A/(A+B))	13 days	Individual days		
Pan et al., 2012	DNMP in Radial arms maze	% correct choice	% correct choice	5 days	Last day only		
Cushman et al., 2012	Contextual fear discrimination	Freezing ratio (A/(A+B))	Freezing ratio (A/(A+B))	17 days	Individual days		
Cushman et al., 2012	Contextual fear discrimination	Freezing ratio (A/(A+B))	Freezing ratio (A/(A+B))	17 days	Individual days		
Niibori et al., 2012	Contextual fear discrimination	Freezing ratio (A-B)	Freezing ratio (A-B)	3 days	Last day (1day-test)		
Nakashiba et al., 2012	Contextual fear discrimination	% freezing	% freezing	17 days	Individual days		
Groves et al., 2013	DNMP in Radial arms maze	% correct choice	% correct choice	12 days	Combined (all days)		
Bekinschtein et al., 2014	Spontaneous location recognition	Discrimination ratio ((A-B)/(A+B))	Discrimination ratio ((A-B)/(A+B))	8 days	Combined (all days)		
Wu & Hen, 2014	Contextual fear discrimination	% freezing	% freezing	14 days	Individual days		
Kesner et al., 2014	Metric spatial processing	Discrimination ratio ((A-B)/(A+B))	Discrimination ratio ((A-B)/(A+B))	1 day	Last day (1day-test)		

1360

1361 **Table 2. SYRCLE’s risk of bias tool results.** Each criteria corresponds to a measure that
1362 should have been taken to avoid a possible source of bias in the study. A “yes” evaluation
1363 implies no risk of bias in the criterion evaluated and a “no” evaluation implies risk of bias in
1364 that criterion. An “unclear” evaluation, as its name suggests, implies that the risk of bias the
1365 criterion in question could not be evaluated. The table also show the percentage of studies
1366 qualified in each criteria and the unweighted score of each study, which would be used in the
1367 stratified meta-analysis. This unweighted score is computed by the sum of of the grades in
1368 each criteria, with a “yes” counting as 1 point, a “no” counting as -1 and “unclear” counting
1369 as 0.

Reference	Random allocation sequence	Animals similar at baseline	Allocation concealment	Random housing	Blinded investigators	Random outcome assessment
Clelland et al, 2009	No	Unclear	No	No	No	Yes
Sahay et al, 2011	No	Unclear	No	No	No	No
Tronel et al, 2012	No	Unclear	No	No	No	No
Pan et al, 2012	No	Unclear	No	No	No	No
Cushman et al, 2012	Yes	Unclear	Yes	Yes	Yes	Yes
Niibori et al, 2012	No	Unclear	No	No	No	No
Nakashiba et al, 2012	No	Unclear	No	No	No	No
Groves et al, 2013	No	Unclear	No	No	No	No
Bekinschtein et al, 2014	No	Unclear	No	No	No	No
Wu and Hen, 2014	No	Unclear	No	No	No	No
Kesner et al., 2014	No	Unclear	Yes	Yes	Yes	Yes
Qualified studies (%)	0	0	18.18181818	18.18181818	18.18181818	27.27272727
Reference	Blinded result collection	Incomplete data justification	Unbiased conclusions	Other	Unweighted study score	
Clelland et al, 2009	No	Yes	No	No	-5	
Sahay et al, 2011	Yes	No	Yes	No	-5	
Tronel et al, 2012	Yes	Unclear	Yes	No	-4	
Pan et al, 2012	Yes	Unclear	Yes	No	-4	
Cushman et al, 2012	Yes	Unclear	No	No	2	
Niibori et al, 2012	No	Unclear	Yes	No	-6	
Nakashiba et al, 2012	Yes	Yes	Yes	No	-3	
Groves et al, 2013	No	No	Yes	No	-7	
Bekinschtein et al, 2014	No	Yes	Yes	No	-5	
Wu and Hen, 2014	Yes	No	Yes	No	-5	
Kesner et al., 2014	Yes	Yes	Yes	No	5	
Qualified studies (%)	63.63636364	36.36363636	81.81818182	0		

1371 **Figure 2. Forest plot of the first meta-analysis.** The plot shows, from left to right, the study
 1372 IDs, their effect sizes (with squares proportional to the study weights), the study weight and
 1373 the SMD with its 95% confidence interval. Additional information: heterogeneity: $Q(df = 10)$
 1374 $= 23.9096$, $p\text{-value} = 0.0078$; $I^2 = 59\%$; $\tau^2 = 0.32$; 95% prediction interval from SMD = -
 1375 1.910 to SMD = 0.474.
 1376



1377
 1378
 1379
 1380
 1381
 1382
 1383
 1384
 1385

1386 **Figure 3. 3a = Forest plots for the sensitivity analyses.** The plot shows, from left to right,
1387 the study IDs, their effect sizes (with squares proportional to the study weights), the study
1388 weight and the SMD with its 95% confidence interval. **A.** Forest plot for the meta-analysis
1389 without the data from Cushman *et al.* (2012; male dataset) and Groves *et al.* (2013).
1390 Additional information: heterogeneity: $Q(df = 8) = 3.1839$, $p\text{-value} = 0.9223$; $I^2 = 0\%$; $\tau^2 =$
1391 0 ; 95% prediction interval = 95% confidence interval (SMD = -1.305 to SMD = - 0.692). **B.**
1392 Forest plot for the meta-analysis without the two leftmost data points (Niibori *et al.*, 2012;
1393 Beckinschtein *et al.*, 2014). Additional information: heterogeneity: $Q(df = 8) = 19.8213$, $p\text{-}$
1394 $value = 0.0110$; $I^2 = 60.5\%$; $\tau^2 = 0.32$; 95% prediction interval from SMD = -1.789 to SMD
1395 = 0.626.

