



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

EFEITOS DA CIRURGIA DE RESSECÇÃO HIPOCAMPAL UNILATERAL SOBRE
OS PADRÕES DE NEUROGÊNESE E MEMÓRIA EM RATOS WISTAR ADULTOS

Giuliana Thaíssa Modesto Cardoso

Belém – PA

Fevereiro/2019



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

EFEITOS DA CIRURGIA DE RESSECÇÃO HIPOCAMPAL UNILATERAL SOBRE
OS PADRÕES DE NEUROGÊNESE E MEMÓRIA EM RATOS WISTAR ADULTOS

Giuliana Thaissa Modesto Cardoso

Projeto de dissertação submetido ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Leda de Faria Brino

Belém – PA

Fevereiro/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C268e Cardoso, Giuliana Thaissa Modesto
EFEITOS DA CIRURGIA DE RESSECÇÃO HIPOCAMPAL
UNILATERAL SOBRE OS PADRÕES DE NEUROGÊNESE E
MEMÓRIA EM RATOS WISTAR ADULTOS / Giuliana Thaissa
Modesto Cardoso. — 2019.
78 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Silene Maria Araújo de Lima
Coorientação: Prof^ª. Dra. Ana Leda de Faria Brino
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Comportamento, Núcleo de Teoria e Pesquisa do
Comportamento, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Epilepsia. 2. Neurogênese. 3. Hipocampo. 4. Cirurgia de
Ressecção Hipocampal. 5. Memória. I. Título.

CDD 612.825



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

EFEITOS DA CIRURGIA DE RESSECÇÃO HIPOCAMPAL UNILATERAL SOBRE
OS PADRÕES DE NEUROGÊNESE E MEMÓRIA EM RATOS WISTAR ADULTOS

Candidata: Giuliana Thaíssa Modesto Cardoso

Data da defesa: 22/02/19

Resultado:

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Silene Maria Araújo de Lima. (UFPA) – Orientadora

Profª. Drª. Ana Leda de Faria Brino. (UFPA) – Orientadora (UFPA) - Coorientadora

Prof. Dr. Wallace Gomes-Leal - Membro

Profª. Drª. Olavo de Faria Galvão - Membro

Profª. Drª. Edna Cristina Santos Franco - Suplente

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades colocadas em meu caminho e por, em nenhum momento durante minha caminhada, ter me deixado desamparada.

Agradeço aos meus pais Edicélia Modesto e Smith Cardoso por sempre me apoiarem e viabilizarem meus estudos, sempre me ensinando o valor do aprendizado e da busca pelo conhecimento. Agradeço especialmente a minha mãe pelo exemplo de força, dedicação e determinação que sempre demonstrou e me ensinou ao longo de minha vida.

Agradeço a minha orientadora Prof^ª Dr^ª Silene Lima por ser minha mãe científica, por viabilizar a realização deste projeto, por todo o aprendizado, todos os conselhos e por ter me recebido em seu laboratório.

Agradeço a professora Ana Leda por me guiar durante a realização da análise comportamental deste projeto sempre buscando me orientar da melhor maneira.

Agradeço a Prof^ª Dr^ª Edna Franco pela disponibilidade de acesso ao Instituto Evandro Chagas, sendo desta forma, essencial na realização desse projeto. Obrigada por me receber de braços abertos e não medir esforços em viabilizar a realização de meus experimentos.

Agradeço ao Grupo de pesquisa Epilepsia Norte, em especial ao professor Wallace Gomes-Leal, o qual teve o questionamento inicial que levou a idealização deste projeto. Agradeço a todos os membros que compõem o grupo por todo o intercâmbio de conhecimento sobre epilepsia gerado.

Agradeço ao meu namorado Filipe Katasho, por todas as vezes que abdicou de seu tempo para me auxiliar, me incentivar e me fazer enxergar além das dificuldades. Obrigada por sempre sair correndo em meu socorro.

Agradeço aos meus amigos de laboratório pelo apoio, ajuda, experiências e pelo conhecimento que compartilhamos ao longo desses anos.

Agradeço ao CNPq e a CAPES pelo auxílio parcial a essa pesquisa exercido através da concessão de bolsa de estudos.

Agradeço a todos que, de alguma forma, apoiaram e/ou viabilizaram a realização deste projeto.