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

1403

1404

1405

1406

1407

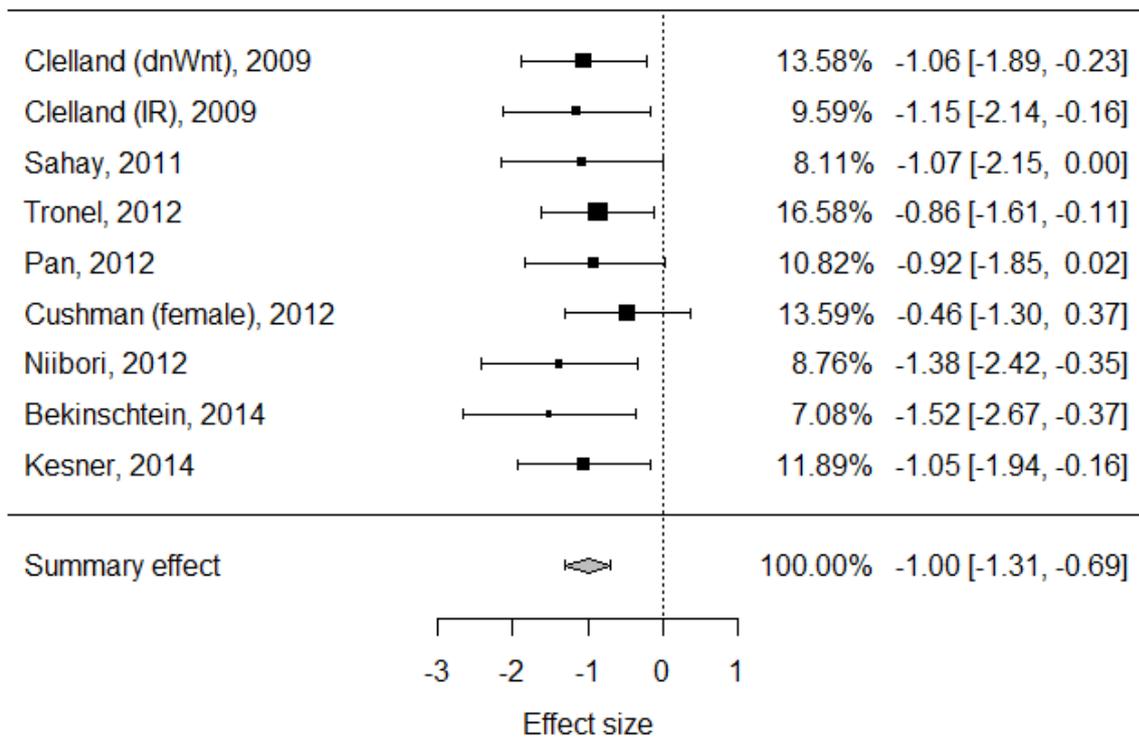
1408

1409

1410

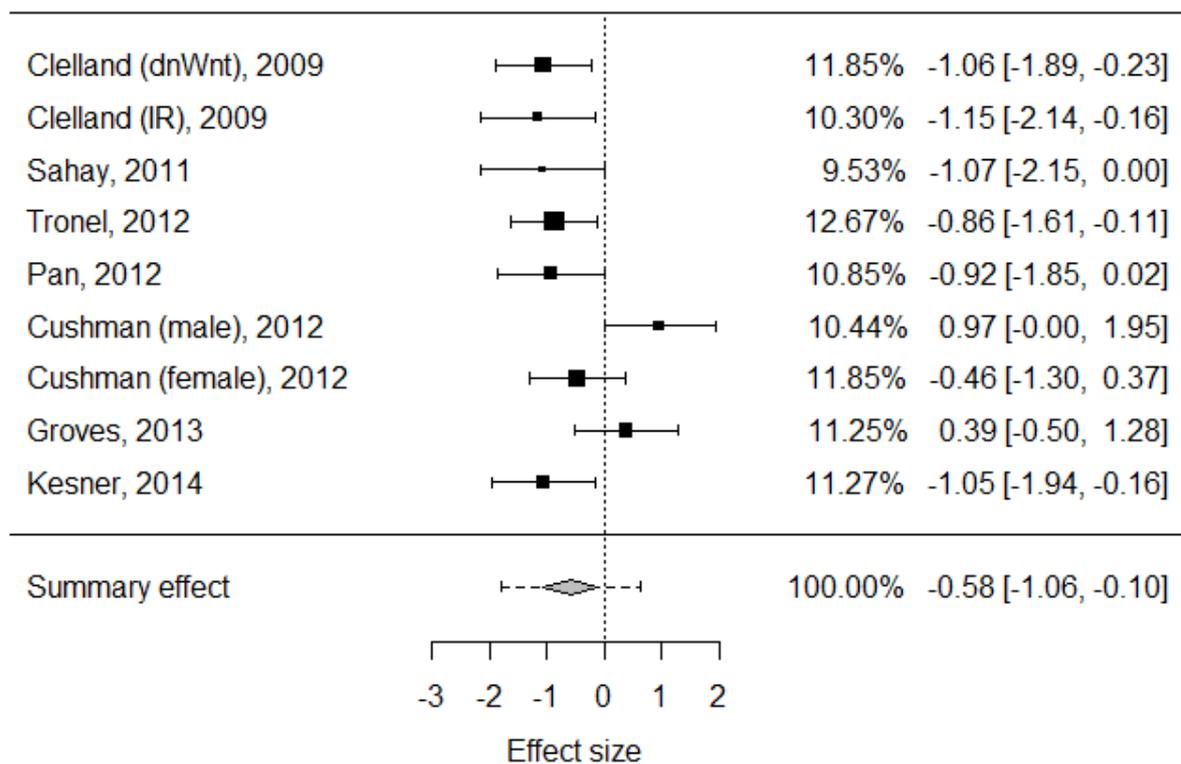
1411

1412 **3A**



1413

1414 **3B**

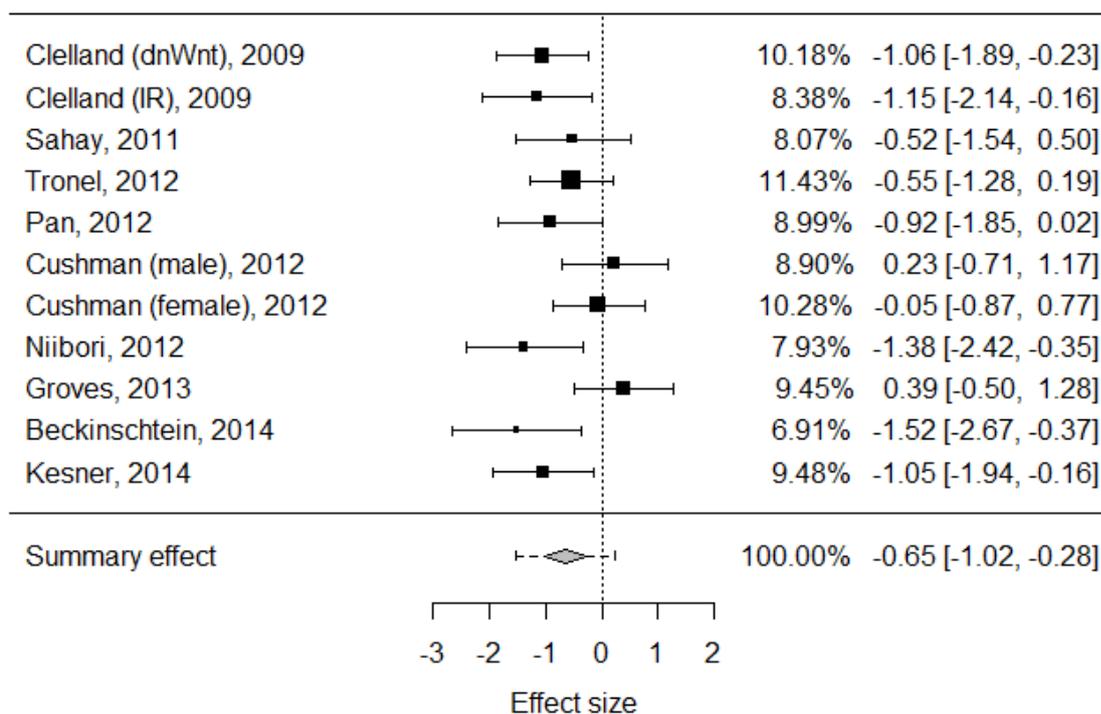


1415

1416 **Figure 4. Forest plot for the meta-analyses with aggregated data from all test days.** The
 1417 plot shows, from left to right, the study IDs, their effect sizes (with squares proportional to the
 1418 study weights), the study weight and the SMD with its 95% confidence interval. **A.** Forest
 1419 plot for the meta-analysis with all studies included. Additional information: heterogeneity:
 1420 $Q(df = 10) = 18.3125$, $p\text{-value} = 0.0499$; $I^2 = 45.4\%$; $\tau^2 = 0.184$; 95% prediction interval
 1421 from $SMD = -1.589$ to $SMD = 0.255$). **B.** Forest plot for the meta-analysis without data from
 1422 Cushman *et al.* (2012) and Groves *et al.* (2013). Additional information: heterogeneity: $Q(df$
 1423 $= 7) = 3.7050$, $p\text{-value} = 0.8131$; $I^2 = 0\%$; $\tau^2 = 0$; 95% prediction interval equals 95%
 1424 confidence interval (from $SMD = -1.289$ to $SMD = -0.635$). **C.** Forest plot for the meta-
 1425 analysis without three leftmost data points (Clelland *et al.*, 2009, IR dataset; Niibori *et al.*,
 1426 2012; Beckinschtein *et al.*, 2014). Additional information: heterogeneity: $Q(df = 7) =$
 1427 11.1511 , $p\text{-value} = 0.1322$; $I^2 = 37.2\%$; $\tau^2 = 0.118$; 95% prediction interval from $SMD = -$
 1428 1.223 to $SMD = 0.332$.

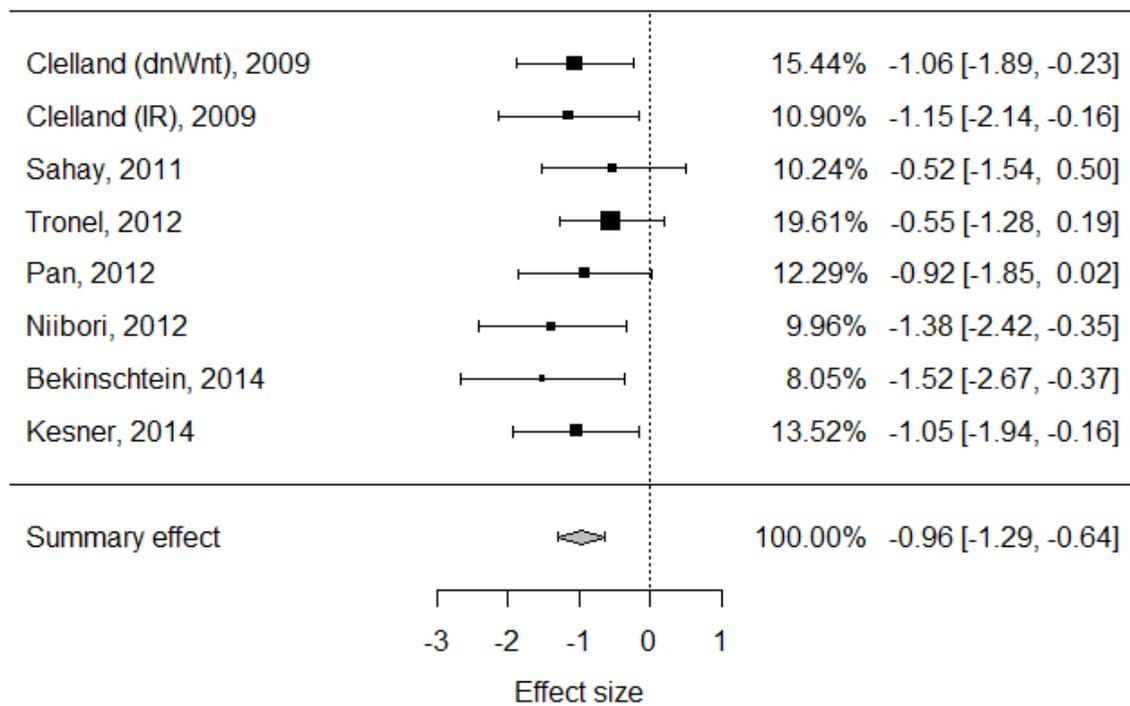
1429

1430 **4A**



1431

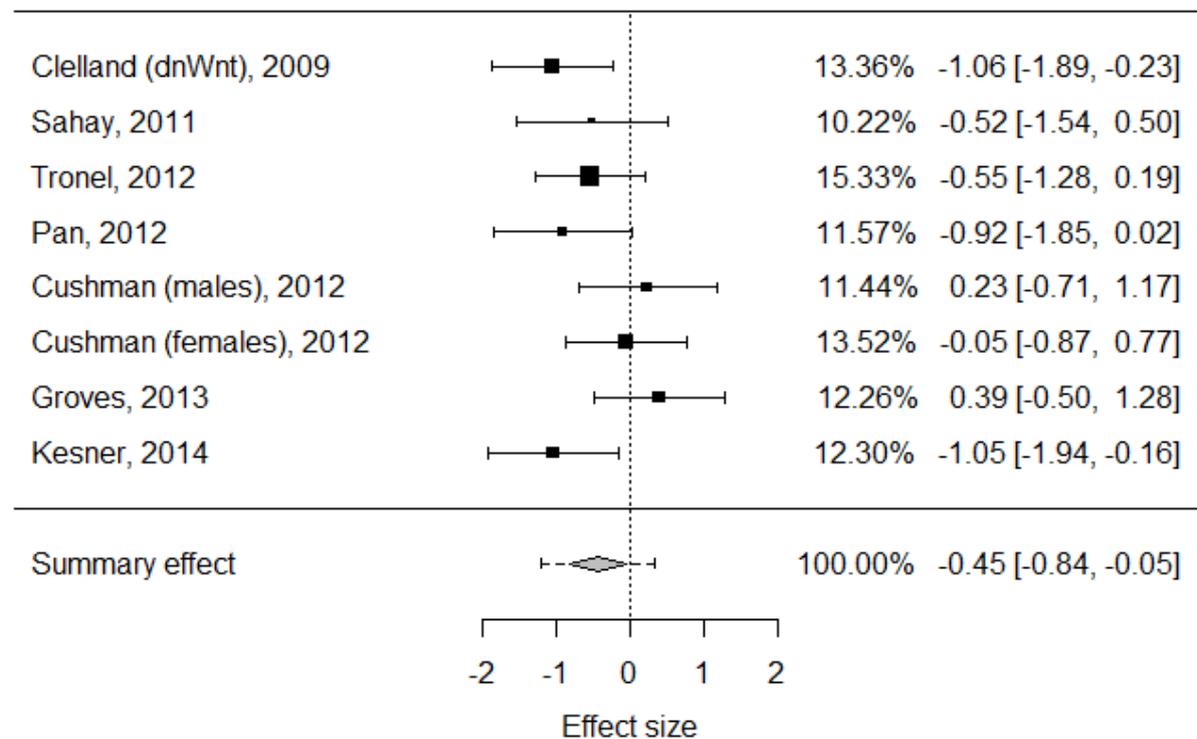
1432 **4B**



1433

1434

1435 **4C**



1436

1437

1438 **Table 3. Fail-safe summary.** The table shows the results of Orwin’s fail-safe N for the meta-
1439 analysis with data from the last day of testing and with aggregated data from all testing days
1440 (for the studies that reported such data), both with and without heterogeneous studies. The
1441 values shown here represent the number of studies one would need to add to the analysis so as
1442 to reduce the unweighted summary effect size to -0.2. Of note, the unweighted summary
1443 effects were very similar to the summary effects obtained in the meta-analyses in all four
1444 cases. Specifically, the unweighted summary effect sizes for the meta-analysis with last day
1445 data were $SMD=-0.736$ with all studies and $SMD=-1.052$ without outliers. For the meta-
1446 analysis with aggregated data, the unweighted summary effect sizes were $SMD= -0.693$ with
1447 all studies and $SMD=-1.016$ without outliers.

1448

Analysis with last day test outcome		
	All studies	No outliers
Adding neutral studies	30	39
Adding Groves et al., (2013)	10	13
Adding Cushman et al., (2012, male data set)	5	7
Analysis with aggregated data		
	All studies	No outliers
Adding neutral studies	27	33
Adding Groves et al., (2013)	9	11
Adding Cushman et al., (2012, male data set)	13	15
Adding Cushman et al., (2012, female data set)	36	44

1449

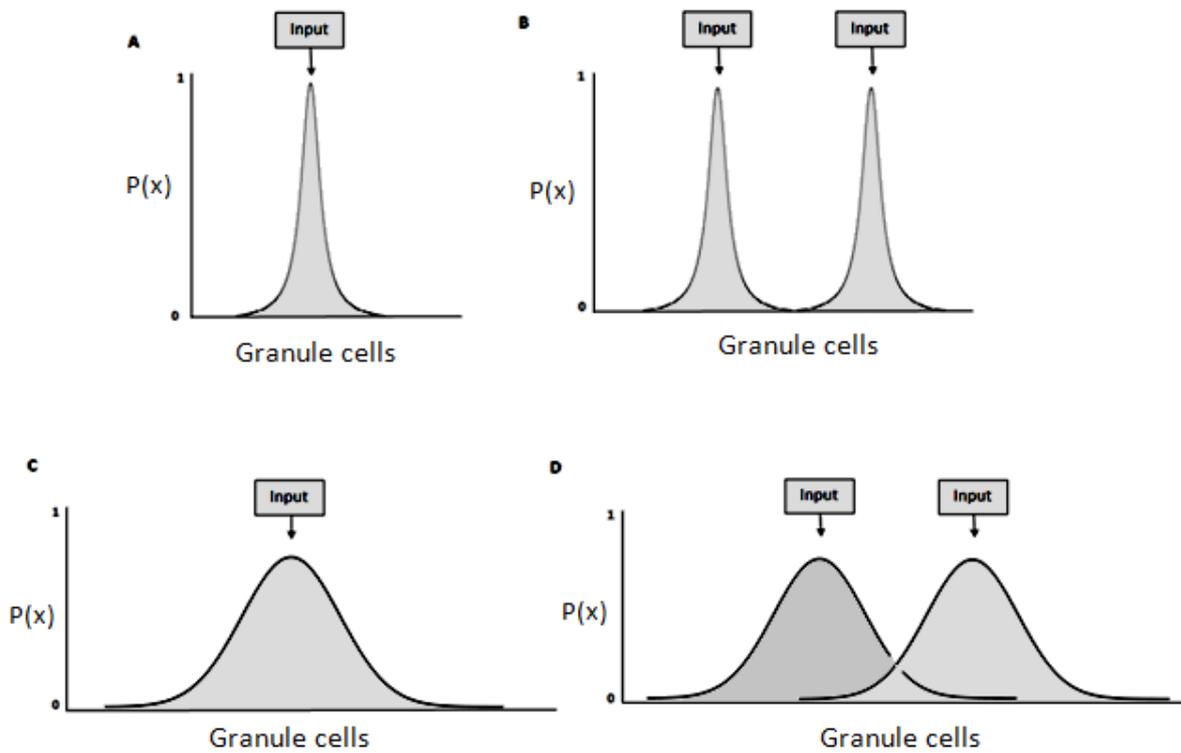
1450

1451

1452

1453 **Figure 5. Illustrative plots** of the firing probabilities of mature granule cells in the dentate
1454 gyrus under different conditions. Different granule cells are represented along the length of
1455 the x-axis. **A:** response of normal well functioning dentate gyrus to a stimulus (e.g., exposure
1456 to a given spatial context). **B:** response of normal dentate gyrus to two similar stimuli. Note
1457 the segregation of firing probability patterns between the two stimuli. **C:** response of a dentate
1458 gyrus without neurogenesis (and therefore with reduced inhibitory tone and reduced lateral
1459 inhibition) to a stimulus. **D:** response of a dentate gyrus without neurogenesis to two similar
1460 stimuli. Note the greater superposition of firing probability patterns.