“Você foi enviado das estrelas
Da maneira exata que devia ser...
Da maneira que você amaria,
Da maneira que você cobiçaria,
& da maneira que você encontraria suas asas...
& ninguém deve ter
O poder de levá-las embora de você.”
-Amanda Lovelace-

Resumo

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia focal em adultos e a esclerose hipocampal (EH) é o achado patológico mais comum neste tipo de epilepsia. Em casos refratários de ELT, os pacientes são indicados à cirurgia de ressecção unilateral do hipocampo afetado que geralmente não causa danos cognitivos aos pacientes. Sabe-se que no hipocampo existe uma área neurogênica presente na zona subgranular do giro denteado, a qual promove a formação de novos neurônios mesmo na vida adulta. A existência de neurogênese compensatória na zona subgranular contralateral a cirurgia poderia explicar a ausência de danos cognitivos nesses pacientes. Pretendemos investigar a modulação de neurogênese no hipocampo contralateral remanescente em modelos animais submetidos a cirurgia de hipocampectomia unilateral assim como investigar os processos de aprendizagem e memória. Para isso, utilizamos 18 ratos Wistar adultos, divididos em três grupos, G15 (n = 6), G30 (n = 6) e controle (n = 6). Os grupos G15 e G30 foram submetidos ao procedimento cirúrgico de hipocampectomia unilateral no qual os animais foram profundamente anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) até a completa ausência de movimentos oculares e reflexo interdigitálicos. Os mesmos foram posteriormente fixados em aparelho estereotáxico e o hipocampo dorsal localizado de acordo com as coordenadas estereotáxicas. Em seguida, o córtex adjacente e o hipocampo do hemisfério esquerdo foram completamente removidos cirurgicamente em bloco. Os animais G15 e G30 foram mantidos por um período de sobrevivência de 15 e 30 dias, respectivamente, após a cirurgia. O grupo controle não foi submetido ao procedimento. Para analisarmos se houve algum comprometimento de aprendizado e memória, os animais dos três grupos foram submetidos à análise de aprendizagem no labirinto radial de oito braços durante 7 dias. Após esse período, os animais foram perfundidos com solução salina a 0.9% e paraformaldeído a 4% em Tampão fosfato 0.1M. Os encéfalos foram pós-fixados por 48 horas e seccionados em criostato a 30µm. A seguir, realizou-se imunohistoquímica em seções de hipocampo direito para a visualização de corpos celulares de neurônios maduros (anti-NeuN) e neuroblastos migratórios (anti-DCX). Os resultados do teste comportamental não apresentaram diferenças significativas de aprendizado e memória entre os grupos. A imunomarcagem apresentou diferenças entre os grupos G15 e G30 quando comparados ao grupo controle. Os grupos cirúrgicos apresentaram maior quantidade de neuroblastos marcados quando comparados ao grupo controle, o que nos leva a considerar a possibilidade dessa imunomarcagem indicar uma possível neurogênese compensatória no hipocampo remanescente nesses animais. Além disso, a cirurgia de hipocampectomia unilateral não acarretou danos cognitivos nos nossos animais experimentais, o que está de acordo com os resultados observados em humanos e valida essa metodologia como uma importante ferramenta para investigar as bases neurais que modulam a ELT nos pacientes humanos.

Palavras-chave: Epilepsia, Neurogênese, hipocampo, Cirurgia de Ressecção Hipocampal, Memória, *Rattus norvegicus*.