1461



1462

1463

1464

1465

1466

1467 **Supplementary information**

1468 **Table S1: Search strings used for each database.**

Database	Search string
PubMed	("Neurogenesis"[Mesh] OR Neurogenesis[tiab] OR "New neurons" [tiab] OR adult born neurons[tiab] OR adult neurogenesis[tiab] OR hippocampal neurogenesis[tiab] OR adult born granule cells[tiab] OR adult born dentate granule cells[tiab] OR "Hippocampus"[Mesh] OR Hippocamp*[tiab] OR Hippocampus[tiab] OR "Hippocampal formation" [tiab] OR "Dentate Gyrus"[Mesh] OR Dentate gyrus[tiab]) AND ("Behavior"[Mesh] OR Behavior[tiab] OR Behaviour[tiab] OR Behavi*[tiab] OR "Behavior and Behavior Mechanisms"[Mesh] OR "Pattern separation"[tiab] OR Pattern discrimination[tiab] OR "Spatial discrimination"[tiab] OR "Spatial Behavior"[Mesh] OR "spatial behavior"[tiab] OR "spatial behaviour"[tiab] OR "Spatial Learning"[Mesh] OR "Spatial Learning"[tiab] OR "Spatial Memory"[Mesh] OR "Spatial memory"[tiab] OR "Discrimination learning"[Mesh] OR "discrimination learning"[tiab]) NOT (Review [PT]) plus animal filter from Hooijmans <i>et al</i> (2010)
Web of Science	(Neurogenesis OR "New neurons" OR adult born neurons OR adult neurogenesis OR hippocampal neurogenesis OR adult born granule cells OR adult born dentate granule cells) AND (Neurogenesis OR "New neurons" OR adult born neurons OR adult neurogenesis OR hippocampal neurogenesis OR adult born granule cells OR adult born dentate granule cells OR Hippocamp* OR Hippocampus OR "Hippocampal formation" OR Dentate gyrus) AND (Behavior OR Behaviour OR Behavi* OR "Pattern separation" OR Pattern discrimination OR "Spatial discrimination" OR "spatial behavior" OR "spatial behaviour" OR "Spatial Learning" OR "Spatial memory" OR "discrimination learning") NOT Review
Scopus	(Neurogenesis OR "New neurons" OR "adult born neurons" OR "adult neurogenesis" OR "hippocampal neurogenesis" OR "adult born granule cells" OR "adult born dentate granule cells") AND (hippocamp* OR hippocampus OR "Hippocampal formation" OR "Dentate gyrus") AND (behavior OR behaviour OR behavi* OR "Pattern separation" OR "Pattern discrimination" OR "Spatial discrimination" OR "spatial behavior" OR "spatial behaviour" OR "Spatial Learning" OR "Spatial memory" OR "discrimination learning") AND (LIMIT-TO (PUBYEAR , 2016) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2015) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2013) OR LIMIT-

	<p>TO (PUBYEAR , 2012) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2011) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2010) OR LIMIT-TO (PUBYEAR , 2009)) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar")) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA , "NEUR")) AND (LIMIT-TO (SRCTYPE , "j") OR LIMIT-TO (SRCTYPE , "p")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Article") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Animal Experiment") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Animal Model") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Rat") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Mouse") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Rats") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Mice") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Neurons") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Neurogenesis") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Adult") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Dentate Gyrus") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "Memory") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD , "AnimalBehavior"))</p> <p>AND (EXCLUDE (SUBJAREA , "PSYC") OR EXCLUDE (SUBJAREA , "IMMU")</p> <p>OR EXCLUDE (SUBJAREA , "ARTS") OR EXCLUDE (SUBJAREA , "AGRI") OR EXCLUDE (SUBJAREA , "SOCI")</p> <p>OR EXCLUDE (SUBJAREA , "COMP") OR EXCLUDE (SUBJAREA , "HEAL") OR EXCLUDE (SUBJAREA , "ENVI")</p> <p>OR EXCLUDE (SUBJAREA , "NURS")</p> <p>OR EXCLUDE (SUBJAREA , "MATH") OR EXCLUDE (SUBJAREA , "CENG") OR EXCLUDE (SUBJAREA , "ENGI") OR OR EXCLUDE (SUBJAREA , "PHYS")) AND (EXCLUDE (SUBJAREA , "MEDI"))</p>
Science Direct	<p>(Neurogenesis OR "New neurons" OR "adult born neurons" OR "adult neurogenesis" OR "hippocampal neurogenesis" OR "adult born granule cells" OR "adult born dentate granule cells") AND (Neurogenesis OR "New neurons" OR "adult born neurons" OR "adult neurogenesis" OR "hippocampal neurogenesis" OR "adult born granule cells" OR "adult born dentate granule cells" OR Hippocamp* OR Hippocampus OR "Hippocampal formation" OR "Dentate gyrus") AND (Behavior OR Behaviour OR Behavi* OR "Pattern separation" OR "Pattern discrimination" OR "Spatial discrimination" OR "spatial behavior" OR "spatial behaviour" OR "Spatial Learning" OR "Spatial memory" OR "discrimination learning")</p>

1469

1470

1471

1472

1473

1474 **Annex 1**

1475 **R Codes:**

1476 The reference material used when elaborating the specific codes used here where Del Re
1477 (2014), Del Re(2015), Schwarzer *et al.*, (2015), Wolfgang (2015) and Schwarzer (2016).

1478 All the data sets will be provided in the online version of this article.

1479

1480 **#For the analysis in this paper, two packages were used: metafor and MAd.**

1481 **#Installing packages:**

1482 ->install.packages("metafor")

1483 ->install.packages("MAd")

1484 **#Loading packages**

1485 ->library(metafor)

1486 ->library(MAd)

1487 -----

1488

1489 **#Calculations for meta-analysis with data from final day of testing**

1490 #Loading file with data from the studies ("studydata.csv")

1491 ->studydata= read.csv("studydata.csv")

1492 #Calculating total sample sizes :

```

1493 ->N=with(studydata, Ne + Nc)

1494 #Calculating Hedges g for the studies:

1495 ->SMD=with(studydata, (1-3/(4*N-9))*(Me-Mc)/sqrt(((Ne-1)*Se*Se+(Nc-1)*Sc*Sc)/(N -
1496 2)))

1497 #Calculating standard errors:

1498 ->seSMD=with(studydata,sqrt(N/(Ne * Nc) + SMD*SMD/(2 * (N - 3.94))))

1499 #The vectors produced by the above calculations were extracted to a LibreOffice spreadsheet
1500 ("ESdata.csv") for use in the next calculation.

1501 #Loading data set:

1502 ->ESdata=read.csv("ESdata.csv")

1503 #Performing the first meta-analysis:

1504 ->M1=rma.uni(data=ESdata, yi=SMD, sei=seSMD, method="REML",slab=paste(author,
1505 year, sep=" "),level=95)

1506 #Displaying the results:

1507 ->print(M1)

1508 #Calculating the 95% prediction interval

1509 -> predict(M1)

1510 #Producing the forest plot:

1511 ->forest(M1, addcred=TRUE,showweights=TRUE, level=95, xlab="Effect size",
1512 mlab="Summary effect", lty=c("solid", "dashed"), col=c("gray", "black"), border="black")

```

```
1513 -----
1514
1515 #Sensitivity analysis 1 (excluding outliers)
1516 #For this analysis we use the same data as in ESdata.csv, but excluding the data from
1517 Cushman et al. (2012; male dataset) and Groves et al. (2013). This data set is ESSens1.csv,
1518 which can be loaded using:
1519 ->ESSens1=read.csv("ESSens1.csv")
1520 #Performing the sensitivity analysis 1:
1521 SA1=rma.uni(data=ESSens1, yi=SMD, sei=seSMD, method="REML",slab=paste(author,
1522 year, sep=", "))
1523 #Print results:
1524 ->print(SA1)
1525 #Calculating the 95% prediction interval
1526 ->predict(SA1)
1527 #Make a forest plot:
1528 ->forest(SA1, addcred=TRUE,showweights=TRUE, level=95, xlab="Effect size",
1529 mlab="Summary effect", lty=c("solid", "dashed"), col=c("gray", "black"), border="black")
1530 -----
1531
1532 #Sensitivity analysis 2 (without leftmost data)
```

```

1533 #For this analysis, we will use the data set ESsens2.csv (ESdata.csv without the leftmost data)

1534 #Loading the data:

1535 ESsens2=read.csv("ESsens2.csv")

1536 #Performing the sensitivity analysis:

1537 SA2=rma.uni(data=ESsens2, yi=SMD, sei=seSMD, method="REML",slab=paste(author,
1538 year, sep=", "),level=95)

1539 #Calculating the 95% prediction interval

1540 -> predict(SA2)

1541 #Creating the forest plot:

1542 ->forest(SA2, addcred=TRUE,showweights=TRUE, level=95, xlab="Effect size",
1543 mlab="Summary effect", lty=c("solid", "dashed"), col=c("gray", "black"), border="black")

1544 -----

1545

1546 #Meta-analysis with aggregated data from all time points

1547 #The first step here is to combine data from multiple time points in the studies that reported
1548 data from the individual days.

1549 #Combining SMD from time points:

1550

1551

1552 #Calculating sample size, Hedges g and standard error for each test day in Tronel et al., 2012

```

```

1553 #Loading the file with data from all testing days:

1554 ->Tronel=read.csv("Data Tronel.csv")

1555 #Calculate sample size:

1556 ->N=with(Tronel, Ne + Nc)

1557 #Calculate Hedges g for individual days:

1558 ->SMD=with(Tronel, (1-3/(4*N-9))*(Me-Mc) /sqrt(((Ne-1)*Se*Se+(Nc-1)*Sc*Sc)/(N - 2)))

1559 #Calculate standard errors:

1560 ->seSMD=with(Tronel, sqrt(N/(Ne * Nc) + SMD*SMD/(2 * (N - 3.94))))

1561 #Input the above calculated values in a file and calculate the aggregated effect size and its
1562 variance:

1563 ->aggTronel=read.csv("agg Tronel.csv")

1564 ->Tronelagg=agg(id=id, es=g, var=var.g, n.1= nT, n.2=nC, cor=1, method="BHHR",
1565 data=aggTronel)

1566

1567

1568 # Calculating sample size, Hedges g and standard error for each test day in Sahay et al., 2011

1569 #Loading data set with data from individual days of testing:

1570 ->Sahay=read.csv("Data Sahay.csv")

1571 #Calculate sample size:

```

```

1572 ->N=with(Sahay, Ne + Nc)

1573 #Calculate Hedges g for individual days:

1574 ->SMD=with(Sahay, (1-3/(4*N-9))*(Me-Mc)/sqrt(((Ne-1)*Se*Se+(Nc-1)*Sc*Sc)/(N - 2)))

1575 #Calculate standard errors:

1576 ->seSMD=with(Sahay, sqrt(N/(Ne * Nc) + SMD*SMD/(2 * (N - 3.94))))

1577 #Input the above calculated values in a file and calculate the aggregated effect size and its
1578 variance:

1579 ->aggSahay=read.csv("agg Sahay.csv")

1580 ->Sahayagg=agg(id=id, es=g, var=var.g, n.1= nT, n.2=nC, cor=1, method="BHHR",
1581 data=aggSahay)

1582

1583

1584 # Calculating sample size, Hedges g and standard error for each test day in Cushman et al.,
1585 2012 (male data set)

1586 #Loading data set with data from individual days of testing:

1587 ->Cushm=read.csv("Data Cushman males.csv")

1588 #Calculating sample sizes:

1589 ->N=with(Cushm, Ne + Nc)

1590 #Calculating Hedges g for individual days:

1591 ->SMD=with(Cushm,(1-3/(4*N-9))*(Me-Mc)/sqrt(((Ne-1)*Se*Se+(Nc-1)*Sc*Sc)/(N - 2)))

```

```

1592 ->seSMD=with(Cushm, sqrt(N/(Ne*Nc) + SMD*SMD/(2 * (N - 3.94))))
1593 #Input the above calculated values in a file and calculate the aggregated Hedges g
1594 #Load the file:
1595 ->aggCushm=read.csv("agg Cushm.csv")
1596 #Input the above calculated values in a file and calculate the aggregated effect size and its
1597 variance:
1598 ->Cushmagg=agg(id=id, es=g, var=var.g, n.1= nT, n.2=nC, cor=1, method="BHHR",
1599 data=aggCushm)
1600
1601 # Calculating sample size, Hedges g and standard error for each test day in Cushman et al.,
1602 2012 (female data set)
1603 #Loading the data:
1604 ->Cushf=read.csv("Data Cushman females.csv")
1605 #Calculating sample sizes:
1606 ->N=with(Cushf, Ne + Nc)
1607 #Calculating Hedges g for individual days:
1608 ->SMD=with(Cushf,(1-3/(4*N-9))*(Me-Mc)/sqrt(((Ne-1)*Se*Se+(Nc-1)*Sc*Sc)/(N - 2)))
1609 #Calculating standard errors:
1610 seSMD=with(Cushf, sqrt(N/(Ne * Nc) + SMD*SMD/(2 * (N - 3.94))))

```

```

1611 #Input the above calculated values in a file and calculate the aggregated effect size and its
1612 variance:
1613 ->aggCushf=read.csv("agg Cushf.csv")
1614 ->Cushfagg=agg(id=id, es=g, var=var.g, n.1= nT, n.2=nC, cor=1, method="BHHR",
1615 data=aggCushf)
1616 -----
1617
1618 #Sensitivity analysis from aggregated effect sizes
1619
1620 #With outliers
1621 #For this analysis, we will be using a data set containing part of the data in ES.csv, but
1622 replacing individual data with aggregated data (and converting the variances calculated above
1623 to standard errors of the effect size).
1624 #Loading the data:
1625 ->Dataagg=read.csv("Dataagg.csv")
1626 #Performing the sensitivity analysis:
1627 Agg=rma.uni(data=Dataaggtest, yi=SMD, sei=seSMD, method="REML",slab=paste(author,
1628 year, sep=", "))
1629 #Print the results:
1630 ->print(Agg)