Abstract

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common type of focal epilepsy in adults and hippocampal sclerosis (HE) is the most common pathological finding in this type of epilepsy. In TLE refractory cases, patients are indicated for unilateral resection surgery of the affected hippocampus which generally does not cause any cognitive impairment in patients. The existence of a hippocampus neurogenic area promotes the formation of new neurons even in adult human is known. A compensatory neurogenesis in the contralateral side of surgery could be responsible to explain a cognitive impairment absence in these patients. We aimed to investigate a possible compensatory neurogenesis in the hippocampus of the contralateral side of surgery in animal models submitted to unilateral hippocampectomy surgery as well to investigate learning and memory processes. For this goal, we have used 18 Wistar rats, divided into three groups, Control, G15 and G30 (N = 6 each). In the G15 and G30 surgical procedure of unilateral hippocampectomy were made. The animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg / kg) and xylazine (10 mg / kg) until complete absence of ocular movements and interdigital reflex. They were transferred to stereotaxic apparatus and the dorsal hippocampus localized by X,Y coordinates. The adjacent cortex and hippocampus of the left hemisphere were completely removed surgically. The G15 and G30 animals were maintained for a survival period of 15 and 30 days, respectively, after surgery procedures. The control group was not submitted to the surgical procedure. To analyze if there was any impairment of learning and memory, the animals of the three experimental groups were submitted to the learning analysis in the eight arms radial maze for 7 days. After this period, the animals were perfused with 0.9% saline and 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. The brains were post-fixed for 48 hours and sectioned in a cryostat equipment at 30µm thick. Histochemical analysis was performed in sections of the right hippocampus for visualization of cell bodies of mature neurons (anti-NeuN) and migratory neuroblasts (anti-DCX). The results of the behavioral test did not show significant differences in learning and memory tasks between groups. Immunostaining otherwise showed labelling pattern differences between the G15 and G30 groups when compared to the control. The experimental groups showed a higher neuroblast cell density in the dentate gyrus and hilus when compared to the control group. These results leads us to consider that could exist a possible compensatory neurogenesis in the remaining hippocampus in these animals. In addition, unilateral hippocampectomy surgery did not responsible to cause any cognitive impairment in our experimental animals, using this methodology and this tool could be an important to investigate the neural bases that modulate ELT in human patients.

Key words: Epilepsy, Neurogenesis, hippocampus, Hippocampal resection surgery, memory, *Rattus norvegicus*.

Lista de abreviaturas e siglas

BSA Bovine Serum Albumin

CA Corno de Ammón

DAB Diaminobenzidine

DCX Doublecortin

EH Esclerose hipocampal

ELT Epilepsia do Lobo Temporal

EMR Erro e memória de referência

EMT Erro de memória de trabalho

GD Giro Dentado

ILAE International League Against Epilepsy (Liga Internacional contra Epilepsia)

“M” Concentração Molar

NeuN Neuronal Nuclei

PBS Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

UFPA Universidade Federal do Pará

WHO World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

Lista de tabelas

Tabela 1. Características dos grupos experimentais (G15 e G30) e Controle, com os respectivos tempos de sobrevivência e número de animais utilizados.....	29
Tabela 2: Anticorpos primários e secundários usados, fabricantes, espécies com as quais reage, diluições recomendadas pelo fabricante e diluições utilizadas.....	38
Tabela 3. Porcentagem de animais que completaram o teste comportamental no labirinto radial de oito braços em cada um dos 7 dias de experimento. O total de animais expostos por dia, em cada grupo, era 6 (n = 6 por grupo).....	51

Lista de figuras

Figura 1. Localização do hipocampo e estruturas adjacentes no encéfalo humano. (Adaptado de Martin, 2013).....	16
Figura 2. Corte anatômico dorsolateral com exposição e visualização do hipocampo e estruturas adjacentes (Adaptado de Andersen et al 2007).....	17
Figura 3. Morfologia do hipocampo de ratos (linha 1) e humanos (linha 2). com visualização das áreas de CA1 CA2 CA3 e Giro denteado. (Adaptado de Andersen et al 2007).....	18
Figura 4. Ilustração do giro denteado com representação das três camadas que o compõem e da estrutura e morfologia das células granulares. (Adaptado de Andersen et al 2007).....	19
Figura 5. Estrutura dos neurônios piramidais das áreas CA1 e CA3 do hipocampo. (Adaptado de Spruston, 2008).....	20
Figura 6. Representação do giro denteado demonstrando as camadas molecular, camada granular e zona subgranular, As células em verde exemplificam o processo de diferenciação celular que ocorre na zona subgranular até o estágio de maturação neuronal (Adaptado de Toni & Schinder, 2016).....	21
Figura 7. Representação sequencial esquemática das etapas do procedimento experimental e suas respectivas finalidades.....	31
Figura 8. Labirinto Radial de oito Braços utilizado neste estudo.....	33
Figura 9. Posicionamento do retículo de contagem sobre o giro denteado. Observa-se que a camada de células granulares é completamente coberta pelas três linhas inferiores do retículo (equivalente a 30 campos com área igual a 0,01875mm ²).....	41
Figura 10. Fotoreconstrução de encéfalo de rato Wistar com secções de 30 µm de espessura coradas por tionina 0,1%. A: Seção referente a animal do grupo controle mostrando os hipocampus direito e esquerdo íntegros. B: Seção referente a animal do cirúrgico mostrando o hipocampo direito íntegro e ausência do hipocampo esquerdo.....	42
Figura 11. Fotomicrografias de secções hipocampais das áreas do Giro denteado e Hilo de animais dos três grupos experimentais (Controle, G15 e G30) com marcação positiva para o anticorpo anti-DCX obtidas em objetiva de 20X (A, B e C) 40X (D, E e F). Escala = 50µm.....	43
Figura 12. Quantificação do número de células DCX+ na área do giro denteado dos	