```

```

1631 #Calculating the 95% prediction interval

1632 -> predict(Agg)

1633 #Make a forest plot:

1634 ->forest(Agg, addcred=TRUE,showweights=TRUE, level=95, xlab="Effect size",
1635 mlab="Summary effect", lty=c("solid", "dashed"), col=c("gray", "black"), border="black")

1636

1637

1638 #Without all outliers

1639 #Loading the data

1640 Dataagg2=read.csv("Dataagg2.csv")

1641 #Performing the sensitivity analysis:

1642 ->Agg2=rma.uni(data=Dataagg2, yi=SMD, sei=seSMD, method="REML",slab=paste(author,
1643 year, sep=", "))

1644 #Printing the results:

1645 ->print(Agg2)

1646 #Calculating the 95% prediction interval

1647 ->predict(Agg2)

1648 #Making a forest plot:

1649 ->forest(Agg2, addcred=TRUE,showweights=TRUE, level=95, xlab="Effect size",
1650 mlab="Summary effect", lty=c("solid", "dashed"), col=c("gray", "black"), border="black")

```

```

1651
1652
1653 #Without leftmost data
1654 Loading the data
1655 Dataagg3=read.csv("Dataagg3.csv")
1656 ->Agg3=rma.uni(data=Dataagg3, yi=SMD, sei=seSMD, method="REML",slab=paste(author,
1657 year, sep=", "))
1658 #Printing the results:
1659 ->print(Agg2)
1660 #Calculating the 95% prediction interval
1661 ->predict(Agg3)
1662 #Make a forest plot:
1663 ->forest(Agg3, addcred=TRUE,showweights=TRUE, level=95, xlab="Effect size",
1664 mlab="Summary effect", lty=c("solid", "dashed"), col=c("gray", "black"), border="black")
1665 -----
1666 #Fail safe N
1667 #With outliers:
1668 #Calculate sample sizes, effect sizes and standard errors:
1669 ->N=with(studydata, Ne + Nc)

```

```

1670 ->SMD=with(studydata,(1-3/(4*N-9))*(Me-Mc)/sqrt(((Ne-1)*Se*Se+(Nc-1)*Sc*Sc)/(N
1671 2)))
1672 ->seSMD=with(studydata,sqrt(N/(Ne * Nc) + SMD*SMD/(2 * (N - 3.94))))
1673 ->fsn(yi=SMD, sei=seSMD, type="Orwin", target=-0.2)
1674 .....
1675
1676 #Without outliers:
1677 #Load data set with study data (like data1.csv) but without the outliers:
1678 ->studydata2=read.csv("studydata2.csv")
1679 #Calculate sample sizes, effect sizes and standard errors:
1680 ->N=with(studydata2, Ne + Nc)
1681 ->SMD=with(studydata2,(1-3/(4*N-9))*(Me-Mc)/sqrt(((Ne-1)*Se*Se+(Nc-1)*Sc*Sc)/(N
1682 2)))
1683 ->seSMD=with(studydata2,sqrt(N/(Ne * Nc) + SMD*SMD/(2 * (N - 3.94))))
1684 #Calculate fail-safe N
1685 ->fsn(yi=SMD, sei=seSMD, type="Orwin", target=-0.2)
1686 .....
1687
1688 #Fail safe with outliers, adding Cushman et al. (2012, male data set)

```

```

1689 #Using the FSN formula directly:

1690 ->FSN=((11*(-0.7364+0.2))/(-0.2-0.9471))

1691 #where 0.7364 is the unweighted mean of the study effect sizes, taken from the fsn function
1692 used above.

1693 #print the result:

1694 ->print(FSN)

1695

1696 .....

1697

1698 # Fail safe with outliers, adding Groves et al. (2013)

1699 #Using the FSN formula directly:

1700 ->FSN=((11*(-0.7364+0.2))/(-0.2-0.3907))

1701 #print the result:

1702 ->print(FSN)

1703

1704 .....

1705

1706 # Fail safe without outliers, adding Cushman et al. (2012, male data set)

1707 #Using the FSN formula directly:

```

```

1708 ->FSN=((9*(-1.0517+0.2))/(-0.2-0.9471))

1709 #print the result:

1710 ->print(FSN)

1711 .....

1712

1713 # Fail safe without outliers, adding Groves et al. (2013)

1714 #Using the FSN formula directly:

1715 ->FSN=((9*(-1.0517+0.2))/(-0.2-0.3907))

1716 #print the result:

1717 ->print(FSN)

1718

1719 -----

1720

1721 #Fail-safe N with aggregated data, with outliers, adding neutral studies

1722 #Using the FSN formula directly:

1723 ->FSN=((11*(-0.687+0.2))/(-0.2))

1724 #print the result:

1725 ->print(FSN)

1726 .....

```

```
1727

1728 #Fail-safe N with aggregated data, without outliers, adding neutral studies

1729 #Using the FSN formula directly:

1730 ->FSN=((8*(-1.016+0.2))/(-0.2))

1731 #print the result:

1732 ->print(FSN)

1733

1734

1735 #Fail-safe N with aggregated data, with outliers, adding Cushman et al. (2012, male data set)

1736 #Using the FSN formula directly:

1737 ->FSN=((11*(-0.687+0.2))/(-0.2-0.23))

1738

1739 #print the result:

1740 ->print(FSN)

1741

1742 #Fail-safe N with aggregated data, with outliers, adding Cushman et al. (2012, female data
1743 set)

1744 #Using the FSN formula directly:

1745 ->FSN=((11*(-0.687+0.2))/(-0.2+0.05))
```

```
1746 #print the result:
1747 ->print(FSN)
1748
1749 .....
1750
1751 #Fail-safe N with aggregated data, with outliers, adding Groves et al. (2013)
1752 #Using the FSN formula directly:
1753 ->FSN=((11*(-0.687+0.2))/(-0.2-0.3907))
1754 #print the result:
1755 ->print(FSN)
1756 .....
1757
1758 #Fail-safe N with aggregated data, without outliers, adding Cushman et al. (2012, male data
1759 set)
1760 #Using the FSN formula directly:
1761 ->FSN=((8*(-1.016+0.2))/(-0.2-0.23))
1762 #print the result:
1763 ->print(FSN)
1764
```

1765 #Fail-safe N with aggregated data, without outliers, adding Cushman *et al.* (2012, female data
1766 set)

1767 #Using the FSN formula directly:

1768 ->FSN=((8*(-1.016+0.2))/(-0.2+0.05))

1769 #print the result:

1770 ->print(FSN)

1771

1772

1773 #Fail-safe N with aggregated data, without outliers, adding Groves *et al.* (2013)

1774 #Using the FSN formula directly:

1775 ->FSN=((8*(-1.016+0.2))/(-0.2-0.3907))

1776 #print the result:

1777 ->print(FSN)

1778=====

1779 **Supplementary references**

1780 Del Re, A.C., 2015. A practical tutorial on conducting meta-analysis in R. *The Quantitative*
1781 *Methods for Psychology* 11, 37–50.

1782 Del Re, A.C., Hoyt, W.T., Del Re, M.A., 2014. Package “MAd.” Comprehensive R Archive
1783 Network. <https://cran.r-project.org/web/packages/MAd/MAd.pdf>.

1784 Hooijmans CR, Tillema A, Leenaars M, Hoitinga MR. *Laboratory Animals*. 2010, v.44: 170-
1785 75.

1786 Schwarzer, G., 2016. Package “meta”. Comprehensive R Archive Network. [https://cran.r-](https://cran.r-project.org/web/packages/metafor/metafor.pdf)
1787 [project.org/web/packages/metafor/metafor.pdf](https://cran.r-project.org/web/packages/metafor/metafor.pdf).

1788
1789 Schwarzer, G., Carpenter, J.R., Rücker, G., 2015b. Meta-Analysis with R. Switzerland:
1790 Springer International Publishing. 252p.
1791
1792 Viechtbauer, W., Viechtbauer, M.W., 2015. Package “metafor.” The Comprehensive R
1793 Archive Network. <http://cran.r-project.org/web/packages/metafor/metafor.pdf>.
1794

1795

1796

1797

1798

1799

1800

1801

1802

1803

1804

1805

1806

1807

1808

1809 **Discussão geral**

1810 **Os resultados em contexto: holismo x reducionismo**

1811 Nas últimas décadas tem havido um intenso debate entre defensores de duas abordagens
1812 científicas: o holismo e o reducionismo (Capra, 1996). O reducionismo tem sido, por muitos
1813 séculos, uma característica chave da abordagem científica. De modo geral, o reducionismo
1814 consiste no uso do raciocínio analítico, dividindo o fenômeno investigado em seus
1815 componentes e, em seguida, estudando cada um desses componentes para entender o fenômeno
1816 como um todo. A filosofia por trás do reducionismo foi fortemente ligada à visão Newtoniana
1817 do universo mecânico. Outro ponto que por muito tempo favoreceu o reducionismo foi o
1818 simples fato de que a mente humana é limitada, de modo que assimilar, de uma só vez, todos os
1819 componentes e interações de fenômenos complexos é simplesmente impossível, sendo muito
1820 mais prático estudar cada parte separadamente. Porém, com o advento de áreas da matemática
1821 como a teoria do caos e a teoria dos grafos, além do surgimento de computadores com vasto
1822 poder de processamento, o palco estava montado para o surgimento do holismo (Gleick, 1988).
1823 O holismo defende o estudo do fenômeno como um todo desde o princípio, sem dividi-lo em
1824 componentes, tendo como base o argumento de que, muitas vezes, o todo mais do que a soma
1825 das partes devido a propriedades emergentes que surgem da interação entre os componentes do
1826 fenômeno. Logo, de acordo com o holismo, o foco deveria estar nas interações entre os
1827 componentes do fenômeno e não nos componentes em si. Entender os componentes não
1828 implica entender o fenômeno, assim como entender uma formiga não implica entender a
1829 dinâmica de um formigueiro e entender as bases químicas das biomoléculas não implica
1830 entender o que é vida, nem sequer implica compreender como uma célula funciona.

1831 Desde o surgimento da perspectiva holista houve críticos de defensores de ambos os
1832 lados. Alguns autores, porém, defendem que, na realidade, as duas abordagens são faces de

1833 uma mesma ideia, e que o holismo nada mais é do que uma extensão do reducionismo,
1834 reduzindo o fenômeno a uma rede de interações ao invés de componentes (Pross, 2014). No
1835 fim, as duas abordagens parecem ser complementares. Assim como teoria e experimento são
1836 necessários na abordagem científica, reducionismo e holismo são ambos necessários para
1837 entender qualquer fenômeno complexo. Afinal, as interações entre os componentes podem
1838 determinar as propriedades do fenômeno como um todo, mas são as propriedades dos
1839 componentes que determinam a natureza das interações entre eles.

1840 A interação entre holismo e reducionismo toma uma nova forma quando nos deparamos
1841 com o estudo de fenômenos fisiológicos. Tomemos como exemplo o estudo de um
1842 comportamento, como é o caso do presente trabalho. Qualquer comportamento é uma
1843 manifestação resultante de ação de diversos processos fisiológicos, desde a percepção do
1844 estímulo que desencadeou a resposta do animal e seu processamento pelo sistema nervoso até a
1845 geração de uma resposta com base na contração coordenada de diversos músculos. Todos esses
1846 processos (enunciados aqui de maneira incrivelmente simplificada) dependem da atividade de
1847 inúmeras células em diferentes tecidos, órgãos e sistemas. Esse é um fenômeno que atravessa
1848 todos os níveis de organização biológica e só pode ser plenamente compreendido com uma
1849 combinação de raciocínio analítico e holístico, analisando cada nível de organização e, em
1850 seguida, integrando as informações obtidas em cada nível para formar uma visão completa do
1851 fenômeno.

1852 Nas próximas seções, tentaremos compreender o papel da neurogênese no
1853 funcionamento da formação hipocampal analisando o fenômeno a nível celular, a nível de
1854 circuitos neurais e a nível de comportamento, integrando esses aspectos para tentar
1855 compreender como as propriedades bioquímicas e biofísicas dos novos neurônios permitem que

1856 eles afetem os processos computacionais da formação hipocampal levando aos efeitos
1857 comportamentais observados.

1858 **De moléculas a células: as bases bioquímicas e biofísicas dos neurônios imaturos**

1859 Durante uma janela crítica no processo de maturação (entre a 4^o e 8^o semanas em
1860 camundongos) os novos neurônios apresentam propriedades que tornam seu funcionamento
1861 distinto dos neurônios maduros (Sahay *et al.*, 2011b). Os neurônios imaturos possuem uma
1862 maior resistência de entrada, o que reduz a corrente necessária para gerar uma determinada
1863 diferença de voltagem (Aguilar-Arredondo *et al.*, 2015). Um fator relacionado a isso é a
1864 ausência, em neurônios imaturos, de canais retificadores constitutivos de potássio, os quais
1865 permitem a entrada de potássio na célula e contribuem para a baixa excitabilidade dos
1866 neurônios maduros (Kirschen & Di Antonio, 2016). Além disso, os novos neurônios possuem
1867 um menor limiar para a indução de potenciação de longa duração devido a presença de
1868 receptores de glutamato contendo a subunidade GluN2B, os quais requerem uma menor
1869 amplitude de despolarização para sua ativação, além de apresentarem inativação mais lenta
1870 (Kirschen & Di Antonio, 2016). Além disso, os neurônios imaturos parecem ser relativamente
1871 insensíveis à inibição GABAérgica (Marin-Burgin *et al.*, 2012). Todos esses fatores
1872 combinados fazem com que os neurônios imaturos sejam mais excitáveis e apresentem campos
1873 espaciais mais amplos que os neurônios maduros (Danielsson *et al.*, 2016).

1874 **De neurônios a redes neurais: neurônios imaturos no circuito hipocampal**

1875 Durante o processo de maturação, os novos neurônios seguem um de dois destinos
1876 possíveis: morrer ou se integrar no circuito do hipocampal (revisado em Gonçalves *et al.*,
1877 2016). Uma parte substancial dos novos neurônios toma o primeiro rumo e os restantes se
1878 tornam células granulosas do giro dentado. O processo de integração dos novos neurônios no

1879 circuito hipocampal envolve competição com neurônios maduros por sinapses aferentes e
1880 eferentes (Bergami & Berninger, 2012). O impacto dessa competição por sinapses (e a
1881 subsequente mudança no padrão de conectividade nas regiões da rede afetadas) vem sendo
1882 fonte de diversas especulações. Uma das principais hipóteses a esse respeito é que a mudança
1883 nos padrões de conexão auxilie no processo de separação de padrões, pois faria com que
1884 estímulos similares apresentados com um intervalo de tempo entre si fossem representados por
1885 conjuntos diferentes de células (Aimone, 2016). Outra possível consequência desse
1886 remodelamento seria o esquecimento de memórias antigas (Akers *et al.*, 2013). A maioria
1887 dessas consequências, porém, foram inferidas com base em modelos computacionais de redes
1888 neurais. Logo, uma limitação importante para ter em mente é o problema de proporção. Em
1889 geral, modelos de redes neurais possuem um número de unidades computacionais muito menor
1890 do que o número de neurônios principais no giro dentado. Consequentemente, adição de novos
1891 neurônios nesses modelos (e, portanto, a extensão do remodelamento de sinapses) é
1892 proporcionalmente maior do que no giro dentado (Aimone, 2016). Assim, o real impacto da
1893 adição de novos neurônios no conectoma do giro dentado permanece incerto.

1894 Uma vez incorporada ao giro dentado, a população de neurônios imaturos
1895 apresenta atividade proporcionalmente maior do que a população de neurônios maduros
1896 (Danielsson *et al.*, 2016). As possíveis consequências dessa situação levaram às duas classes de
1897 hipóteses a respeito do efeito dos novos neurônios no circuito hipocampal, as hipóteses diretas
1898 e indiretas, como discutido anteriormente. Avaliar experimentalmente essas hipóteses de
1899 maneira direta é uma tarefa extremamente complicada devido a questões metodológicas. A
1900 hipótese direta é particularmente difícil de avaliar, pois para tanto seria necessário medir o
1901 quanto de informação os neurônios imaturos contribuem para as memórias sendo armazenadas.
1902 Por outro lado, a hipótese indireta tem sido mais amena à avaliação experimental. Graças a

1903 isso, hipótese de que os neurônios imaturos modulam a atividade do giro dentado tem tido uma
1904 aceitação cada vez maior devido ao acúmulo de evidências a seu favor nos últimos anos.

1905 Sabe-se que os novos neurônios desenvolvem sinapses funcionais com interneurônios
1906 inibitórios durante o período crítico da maturação (tanto diretamente quanto indiretamente via
1907 células de Mossy)(Ikar *et al.*, 2013) e estudos mostraram que a ativação dos neurônios imaturos
1908 leva à ativação dos circuitos inibitórios no giro dentado (Drew *et al.*, 2016b). Outros estudos
1909 mostraram que alterações nos níveis de neurogênese levam a alterações na atividade do giro
1910 dentado em resposta à estimulação elétrica em lâminas de hipocampo (Ikar *et al.*, 2013) e que
1911 ablação da neurogênese leva ao aumento da atividade espontânea no giro dentado de
1912 camundongos anestesiados (Lacefield *et al.*, 2012). Por fim, um outro estudo demonstrou que
1913 ablação da neurogênese leva a um aumento no acoplamento entre potenciais excitatórios pós-
1914 sinápticos e potenciais de ação nos neurônios do giro dentado, indicando um aumento na
1915 excitabilidade dos neurônios maduros (Park *et al.*, 2015).

1916 Apesar de haverem diversas evidências dando suporte à hipótese indireta, tais
1917 experimentos não excluem a possibilidade de que os neurônios imaturos estejam também
1918 contribuindo diretamente como unidades computacionais. De fato, elaborar experimentos para
1919 diferenciar entre as duas hipóteses é extremamente difícil devido às previsões similares feitas
1920 por ambas a respeito do comportamento dos animais, além do fato de que as hipóteses não são
1921 mutuamente exclusivas (Johnston *et al.*, 2016; porém, veja Park *et al.*, 2015 para uma opinião
1922 contrária). A relação entre as duas hipóteses será elaborada mais adiante; antes, porém, é
1923 necessário revisar as evidências comportamentais sobre o papel dos novos neurônios.

1924 **Neurogênese, comportamento e problemas de interpretação**

1925 Os resultados da meta análise demonstraram que sete dos nove trabalhos analisados
1926 apontam para um efeito negativo forte e consistente da ablação da neurogênese no desempenho
1927 dos animais em testes comportamentais de separação de padrões (Clelland *et al.*, 2009; Sahay
1928 *et al.*, 2011a; Niibori *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Tronel *et al.*, 2012; Bekinschtein *et al.*,
1929 2014; Kesner *et al.*, 2014). Outros dois trabalhos (que não puderam ser incluídos na análise
1930 devido a medidas comportamentais incompatíveis) também relatam efeitos negativos da
1931 ablação da neurogênese no comportamento, apesar de não ser possível averiguar o tamanho
1932 desses efeitos (Nakashiba *et al.*, 2012; Wu & Hen, 2014).

1933 Houve, porém, dois trabalhos com resultados na direção oposta, mostrando uma
1934 melhora no desempenho dos animais em testes de separação de padrões após a ablação da
1935 neurogênese (Cushman *et al.*, 2012; Groves *et al.*, 2013). Tais trabalhos parecem incompatíveis
1936 com o resto da literatura e não parece haver dados suficientes para explicar essas
1937 inconsistências, visto que nenhum padrão pode ser encontrado em nenhum dos possíveis
1938 fatores causadores de heterogeneidade considerados. Além disso, nenhuma das explicações
1939 propostas pelos autores desses dois trabalhos para explicar seus resultados foi satisfatória
1940 quando analisada no contexto geral da literatura, pois as hipóteses levantadas por cada autor
1941 são capazes de explicar apenas os seus dados, sendo inconsistentes com o resto da literatura.
1942 Cushman *et al.* (2012) seguiu a linha de alguns estudos com modelagem computacional
1943 (Aimone, 2016) e propôs um papel para a neurogênese na codificação de tempo nas memórias
1944 formadas, pois memórias formadas dentro de um curto intervalo de tempo teriam um
1945 componente similar (i.e., seus engramas conteriam a mesma subpopulação de neurônios que, na
1946 época da formação da memória, eram imaturos). Logo, a grande melhora no teste de separação
1947 de padrões observada nos animais sem neurogênese seria causada pela remoção de um conjunto
1948 de neurônios que era ativado em resposta aos dois contextos apresentados no teste, o que
1949 reduziria a sobreposição nas representações neurais de cada contexto auxiliando na separação

1950 de padrões. Apesar de tal hipótese ser logicamente plausível, o efeito foi sexo-específico
1951 (observado apenas em camundongos machos) e não foi observado em nenhum outro estudo
1952 (nem mesmo aqueles usando o mesmo teste comportamental e animais do mesmo sexo);
1953 (Sahay *et al.*, 2011a; Tronel *et al.*, 2012; Nakashiba *et al.*, 2012; Wu & Hen, 2014). Já a
1954 hipótese proposta por Groves *et al.*(2013) sugere que os seus resultados (com um efeito
1955 consideravelmente menor do que o observado por Cushman *et al.*(2012) e estatisticamente não
1956 significativo) seria apenas o fruto de uma flutuação estatística e que, na realidade, os animais
1957 com e sem neurogênese teriam o mesmo desempenho comportamental. A causa disso, segundo
1958 os autores, poderia ser a dificuldade do teste, a qual não teria sido alta o bastante para realçar
1959 qualquer diferença entre os grupos. Tal explicação, porém, é satisfatória apenas para os
1960 resultados obtidos por Groves *et al.* (2013), mas não serve como explicação para os resultados
1961 de Cushman *et al.* (2012), nos quais o efeito da ablação da neurogênese foi bem maior.

1962 Apesar de não ser possível chegar a nenhuma conclusão a respeito das causas dos
1963 resultados obtidos por Cushman *et al.*(2012) e Groves *et al.* (2013), a maior parte da literatura
1964 aponta para um efeito robusto da neurogênese em comportamentos dependentes de separação
1965 de padrões. De fato, mesmo incluindo os estudos supracitados na análise, o efeito resultante
1966 permanece entre moderado e forte. Além disso, cálculos realizados usando o método de Orwin
1967 (Orwin, 1983) mostram que o efeito da ablação da neurogênese é robusto frente à adição de
1968 trabalhos hipotéticos com efeito neutro. Além disso, seriam necessários outros cinco ou mais
1969 artigos com resultados tão extremos quanto aqueles obtidos por Cushman *et al.* (2012) para
1970 reduzir o efeito observado a um efeito insignificante. Portanto, parece seguro concluir que a
1971 ablação da neurogênese de fato possui um efeito negativo sobre comportamentos dependentes
1972 de separação de padrões.

1973 Existe, porém, outra questão que pode ter grande impacto na interpretação dos
1974 resultados. Dada a estrutura dos testes comportamentais de separação de padrões, é possível
1975 afirmar que os resultados são consistentes com um déficit em separação de padrões causando
1976 interferência em memórias similares. Porém, não é possível afirmar que essa foi de fato a causa
1977 do mau desempenho dos animais sem neurogênese. Isso por que problemas na formação de
1978 memórias poderiam causar os mesmos efeitos comportamentais observados e, de fato, existem
1979 evidências que indicam que a ablação da neurogênese interfere nos processos de formação de
1980 memórias (Deng *et al.*, 2010). Esse problema de interpretação limita qualquer inferência a
1981 respeito do mecanismo pelo qual a ablação da neurogênese afeta o comportamento, de modo
1982 que retornaremos a essa questão mais adiante.

1983 Agora que temos uma visão mais clara dos efeitos comportamentais da ablação da
1984 neurogênese, resta conectar as evidências comportamentais com as informações referentes ao
1985 efeito dos neurônios imaturos no circuito hipocampal. A ligação entre esses dois níveis de
1986 organização biológica, porém, deve passar pelos processos computacionais subjacentes aos
1987 processos cognitivos avaliados pelos testes comportamentais. Logo, a tentativa de formar uma
1988 ponte entre os circuitos neurais do hipocampo e o comportamento dos animais passa,
1989 inevitavelmente, por uma questão fundamental.

1990 **Interlúdio: como funciona a formação hipocampal?**

1991 A fronteira final para entender o papel funcional da neurogênese, o fator limitante
1992 absoluto, é a nossa compreensão do funcionamento da formação hipocampal. Quais são os
1993 processos computacionais realizados na FH para processar informação? Essa é uma pergunta
1994 extremamente complexa, cuja resposta ainda não está totalmente ao nosso alcance. Isso não
1995 implica, porém, uma ignorância total a respeito dos processos computacionais. A combinação
1996 de dados anatômicos, dados fisiológicos e dados comportamentais permitiu a criação de

1997 modelos computacionais que tentam descrever o funcionamento da FH (Rolls, 2010). Algumas
1998 previsões experimentais podem ser feitas a partir desses modelos, as quais podem ser testadas
1999 para avaliar a validade dos mesmos. Porém, apesar de haverem algumas evidências a favor de
2000 alguns dos modelos computacionais da FH, um teste completo e definitivo de qualquer modelo
2001 computacional não é possível com a tecnologia atual, pois tal teste implicaria a medição da
2002 atividade de cada célula na FH, e tais atividades deveriam ser analisadas à luz do conhecimento
2003 dos padrões de conexão entre cada célula da FH. Esses modelos, porém, fornecem o melhor
2004 arcabouço teórico disponível e sem eles a interpretação conjunta de dados comportamentais e
2005 fisiológicos torna-se praticamente impossível (Andersson, 2014). Portanto, iremos revisar
2006 brevemente aqui alguns aspectos computacionais da FH baseados nos modelos mais aceitos
2007 pelos pesquisadores na área. O foco aqui será em como a FH forma e armazena memórias
2008 episódicas. Com base nesses aspectos computacionais nós iremos combinar os dados
2009 fisiológicos e comportamentais para tentar formar uma figura mais ampla.

2010 **Processos computacionais na formação hipocampal**

2011 O modelo geral mais amplamente aceito a respeito da formação de memórias
2012 episódicas na FH foca nos processos computacionais realizados ao longo do *loop* trissináptico
2013 (Rolls, 2010; Rolls, 2013; Kneirim, 2015). Durante a formação de memórias episódicas, o CE
2014 recebe informações previamente processadas a respeito dos diferentes aspectos da cena
2015 vivenciada pelo animal. Informações a respeito dos diferentes itens encontrados na cena são
2016 recebidas pelo CE a partir do córtex perirrinal e informações a respeito da disposição dos itens
2017 na cena é recebida pelo córtex posrrinal. Além disso, o CE recebe informações a respeito da
2018 posição e do direcionamento do animal no espaço pelo pré-subículo, parasubículo e córtex
2019 retrosplendial. Essas informações são combinadas para formar uma representação do contexto
2020 espacial no qual o animal se situa. As informações a respeito do contexto são transferidas do

2021 CE para o GD, o qual possui um número muito maior de neurônios, além de uma atividade
2022 notavelmente esparsa. O GD então forma uma representação esparsa do contexto (ideal para ser
2023 armazenada sem interferência com memórias similares) e transfere a informação codificada
2024 para a região CA3. De maneira similar ao GD, a região CA3 funciona representando as
2025 diferentes características de cada região do ambiente no qual o animal está inserido e pelo qual
2026 o mesmo está se locomovendo por meio da atividade das de subpopulações de neurônios. O
2027 diferencial da região CA3 é fato de que seus neurônios possuem inúmeras conexões
2028 recorrentes, permitindo que a CA3 funcione como uma rede autoassociativa com dinâmica do
2029 atrator, tornando possível a reencenação do padrão de atividade original com base na repetição
2030 parcial de estímulos. Essa reencenação se torna completa com a interação entre a região CA3 e
2031 a região CA1. Com a transferência de informação da região CA3 para CA1, a última passa a
2032 formar uma representação da memória a ser lembrada, transferindo a informação contida
2033 nessa representação para o CE e para outras áreas do cérebro.