animais dos grupos controle, G15 e G30 (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm erro padrão. Foi considerado significativo $p < 0,001$).....	44
Figura 13. Quantificação do número de células DCX+ na área do hilo dos animais dos grupos controle, G15 e G30 (ANOVA um critério com pós teste de dunn. Barra de erro \pm erro padrão. Foi considerado significativo $p < 0,001$).....	45
Figura 14 Fotomicrografias de secções do hipocampo de ratos Wistar marcados com anticorpo anti-NeuN mostrando a distribuição de neurônios maduros ao longo das áreas do hipocampo. Em A: secção de hipocampo do grupo controle. Em B secção de hipocampo do grupo G15 Em C: secção de hipocampo do grupo G30. A marcação corresponde a coloração marrom nas ilustrações. (Escala = 300 μ m).....	46
Figura 15. Fotomicrografias de secções hipocampais das áreas de CA1, CA3, Giro denteado e Hilo de animais dos três grupos experimentais (Controle, G15 e G30) com marcação positiva para o anticorpo anti-NeuN obtidas em objetiva de 20X (Escala = 100 μ m).....	47
Figura 16 Fotomicrografias de secções hipocampais das áreas de CA1, CA3, Giro denteado e Hilo de animais dos três grupos experimentais (Controle, G15 e G30) com marcação positiva para o anticorpo anti-DCX obtidas em objetiva de 40X (Escala = 50 μ m).....	48
Figura 17. Tempo médio de exploração do labirinto radial de oito braços por grupo em cada dia de experimento. (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05$).....	51
Figura 18. Tempos de realização do teste nos dias de experimento. A: Grupo controle. B: Grupo G15. C: Grupo G30. (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05$).....	51
Figura 19. Quantificação de erros de memória de trabalho (EMT) no sexto e sétimo dia de teste. A medida de memória de trabalho foi a quantidade de entradas nos braços em que ele já havia consumido o alimento; cada uma dessas reentradas era contabilizada como um EMT (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05$).....	52
Figura 20. Quantificação de erros de memória de referência no sexto e sétimo dia de teste. A medida de memória de referência (memória de longo prazo) foi avaliada pela quantidade de entradas nos braços em que nunca havia alimento; cada uma dessas	

entradas era contabilizada como um EMR. (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05$).....53

Sumário

Introdução.....	15
Objetivo Geral	28
Objetivos específico	28
Método.....	29
Sujeitos.....	29
Ambiente.....	30
Procedimentos	30
Procedimento cirúrgico.....	31
Exposição ao labirinto radial de oito braços para análise de memória de referência e memória de trabalho	33
Perfusão	35
Microtomia e preparo do material biológico.....	36
Coloração de Nissl.....	36
Imunohistoquímica	37
Análise de dados	40
Análise Morfológica do Hipocampo.....	40
Análise qualitativa	40
Análise quantitativa.....	40
Análise Estatística.....	41
Resultados.....	42
Análise morfológica e Imunohistoquímica nos hipocampos contralaterais.....	42
Aumento do número de neuroblastos migratórios nos hipocampos dos animais submetidos a hipocampectomia unilateral.....	43
Morfologia e integridade das camadas dos hipocampos atestada pela marcação de neurônios maduros	46
Exposição ao labirinto radial de oito braços para análise de memória de referência e memória de trabalho	49
Discussão.....	54
Aspectos da morfologia hipocampal evidenciados pela coloração de Nissl.....	54
Aspectos gerais da marcação imunohistoquímica.....	54
Imunomarcação de neuroblastos migratórios.....	55
Imunomarcação de Neurônios maduros.....	56
Existência de neurogênese compensatória em modelos animais	57
Aspectos comportamentais observados em modelos animais submetidos a hipocampectomia unilateral	58
Referências.....	64