2034 **Combinando comportamento e fisiologia**

2035 As hipóteses direta e indireta, a despeito de seus mecanismos distintos, parecem levar às
2036 mesmas consequências em relação ao fluxo de informação na formação hipocampal. A
2037 princípio, espera-se que a quantidade de informação codificada diretamente pelos neurônios
2038 imaturos seja pequena, visto que os mesmos são altamente excitáveis, o que leva a uma menor
2039 seletividade de resposta (ou seja, um mesmo neurônio imaturo dispara potenciais de ação em
2040 resposta a um maior número de estímulos comparado aos neurônios maduros). Apesar disso,
2041 Aimone *et al.* (2011) propôs que o mecanismo pelo qual os novos neurônios afetam os
2042 processos cognitivos nos animais é contribuindo diretamente com uma pequena quantidade de
2043 informação adicional para a formação de memórias. Esses autores argumentaram que, por mais
2044 que a contribuição de informação dos neurônios imaturos seja pequena, ela pode ser suficiente

2045 para tornar as memórias mais robustas e aumentar a sua “resolução”. Uma memória com maior
2046 quantidade de informação possuiria uma maior resolução, ou seja, uma maior riqueza de
2047 detalhes, o que facilitaria a tarefa de discriminar entre memórias similares.

2048 O ponto interessante é que a mesma ideia de maximizar o conteúdo de informação das
2049 memórias poderia ser aplicada à hipótese indireta, para a qual existe considerável suporte
2050 experimental. Como mencionado acima, os neurônios maduros são capazes de codificar
2051 individualmente uma maior quantidade de informação que os neurônios imaturos. Um fator
2052 chave para a eficiência dos neurônios maduros é o forte tônus inibitório do giro dentado, o qual,
2053 juntamente com a inibição lateral, mantém a ativação da rede esparsa. Como discutido
2054 anteriormente, as evidências indicam que os neurônios imaturos ajudam a manter a rede neural
2055 do giro dentado esparsa ativando circuitos inibitórios. Logo, é possível inferir que a remoção
2056 dos neurônios imaturos (como no caso de ablação da neurogênese ou silenciamento
2057 optogenético) levaria à redução no tônus inibitório no giro dentado, reduzindo a quantidade de
2058 informação codificada pelos neurônios maduros e, finalmente, levando à formação de
2059 memórias menos robustas e com menor resolução. Outra consequência que surge da hipótese
2060 indireta é um aumento na variabilidade da resposta do giro dentado a um mesmo estímulo,
2061 causada por um aumento na probabilidade da ativação de neurônios que, sob um forte tônus
2062 inibitório e forte inibição lateral, normalmente teriam uma probabilidade de ativação
2063 extremamente baixa. Juntos, o aumento no ruído e a baixa seletividade para ativação levariam a
2064 uma redução na quantidade e qualidade da informação transferida para o armazenamento de
2065 memórias na região CA3.

2066 Fica evidente com base na discussão acima que ambas as hipóteses podem ser
2067 combinadas para gerar uma única hipótese, na qual um mesmo efeito é gerado pela ação de
2068 dois mecanismos distintos agindo de maneira combinada. Além disso, é interessante notar que

2069 ambas as hipóteses, direta a indireta, assim com a combinação das duas, resolvem o problema
2070 de interpretação com os testes comportamentais discutido anteriormente. De fato, o problema
2071 não é apenas resolvido, ele perde completamente o sentido. Isso se deve fato de que os
2072 mesmos mecanismos de ação têm como consequência os efeitos em comportamentos
2073 dependentes de separação de padrões e os efeitos em comportamentos dependentes de memória
2074 em geral. Além disso, seria plausível presumir que os efeitos em comportamentos dependentes
2075 de memória só seriam detectados caso o teste comportamental fosse suficientemente exigente
2076 com os processos cognitivos relacionados à memória, uma vez que, dependendo da tarefa a ser
2077 realizada, uma memória com pouca informação pode ser suficiente para que o animal apresente
2078 um desempenho normal. Isso poderia explicar algumas das inconsistências na literatura de
2079 neurogênese e memória, onde alguns estudos encontram efeitos da ablação da neurogênese em
2080 testes comportamentais de memória (Winocur *et al.*, 2006; Dupret *et al.*, 2008), enquanto
2081 outros não (Meshi *et al.*, 2006; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2009).

2082 **Um teste para a hipótese**

2083 Ambas as hipóteses (direta e indireta) são, a princípio, plausíveis. De fato, ambas
2084 poderiam estar corretas e, de maneira independente, poderiam explicar a maioria dos resultados
2085 comportamentais observados na literatura. Logo, para diferenciar os dois mecanismos e avaliar
2086 se ambos operam no cérebro dos animais (como proposto aqui), serão necessários novos
2087 experimentos, elaborados especificamente para esse propósito.

2088 Um estudo recente usando silenciamento optogenético de neurônios imaturos em
2089 períodos específicos do teste comportamental de separação de padrões relatou prejuízo no
2090 desempenho dos animais no teste (Danielsson *et al.*, 2016). Esses autores usaram o teste de
2091 discriminação de medo contextual, no qual os animais precisam discriminar entre um contexto
2092 condicionado, no qual os animais levam um choque após um determinado período de tempo, e

2093 um contexto não condicionado, o qual é bastante similar ao contexto condicionado, mas onde
2094 os animais não levam choque. Usando técnicas de optogenética, os pesquisadores silenciaram
2095 os neurônios imaturos em um de dois períodos específicos: ou durante as exposições ao
2096 contexto não condicionado (interferindo assim na formação da memória desse contexto) ou
2097 durante as exposições ao contexto condicionado (excetuando a primeira exposição), de modo
2098 que os animais puderam formar a memória do contexto antes do silenciamento dos neurônios
2099 imaturos. Na primeira situação os animais apresentaram uma redução na capacidade de
2100 discriminar os dois contextos, enquanto que na segunda situação os animais com neurônios
2101 imaturos silenciados discriminaram tão bem quanto o grupo controle. Esses resultados são
2102 consistentes com a hipótese defendida aqui, pois é mais difícil discriminar memórias quando
2103 uma delas possui pouca informação do que quando ambas possuem alta resolução
2104 (especialmente considerando que as memórias precisariam ser recuperadas com base em
2105 representações do giro dentado, as quais estariam com baixo conteúdo de informação devido ao
2106 silenciamento dos neurônios imaturos).

2107 Um ponto importante desse experimento discutido acima é que a ideia por trás dele
2108 pode ser modificada de modo a possibilitar que a hipótese apresentada aqui seja testada, além
2109 de permitir a discriminação entre as contribuições dos mecanismos direto e indireto. Para tanto,
2110 poucas mudanças precisariam ser feitas na estrutura do experimento elaborado por Danielsson
2111 *et al.* (2016), sendo a principal mudança no modelo animal. Ao invés de usar um modelo
2112 transgênico expressando apenas canais de cloreto ativados por luz em neurônios imaturos, seria
2113 adicionado outro componente: a expressão, em neurônios do circuito inibitório, de proteínas
2114 *channelrhodopsin*, as quais permitem o fluxo de cátions mediante ativação por luz (Drew *et al.*,
2115 2016). Isso poderia ser feito usando, por exemplo, os mesmos marcadores moleculares usados
2116 para ablação das células de Mossy no trabalho de Jinde *et al.* (2012). Visto que o silenciamento
2117 optogénético e a ativação optogenética podem ser realizados usando comprimentos de onda

2118 diferentes, seria possível manipular simultaneamente e individualmente a atividade dos
2119 neurônios imaturos e do circuito inibitório, diferenciando assim os efeitos diretos e indiretos.

2120 Antes de concluir essa seção, seria interessante discutir um último trabalho publicado
2121 recentemente. Como mencionado antes, apesar de alguns autores argumentarem que as
2122 hipóteses direta e indireta parecem ser incompatíveis (Park *et al.*, 2015), outros argumentaram
2123 o oposto (Johnston *et al.*, 2016). Recentemente, Johnston e colaboradores (2016) propuseram
2124 uma hipótese a respeito do mecanismo por trás do efeito da neurogênese na formação
2125 hipocampal. Essa hipótese, batizada pelos seus proponentes de hipótese de codificação mista,
2126 sugere que os efeitos indiretos dos neurônios adultos auxiliam na separação de padrões, porém
2127 tornam as memórias mais frágeis, pois quanto mais esparsa a atividade do giro dentado menor o
2128 número de neurônios usados para codificar cada memória; como resultado, a memória em
2129 questão tornaria menos robusta a alterações nos circuitos neurais, sendo esquecida mais
2130 rapidamente. Os efeitos diretos balanceariam os efeitos indiretos adicionando unidades
2131 computacionais ativas para a formação de memórias.

2132 A hipótese proposta nesta Dissertação contrasta com a hipótese de Johnston *et al.*
2133 (2016) em que os efeitos diretos e indiretos dos novos neurônios são sugeridos como sendo
2134 similares, ambos reduzindo o conteúdo de informação armazenado nas memórias, de modo que
2135 uma alteração em qualquer um deles seria o suficiente para gerar os efeitos comportamentais
2136 observados. Visto que a hipótese de Johnston *et al.* (2016) é perfeitamente válida, diferenciá-la
2137 da hipótese proposta aqui necessitará de mais dados experimentais. O experimento proposto
2138 acima poderia auxiliar nessa tarefa, visto que as previsões da hipótese de Johnston *et al.* (2016)
2139 diferem das previsões da hipótese proposta nesse trabalho. Especificamente, a hipótese de
2140 codificação mista faz previsões que variam entre esquecimento (devido a memórias frágeis)
2141 com a manipulação do mecanismo direto (sendo provável que nenhum efeito seja observado a

2142 não ser que a duração do teste seja longa o bastante), redução na capacidade de discriminação
2143 (devido à redução do tónus inibitório no giro dentado) com a manipulação do mecanismo
2144 indireto e ambos os efeitos anteriores com a manipulação de ambos os mecanismos. Logo, no
2145 experimento proposto acima, caso se observe a restauração do desempenho comportamental
2146 dos animais com a ativação dos circuitos inibitórios, a hipótese de Johnston *et al.* (2016) seria
2147 favorecida contra a hipótese proposta aqui. O problema, obviamente, é que não seria possível
2148 diferenciar entre a hipótese de Johnston *et al.* (2016) e a hipótese do mecanismo indireto agindo
2149 sozinho, o que necessitaria de experimentos adicionais.

2150 **Conclusão e perspectivas**

2151 No presente trabalho, vimos que boa parte da literatura aponta para um papel
2152 significativo da neurogênese hipocampal em comportamentos dependentes de separação de
2153 padrões (apesar de haverem alguns resultados conflitantes, cuja compreensão requer mais
2154 evidências). Esses resultados foram discutidos dentro de uma perspectiva mais ampla,
2155 envolvendo os diferentes níveis de organização biológica, de modo a gerar uma hipótese
2156 abrangente a respeito dos mecanismos através dos quais a neurogênese hipocampal afeta o
2157 comportamento dos animais.

2158 Visto que foi proposto aqui um teste para as hipóteses levantadas, um dos próximos
2159 passos é, obviamente, realizar tal experimento. Esse, porém, não é único passo que precisa ser
2160 tomado. Reiterando a dualidade teoria e experimento, outro ponto importante é refinar a
2161 hipótese apresentada aqui, tornando-a mais abrangente e, se possível, formalizando-a, de modo
2162 a ser possível realizar inferências mais precisas a respeito dos resultados esperados em testes
2163 dessa hipótese, permitindo uma melhor avaliação da mesma. Um dos caminhos para isso seria
2164 analisar em detalhe as evidências disponíveis a respeito do efeito da neurogênese na memória,
2165 um aspecto crucial da hipótese proposta aqui e que foi abordado de maneira superficial, com

2166 argumentos baseados em parte da literatura e não na literatura como um todo. Outro ponto
2167 importante para tornar a hipótese mais abrangente é integrar os efeitos da neurogênese na
2168 memória e separação de padrões com os efeitos da neurogênese em aspectos emocionais, em
2169 especial nos níveis de ansiedade, algo que tem sido demonstrado repetidamente na literatura
2170 (Miller e Hen, 2015). De fato, o efeito da neurogênese em processos emocionais torna
2171 condicional a interpretação de qualquer teste comportamental que avalie capacidades
2172 cognitivas, uma vez que as capacidades cognitivas dos animais podem sofrer interferência dos
2173 processos emocionais (Harrison *et al.*, 2009). O objetivo seria formular um mecanismo
2174 integrado para os efeitos da neurogênese na memória e nos processos emocionais, o qual
2175 poderia então ser formalizado em um modelo computacional, a partir do qual as consequências
2176 da ablação da neurogênese ou da manipulação de qualquer um dos mecanismos de ação
2177 poderiam ser inferidas com maior precisão. Um modelo integrado para os efeitos da
2178 neurogênese na memória e nos aspectos emocionais seria um grande passo em direção ao
2179 entendimento completo (ou o mais completo possível) desse fenômeno e serviria como base
2180 para as pesquisas futuras na área.

2181

2182 **Bibliografia geral**

- 2183 Aguilar-Arredondo, A., Arias, C., Zepeda, A., 2015. Evaluating the functional state of adult-
2184 born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional
2185 integration. *Reviews in the Neurosciences* 26. doi:10.1515/revneuro-2014-0071
- 2186 Aimone, J.B., 2016. Computational Modeling of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor*
2187 *Perspectives in Biology* 8, a018960. doi:10.1101/cshperspect.a018960
- 2188 Aimone, J.B., Deng, W., Gage, F.H., 2011. Resolving New Memories: A Critical Look at the
2189 Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron* 70, 589–596.
2190 doi:10.1016/j.neuron.2011.05.010
- 2191 Akers, K.G., Martinez-Canabal, A., Restivo, L., Yiu, A.P., De Cristofaro, A., Hsiang, H.-L.,
2192 Wheeler, A.L., Guskjolen, A., Niibori, Y., Shoji, H., Ohira, K., Richards, B.A.,
2193 Miyakawa, T., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2014. Hippocampal Neurogenesis

2194 Regulates Forgetting During Adulthood and Infancy. *Science* 344, 598–602.
2195 doi:10.1126/science.1248903

2196 Altman, J., 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and
2197 cats. *The Anatomical Record* 145, 573–591.

2198 Amaral R, Lavenex P., 2007. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D,
2199 Bliss T, Okeefe J. *The Hippocampus Book*, 1° Ed., Oxford University Press, pp. 37-114.

2200 Anderson, B., 2014. Computational neuroscience and cognitive modelling: a student's
2201 introduction to methods and procedures. SAGE, Los Angeles.

2202 Barker, J.M., Boonstra, R., Wojtowicz, J.M., 2011. From pattern to purpose: how comparative
2203 studies contribute to understanding the function of adult neurogenesis: Function of adult
2204 neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 34, 963–977. doi:10.1111/j.1460-
2205 9568.2011.07823.x

2206 Bekinschtein, P., Kent, B.A., Oomen, C.A., Clemenson, G.D., Gage, F.H., Saksida, L.M.,
2207 Bussey, T.J., 2014. Brain-derived neurotrophic factor interacts with adult-born
2208 immature cells in the dentate gyrus during consolidation of overlapping memories:
2209 BDNF, Adult Neurogenesis and Overlapping Memories. *Hippocampus* 24, 905–911.
2210 doi:10.1002/hipo.22304

2211 Bergami, M., Berninger, B., 2012. A fight for survival: The challenges faced by a newborn
2212 neuron integrating in the adult hippocampus. *Developmental Neurobiology* 72, 1016–
2213 1031. doi:10.1002/dneu.22025

2214 Biau, D.J., Jolles, B.M., Pörcher, R. 2010. P value and the theory of hypothesis testing. *Clin*
2215 *Orthop Relat Res* 468, 885–892. DOI 10.1007/s11999-009-1164-4

2216 Borenstein, M. (Ed.), 2009. Introduction to meta-analysis. John Wiley & Sons, Chichester,
2217 U.K.

2218 Cameron, H.A., 2009. Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster
2219 Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *J. Neurosci.* 29, 14484–
2220 14495. doi:10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009

2221 Capra, F., 1997. The web of life: a new scientific understanding of living systems. Anchor
2222 Books, New York, N.Y.

2223 Cho, M., Lu, Z., Lee, C., 2010. This is an Open-Access article distributed under the terms of
2224 the Creative Commons Attribution Non-Commercial License.

2225 Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger,
2226 S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., Bussey, T.J., 2009. A Functional Role for
2227 Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science* 325, 210–213.
2228 doi:10.1126/science.1173215

2229 Colucci-D'Amato, L., Bonavita, V., di Porzio, U., 2006. The end of the central dogma of
2230 neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurological Sciences* 27,
2231 266–270. doi:10.1007/s10072-006-0682-z

2232 Cohen, J.E., 2004. Mathematics Is Biology's Next Microscope, Only Better; Biology Is
2233 Mathematics' Next Physics, Only Better. *PLoS Biology* 2, e439.
2234 doi:10.1371/journal.pbio.0020439

2235 Cushman, J.D., Maldonado, J., Kwon, E.E., Garcia, A.D., Fan, G., Imura, T., Sofroniew,
2236 M.V., Fanselow, M.S., 2012. Juvenile neurogenesis makes essential contributions to

2237 adult brain structure and plays a sex-dependent role in fear memories. *Frontiers in*
2238 *Behavioral Neuroscience* 6. doi:10.3389/fnbeh.2012.00003

2239 Danielson, N.B., Kaifosh, P., Zaremba, J.D., Lovett-Barron, M., Tsai, J., Denny, C.A.,
2240 Balough, E.M., Goldberg, A.R., Drew, L.J., Hen, R., Losonczy, A., Kheirbek, M.A.,
2241 2016. Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context
2242 Encoding. *Neuron* 90, 101–112. doi:10.1016/j.neuron.2016.02.019

2243 Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult
2244 hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*
2245 11, 339–350. doi:10.1038/nrn2822

2246 Drew, L.J., Fusi, S., Hen, R., 2013. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: Why
2247 the dentate gyrus? *Learning & Memory* 20, 710–729. doi:10.1101/lm.026542.112

2248 Drew, L.J., Kheirbek, M.A., Luna, V.M., Denny, C.A., Clodt, M.A., Wu, M.V., Jain, S.,
2249 Scharfman, H.E., Hen, R., 2016. Activation of local inhibitory circuits in the dentate
2250 gyrus by adult-born neurons: ACTIVATION OF LOCAL INHIBITORY CIRCUITS.
2251 *Hippocampus* 26, 763–778. doi:10.1002/hipo.22557

2252 Dupret D., Revest J.M., Koehl M., Ichas F., De Giorgi F., 2008. Spatial Relational Memory
2253 Requires Hippocampal Adult Neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959.

2254 Feynman, R.P., Leighton, R.B., Sands, M.L., 1964. *The Feynman Lectures on Physics*.
2255 Addison Wesley Publishing Company, USA.

2256 Fisher, R.A., 1956. *Statistical methods and scientific inference*. Oliver and Boid, London, pp
2257 9

2258 Gilbert, P.E., Kesner, R.P., DeCoteau, W.E., 1998. Memory for spatial location: role of the
2259 hippocampus in mediating spatial pattern separation. *Journal of Neuroscience* 18, 804–
2260 810.

2261 Gilbert, P.E., Kesner, R.P., Lee, I., 2001. Dissociating hippocampal subregions: A double
2262 dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11, 626–636.
2263 doi:10.1002/hipo.1077

2264 Gleick, J. 1988. *Chaos: the making of new science*. Reed Business Information Inc, USA.

2265 Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., Gage, F.H., 2016. Adult Neurogenesis in the Hippocampus:
2266 From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897–914. doi:10.1016/j.cell.2016.10.021

2267 Groves, J.O., Leslie, I., Huang, G.-J., McHugh, S.B., Taylor, A., Mott, R., Munafò, M.,
2268 Bannerman, D.M., Flint, J., 2013. Ablating Adult Neurogenesis in the Rat Has No
2269 Effect on Spatial Processing: Evidence from a Novel Pharmacogenetic Model. *PLoS*
2270 *Genetics* 9, e1003718. doi:10.1371/journal.pgen.1003718

2271 Harrison FE, Hossenic AH, McDonald MP. *Behavioral*, 2009. Endogenous anxiety and stress
2272 responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Brain Research*
2273 198:247-251.

2274 Hernandez-Rabaza V., Llorens-Martin M., Velazquez-Sanchez C., Ferragud A., Arcusa A.,
2275 2009. Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but
2276 spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial
2277 reversal. *Neuroscience* 159, 59–68.

2278 Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1990. A quantitative description of membrane current and its
2279 application to conduction and excitation in nerve. *Bulletin of mathematical biology* 52,
2280 25–71.

2281 Hoffmann, P., 2012. Life's ratchet: how molecular machines extract order from chaos. Basic
2282 Books, U.S.A.

2283 Hvoslef-Eide, M., Oomen, C.A., 2016. Adult neurogenesis and pattern separation in rodents:
2284 A critical evaluation of data, tasks and interpretation. *Frontiers in Biology* 11, 168–181.
2285 doi:10.1007/s11515-016-1406-2

2286 Ikrar, T., Guo, N., He, K., Besnard, A., Levinson, S., Hill, A., Lee, H.-K., Hen, R., Xu, X.,
2287 Sahay, A., 2013. Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus.
2288 *Frontiers in Neural Circuits* 7. doi:10.3389/fncir.2013.00204

2289 Jinde, S., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Pickel, J., Kohno, K., Belforte, J.E., Nakazawa, K.,
2290 2012. Hilar Mossy Cell Degeneration Causes Transient Dentate Granule Cell
2291 Hyperexcitability and Impaired Pattern Separation. *Neuron* 76, 1189–1200.
2292 doi:10.1016/j.neuron.2012.10.036

2293 Johnston, S.T., Shtrahman, M., Parylak, S., Gonçalves, J.T., Gage, F.H., 2016. Paradox of
2294 pattern separation and adult neurogenesis: A dual role for new neurons balancing
2295 memory resolution and robustness. *Neurobiology of Learning and Memory* 129, 60–68.
2296 doi:10.1016/j.nlm.2015.10.013

2297 Kandel, E.R., 2012. Principles of neural science. McGraw-Hill Medical, New York.

2298 Kesner, R.P., Hui, X., Sommer, T., Wright, C., Barrera, V.R., Fanselow, M.S., 2014. The role
2299 of postnatal neurogenesis in supporting remote memory and spatial metric processing:
2300 Neurogenesis And Remote Memory. *Hippocampus* 24, 1663–1671.
2301 doi:10.1002/hipo.22346

2302 Kirschen G.W., Di Antonio A., 2016. Physiology and plasticity. In: Canales JJ. *Adult Neurogenesis*
2303 *in the Hippocampus*, 1° Ed., Academic Press, pp. 1-18.

2304 Knierim J.J., 2015. A primer on the hippocampus. *Current Biology*, 25, 1107–1125.

2305 Lacefield, C.O., Itskov, V., Reardon, T., Hen, R., Gordon, J.A., 2012. Effects of adult-
2306 generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus.
2307 *Hippocampus* 22, 106–116. doi:10.1002/hipo.20860

2308 Lazarov, O., Hollands, C., 2016. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Progress*
2309 *in Neurobiology* 138–140, 1–18. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.12.006

2310 Leenaars, M., Hooijmans, C.R., van Veggel, N., ter Riet, G., Leeftang, M., Hooft, L., van der
2311 Wilt, G.J., Tillema, A., Ritskes-Hoitinga, M., 2012. A step-by-step guide to
2312 systematically identify all relevant animal studies. *Laboratory Animals* 46, 24–31.
2313 doi:10.1258/la.2011.011087

2314 Lichtman, J.W., Livet, J., Sanes, J.R., 2008. A technicolour approach to the connectome.
2315 *Nature Reviews Neuroscience* 9, 417–422.

2316 Marin-Burgin, A., Mongiat, L.A., Pardi, M.B., Schinder, A.F., 2012. Unique Processing
2317 During a Period of High Excitation/Inhibition Balance in Adult-Born Neurons. *Science*
2318 335, 1238–1242. doi:10.1126/science.1214956

2319 Marr D., 1971. Simple memory: a theory for the archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol.*,
2320 262, 23–81.

2321 Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, et al. (2006) Hippocampal neurogenesis
2322 is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nature Neuroscience*

2323 Miller, B.R., Hen, R., 2015. The current state of the neurogenic theory of depression and
2324 anxiety. *Current Opinion in Neurobiology* 30, 51–58. doi:10.1016/j.conb.2014.08.012

2325 Molina-Navarro MM, Garcia-Verdugo JM., 2016. Neurobiology. In: Canales JJ. Adult
2326 Neurogenesis in the Hippocampus, 1° Ed., Academic Press, pp. 1-18.

2327 Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J.,
2328 Barrera, V.R., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., Fanselow, M.S., Tonegawa,
2329 S., 2012. Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old
2330 Granule Cells Facilitate Pattern Completion. *Cell* 149, 188–201.
2331 doi:10.1016/j.cell.2012.01.046

2332 Neyman, J., Person, E.S. 1933. On the problem of the most efficient tests of statistical
2333 hypothesis. *Philosophical transactions of the royal society of London* 231, 289-337.

2334 Niibori, Y., Yu, T.-S., Epp, J.R., Akers, K.G., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2012.
2335 Suppression of adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in
2336 hippocampal CA3 region. *Nature Communications* 3, 1253. doi:10.1038/ncomms2261

2337 Nuzzo, R., 2014. Statistical errors. *Nature* 506, 150-152.

2338 Okasha, S., 2002. *Philosophy of science: a very short introduction*, Very short introductions.
2339 Oxford University Press, Oxford ; New York.

2340 Orwin, R.G., 1983. A fail-safe N for effect size in meta-analysis. *Journal of educational*
2341 *statistics* 8, 157–159.