Anexo A 75

Introdução

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico que possui prevalência de 1 a 2% da população mundial e que promove um aumento anormal da predisposição a crises convulsivas, as quais, produzem consequências neurofisiológicas, cognitivas e sociais. A mais recente revisão do International League Against Epilepsy (ILAE), publicada em 2014, propõe que uma pessoa tem epilepsia quando apresenta uma convulsão não provocada e seu cérebro, por algum motivo, apresenta uma condição patogênica que o predispõe a possíveis crises epiléticas recorrentes (Fernandes, 2013; Fisher et al., 2005; Fisher et al., 2014; Moreira 2004).

As epilepsias podem ser classificadas conforme seu tipo de crise convulsiva. Em epilepsia geral se a crise se inicia em um circuito neural que atinge os dois hemisférios cerebrais, a crise é classificada como generalizada, entretanto, se seu início envolve uma circuitaria neural com área limitada a um único hemisfério cerebral esta é classificada como focal. A literatura também leva em consideração o estado de consciência do paciente. Neste caso, as crises focais são subdivididas em crises focais conscientes e crises focais com comprometimento de consciência (Fisher et al., 2017; Scheffer et al., 2017).

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo de epilepsia mais comumente encontrada em adultos, possuindo 60% de incidência dentre todas as epilepsias focais. Neste tipo de epilepsia, o foco epilético está localizado no lobo temporal, e em torno de 50% dos casos, no hipocampo (Andersen, Morris, Amaral, Bliss & O'keefe, 2007; Nakahara, 2018).

O tratamento da epilepsia focal é mediado através da administração de medicamentos anti-epiléticos que promovem o controle das crises em cerca de 70% dos casos. Uma porcentagem de 25% a 30% dos pacientes epiléticos é caracterizada como refratária ao tratamento medicamentoso, ou seja, o mesmo não controla as crises. Neste caso, a cirurgia de remoção do foco epilético é indicada (Anyanwu & Motamedi 2018; World Health

Organization. [WHO], 2006).

Pacientes com ELT apresentam uma lesão crônica denominada esclerose hipocampal (EH) que se caracteriza por uma grande perda neuronal na região do hipocampo. Essa alteração é visualizada através da diminuição significativa do volume desta estrutura com desorganização das camadas de células presentes no hipocampo. Sabe-se que a ELT com esclerose hipocampal está relacionada a refratariedade medicamentosa, o que torna os pacientes candidatos a intervenção cirúrgica unilateral do hipocampo para controle das crises (Celiker, Yuksel, Tekin, Sariahmetoglu & Atakli, 2018; Jobst & Cascino 2015; Liao et al., 2018; Malmgren & Thom 2012).

O hipocampo é uma estrutura alongada localizada no lobo temporal medial, no assoalho do corno inferior dos ventrículos laterais, adjacente ao lobo temporal e posterior a amígdala. (Figuras 1 e 2). É subdividido em três áreas denominadas CA1, CA2, CA3 e no giro denteado (GD). A nomenclatura CA é a abreviação de Corno de Ammón e faz referência a forma curvada do hipocampo semelhante a um corno [chifre] (Andersen et al., 2007; Giap, Jong, Ricker, Cullen & Zafonte, 2000; Martin, 2013; Schultz & Engelhardt, 2014; Toni & Schinder, 2016).

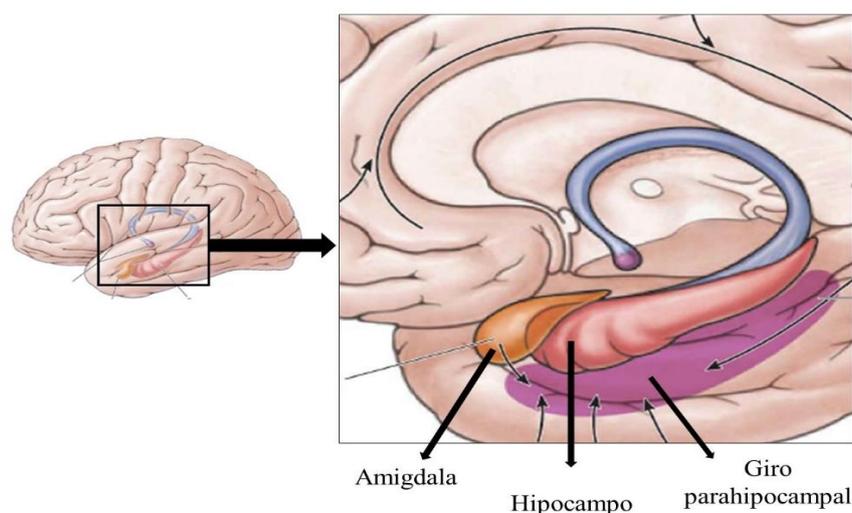


Figura 1. Localização do hipocampo e estruturas adjacentes no encéfalo humano. (Adaptado de Martin, 2013).

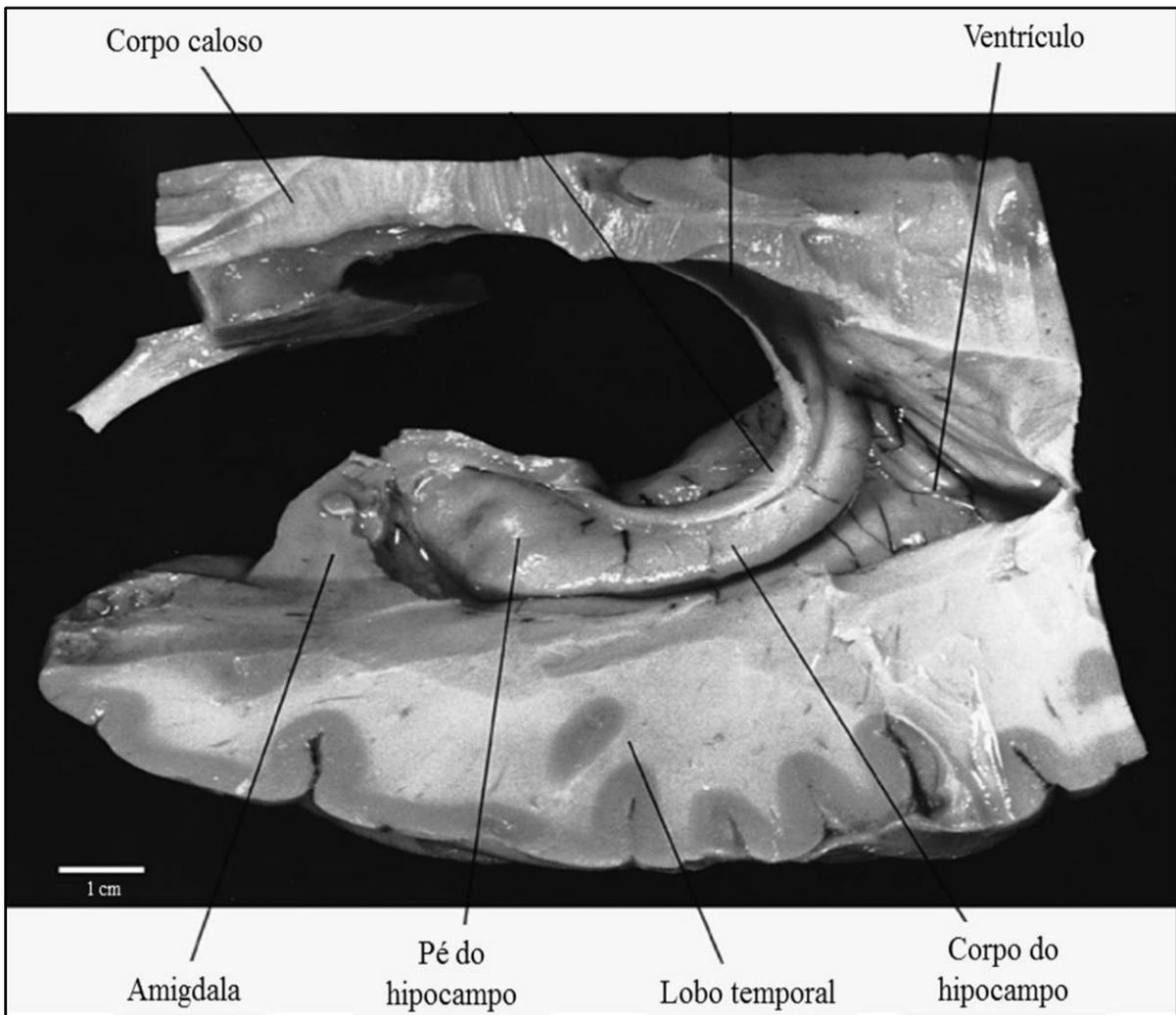


Figura 2. Corte anatômico dorsolateral com exposição e visualização do hipocampo e estruturas adjacentes. (Adaptado de Andersen et al 2007)