2342 Pan, Y.W., Chan, G.C.K., Kuo, C.T., Storm, D.R., Xia, Z., 2012. Inhibition of Adult
2343 Neurogenesis by Inducible and Targeted Deletion of ERK5 Mitogen-Activated Protein
2344 Kinase Specifically in Adult Neurogenic Regions Impairs Contextual Fear Extinction
2345 and Remote Fear Memory., 2012. *Journal of Neuroscience* 32, 6444–6455.
2346 doi:10.1523/JNEUROSCI.6076-11.2012

2347 Park, E.H., Burghardt, N.S., Dvorak, D., Hen, R., Fenton, A.A., 2015. Experience-Dependent
2348 Regulation of Dentate Gyrus Excitability by Adult-Born Granule Cells. *Journal of*
2349 *Neuroscience* 35, 11656–11666. doi:10.1523/JNEUROSCI.0885-15.2015

2350 Phillips, R., 2015. Theory in Biology: Figure 1 or Figure 7? *Trends in Cell Biology* 25, 723–
2351 729. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.007

2352 Pross, A., 2016. *What is life?: how chemistry becomes biology*, Second edition. ed, Oxford
2353 Landmark Science. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

2354 Ramon y Cajal, S., 1914. *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*.
2355 Madrid, Moya

2356 Rolls, E.T., 2013. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the
2357 hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience* 7. doi:10.3389/fnsys.2013.00074

2358 Rolls, E.T., 2010. A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus.
2359 *Behavioural Brain Research* 215, 180–196. doi:10.1016/j.bbr.2010.03.027

2360 Russell, B., 1961. *A History of Western Philosophy*. George Allen & Unwin Ltd, London.

2361 Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S.,
2362 Fenton, A.A., Dranovsky, A., Hen, R., 2011a. Increasing adult hippocampal
2363 neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466–470.
2364 doi:10.1038/nature09817

2365 Sahay, A., Wilson, D.A., Hen, R., 2011b. Pattern Separation: A Common Function for New
2366 Neurons in Hippocampus and Olfactory Bulb. *Neuron* 70, 582–588.
2367 doi:10.1016/j.neuron.2011.05.012

2368 Seung S, Yuste R., 2013. Neural Networks. In: Kandel E, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA,
2369 Hudspeth AJ. Principles of Neural Science, 5^o Ed., Mc Graw Hill, pp.1581-1600.
2370

2371 Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J.-M., Piazza, P.-V., Koehl, M., Abrous, D.N.,
2372 2012. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination.
2373 Hippocampus 22, 292–298. doi:10.1002/hipo.20895

2374 Vadodaria, K.C., Jessberger, S., 2014. Functional neurogenesis in the adult hippocampus:
2375 then and now. Frontiers in Neuroscience 8. doi:10.3389/fnins.2014.00055

2376 Vesterinen, H.M., Sena, E.S., Egan, K.J., Hirst, T.C., Churolov, L., Currie, G.L., Antonic, A.,
2377 Howells, D.W., Macleod, M.R., 2014. Meta-analysis of data from animal studies: A
2378 practical guide. Journal of Neuroscience Methods 221, 92–102.
2379 doi:10.1016/j.jneumeth.2013.09.010

2380 Wangersky, P.J., 1978. Lotka-Volterra population models. Annual Review of Ecology and
2381 Systematics 9, 189–218.

2382 Winocur G., Wojtowicz J.M., Sekeres M., Snyder J.S., Wang S., 2006. Inhibition of
2383 neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. Hippocampus
2384 16: 296–304.

2385 Wiskott L., Rasch M.L., Kempermann G., 2006. A Functional Hypothesis for Adult
2386 Hippocampal Neurogenesis: Avoidance of Catastrophic Interference in the Dentate
2387 Gyrus. Hippocampus. 16:329–343.

2388 Wu, M.V., Hen, R., 2014. Functional dissociation of adult-born neurons along the
2389 dorsoventral axis of the dentate gyrus: Adult Neurogenesis in the Dorsal Vs. Ventral
2390 Dentate Gyrus. Hippocampus 24, 751–761. doi:10.1002/hipo.22265.
2391
2392
2393

2394

2395

2396

2397

2398

2399

2400

2401

2402

2403

2404

2405

2406

2407

2408

2409 **Apêndice – Cálculos da meta análise**

2410

2411 Os cálculos detalhados aqui, bem como a descrição do processo geral de
2412 realização da meta análise, são baseados nos trabalhos de Orwin (1983), Borenstein (2009),
2413 Del Re (2014), Del Re(2015), Schwarzer *et al.*, (2015), Wolfgang (2015) and Schwarzer
2414 (2016).

2415

2416 O primeiro passo da meta-análise realizada nessa dissertação foi calcular a diferença
2417 de médias padronizada e sua variância para cada estudo incluído na análise. Isso foi feito
2418 usando o método do g de Hedges. O g de Hedges foi calculado com base na equação 1:

2419

2420

$$\hat{g}_k^* = \left(1 - \frac{3}{4n_k - 9}\right) \frac{\mu_{ek}^* - \mu_{ck}^*}{\sqrt{((n_{ek} - 1)s_{ek}^2 + (n_{ck} - 1)s_{ck}^2) / (n_k - 2)}} \quad (1)$$

2421

2422

2423 onde μ_{ek}^* e s_{ek}^2 são, respectivamente, a média e a variância do grupo tratado e μ_{ck}^* e s_{ck}^2 são,
2424 respectivamente, a média e a variância do grupo controle. Os termos n_{ek} e n_{ck} são os
2425 tamanhos amostrais do grupo tratado e do grupo controle, respectivamente, e n_k é o tamanho
2426 amostral total (a soma dos animais usados nos dois grupos). A primeira parte da equação

2427 consiste em um fator de correção para amostras de pequeno tamanho, enquanto que a segunda
2428 parte consiste na diferença de médias relativizada pelo desvio padrão combinado dos dois
2429 grupos.

2430 A variância do g de Hedges é dada pela equação 2,

2431

$$\widehat{\text{Var}}(g_k^*) = \frac{n_k}{n_{ek} \cdot n_{ck}} + \frac{g_k^{2*}}{2(n_k - 3.94)} \quad (2)$$

2432

2433

2434 A partir dos resultados anteriores é possível calcular também o intervalo de confiança
2435 para o g de Hedges, usando a equação 3:

$$g_k^* \pm z_{1-\frac{\alpha}{2}} \text{S.E.}(g_k^*) \quad (3)$$

2436

2437

2438 onde S.E. representa o erro padrão de g_k^* , calculado pela equação 4.

2439

$$\text{S.E.}(g_k^*) = \sqrt{\widehat{\text{Var}}(g_k^*)} \quad (4)$$

2440

2441

2442 O passo seguinte é combinar os resultados usando o modelo de efeitos fixos e o
2443 método de variância invertida (equação 5).

$$\theta_F^* = \frac{\sum_{k=1}^K w_k \theta_k^*}{\sum_{k=1}^K w_k} \quad (5)$$

2444

2445

2446 onde K é o número de estudos incluídos na meta análise, θ_k^* é a o efeito observado em cada
 2447 estudo e θ_F^* é a média ponderada dos efeitos observados nos diferentes estudos. O peso
 2448 atribuído a cada estudo (w_k) é o inverso da sua variância, σ_k^2 (equação 6). A variância de θ_F^*
 2449 é dada pela equação 7 e seu intervalo de confiança pela equação 8, onde S.E., o erro padrão, é
 2450 definido pela equação 9.

2451

2452

$$w_k = 1/\sigma_k^2 \quad (6)$$

2453

2454

$$\widehat{\text{Var}}(\theta_F^*) = \frac{1}{\sum_{k=1}^K w_k} \quad (7)$$

2455

2456

$$\theta_F^* \pm z_{1-\frac{\alpha}{2}} \text{S.E.}(\theta_F^*) \quad (8)$$

2457

2458

$$\text{S.E.}(\theta_F^*) = \sqrt{\widehat{\text{Var}}(\theta_F^*)} \quad (9)$$

2459

2460 O próximo passo é realizar o teste de heterogeneidade, para o qual usamos o método Q
 2461 de Cochran, calculado pela equação 10:

2462

$$Q = \sum_{k=1}^K w_k \left(\theta_k^* - \frac{\sum_{k=1}^K w_k \theta_k^*}{\sum_{k=1}^K w_k} \right)^2 \quad (10)$$

2463

2464

2465 Desse modo, Q é o somatório ponderado da diferença entre a estimativa do efeito de cada
 2466 estudo e a estimativa do efeito seguindo o modelo de efeitos fixos. Sabe-se que o valor Q
 2467 segue uma distribuição χ^2 com k - 1 graus de liberdade. Com base nessa informação é
 2468 possível calcular um p-valor contra a hipótese nula.

2469 A heterogeneidade é expressa usando o I², uma medida intuitiva da heterogeneidade,
 2470 definida pela equação 11.

2471

$$I^2 = (H^2 - 1)/H^2 \text{ if } Q > (K - 1) \quad (11)$$

2472

2473 onde H² é dado pela equação 12.

2474

$$H^2 = \frac{Q}{K - 1} \quad (12)$$

2475

2476

2477 O passo seguinte é realiar a meta análise usando o modelo de efeitos aleatórios. Para
2478 tanto, é necessário estimar o τ^2 . Nessa dissertação o τ^2 foi calculado usando a estimativa de
2479 máxima verossimilhança restrita (do inglês, *restricted maximum likelihood estimator*), o qual
2480 é estimado de maneira iterativa usando a equação 13.

2481

$$\tau^{2*} = \sum w_k^* (k(k-1))^{-1} (\theta_k^* - \theta_k)^2 / S.E.) / \sum w_k^* \quad (13)$$

2482

2483

2484 onde W_k^* é o peso no modelo de efeitos aleatórios (definido na equação 15), S.E. é erro
2485 padrão populacional (estimado na equação 9), θ_k^* é o efeito observado em cada estudo (seu
2486 valor sendo definido pela equação 1) e θ_k é o valor populacional estimado por θ_k^* . Essa
2487 equação resolvida por meio de métodos iterativos.

2488

2489 O valor do τ^{2*} é usado para os cálculos da estimativa do efeito baseado em efeitos
2490 aleatórios, definido pela equação 14.

2491

$$\theta_R^* = \frac{\sum_{k=1}^K w_k^* \theta_k^*}{\sum_{k=1}^K w_k^*} \quad (14)$$

2492

2493

2494 onde W_k^* é o peso de cada estudo no modelo de efeitos aleatórios (o inverso da soma da
2495 variância do estudo mais a estimativa do τ^{2*}), definido pela equação 15.

2496

$$w_k^* = 1/(\sigma_k^{2*} + \tau^{2*}) \quad (15)$$

2497

2498

2499 A variância de θ_{R}^* é dada pela equação 16, o intervalo de confiança de θ_{R}^* é calculado
 2500 com base nas equações 17 e 18 e o intervalo de previsão é calculado com base na equação 19.

2501

$$\widehat{\text{Var}}(\theta_R^*) = \frac{1}{\sum_{k=1}^K w_k^*} \quad (16)$$

2502

2503

$$\theta_R^* \pm z_{1-\frac{\alpha}{2}} \text{S.E.}(\theta_R^*) \quad (17)$$

2504

2505 onde

$$\text{S.E.}(\theta_R^*) = \sqrt{\widehat{\text{Var}}(\theta_R^*)} \quad (18)$$

2506

2507

$$\theta_R^* \pm t_{K-2, 1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\text{S.E.}(\theta_R^*) + \tau^{2*}} \quad (19)$$

2508

2509

2510

2511

2512 Por fim, o teste de viés de publicação *fail-safe N* de Orwin é calculado pela equação 19.

2513

2514

$$N_{fs} = \frac{N_0(d_0 - d_c)}{d_c - \bar{d}_{fs}} \quad (20)$$

2515

2516 onde N_{fs} é o número de estudos hipotéticos apresentando um determinado tamanho do efeito
2517 (d_{fs}) necessários para atingir o efeito-alvo (d_c). N_0 é o número de estudos na meta análise e d_0
2518 é a média não ponderada do tamanho do efeito nos estudos incluídos na análise.

2519

2520

2521

2522 **Referencias do apêndice**

2523

2524 Borenstein, M. (Ed.), 2009. Introduction to meta-analysis. John Wiley & Sons, Chichester,
2525 U.K.

2526 Del Re, A.C., 2015. A practical tutorial on conducting meta-analysis in R. The Quantitative
2527 Methods for Psychology 11, 37–50.

2528 Del Re, A.C., Hoyt, W.T., Del Re, M.A., 2014. Package “MAd.” Comprehensive R Archive
2529 Network. <https://cran.r-project.org/web/packages/MAd/MAd.pdf>.

2530 Hooijmans C.R, Tillema A., Leenaars M., Hoitinga M.R., 2010. Laboratory Animals, 44,
2531 170-75.

2532 Orwin, R.G., 1983. A fail-safe N for effect size in meta-analysis. Journal of educational
2533 statistics 8, 157–159.

2534 Schwarzer, G., 2016. Package “meta”. Comprehensive R Archive Network. <https://cran.r-project.org/web/packages/metafor/metafor.pdf>.

2535 Schwarzer, G., Carpenter, J.R., Rücker, G., 2015. Meta-Analysis with R, Use R! Springer
2536 International Publishing, Cham.

2537 Viechtbauer, W., Viechtbauer, M.W., 2015. Package “metafor.” The Comprehensive R
2538 Archive Network. <http://cran.r-project.org/web/packages/metafor/metafor.pdf>.

2539