As áreas CA são organizadas na forma de uma camada de células com distribuição linear que se estende pelo hipocampo compondo a morfologia característica dessa estrutura (Figura 3). É importante ressaltar que os limites entre as áreas CA1, CA2 e CA3 ainda não estão completamente evidenciados por técnicas anatômicas existentes (Andersen et al., 2007; Giap, Jong, Ricker, Cullen & Zafonte, 2000; Martin, 2013; Schultz & Engelhardt, 2014; Toni & Schinder, 2016).

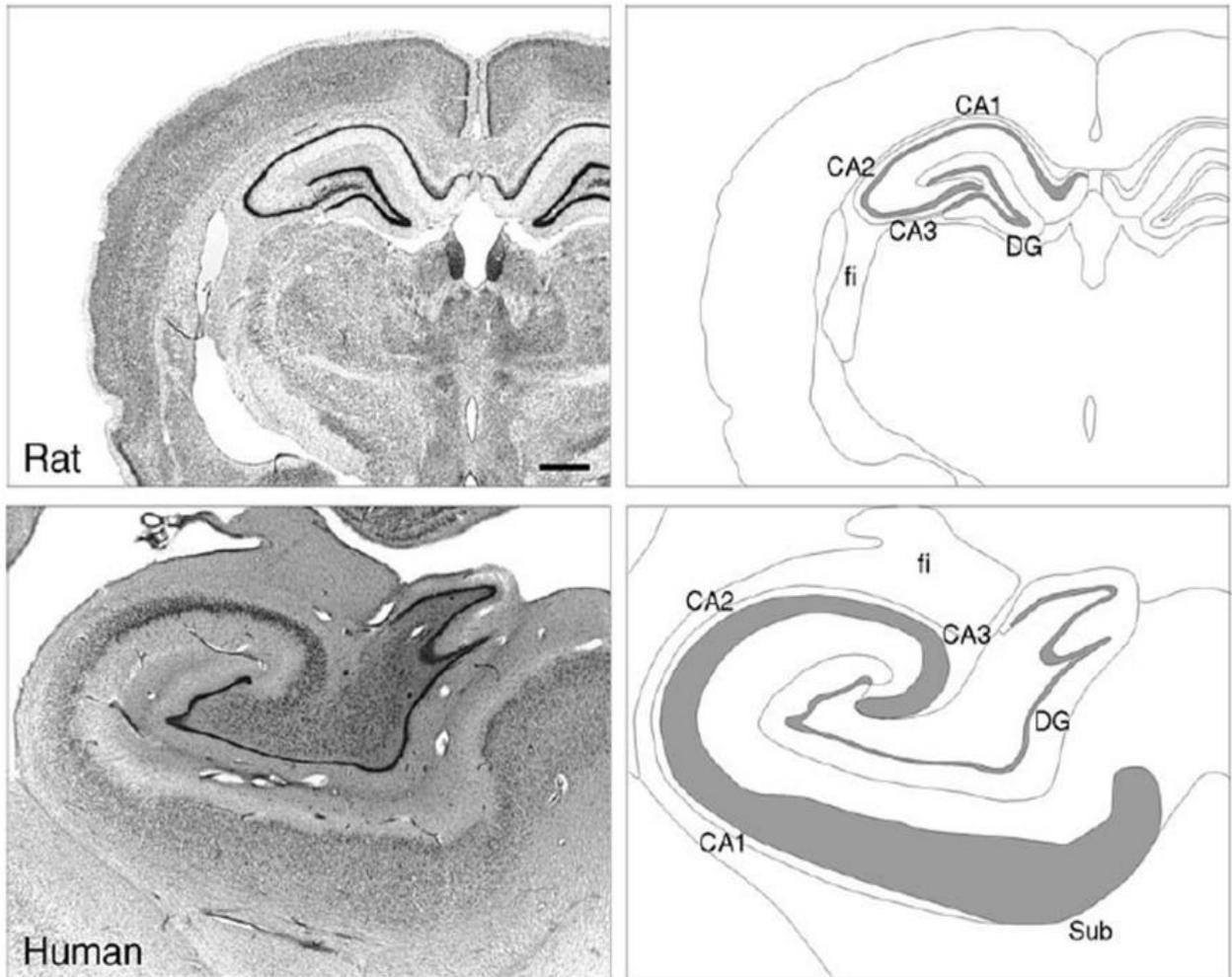


Figura 3. Morfologia do hipocampo de ratos (linha 1) e humanos (linha 2). com visualização das áreas de CA1 CA2 CA3 e Giro denteado. (Adaptado de Andersen et al 2007).

O giro denteado é uma estrutura em forma de V localizada posteriormente a região de CA3, ele é composto por três camadas, a camada molecular, a camada das células granulares e a camada polimórfica, seu principal tipo neuronal são as células granulares. Nessas células a árvore dendrítica emana do corpo celular apresentando uma morfologia cônica. Seus corpos neuronais estão presentes na camada de células granulares e seus dendritos se projetam na direção da superfície da camada molecular (Figura 4).

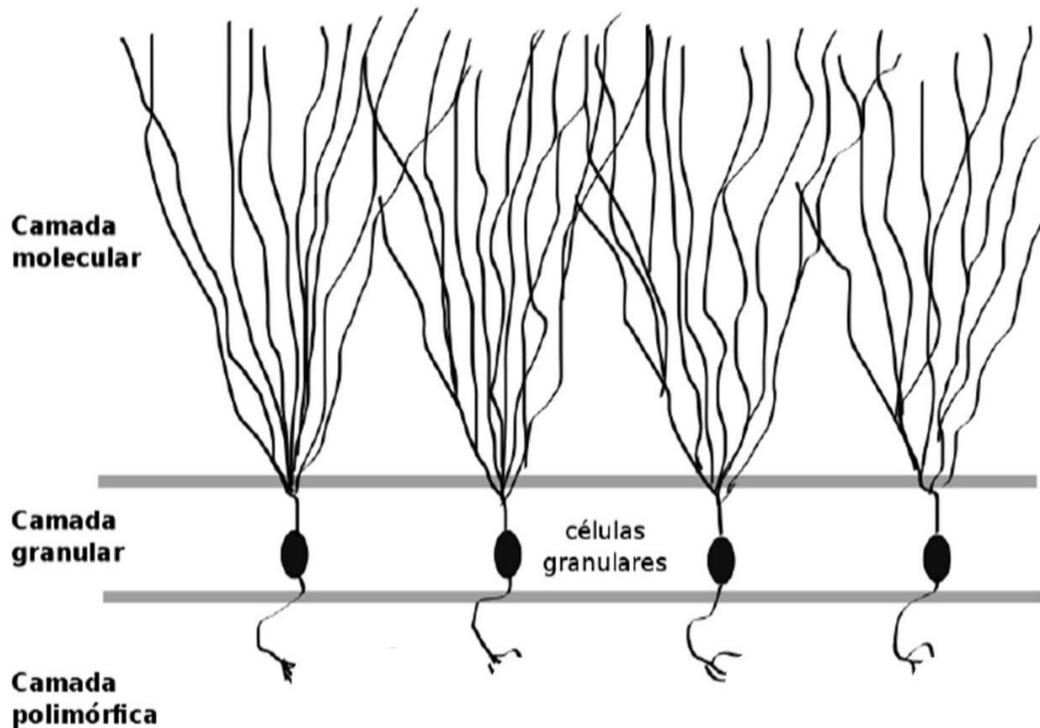


Figura 4. Ilustração do giro denteado com representação das três camadas que o compõem e da estrutura e morfologia das células granulares. (Adaptado de Andersen et al 2007).

O principal tipo neuronal presente nas regiões CA do hipocampo são os neurônios piramidais. Esse tipo neuronal é caracterizado por uma árvore dendrítica com dois domínios distintos: Um com vários dendritos basais relativamente curtos descendentes da base do corpo neuronal e outro com um tufo de dendritos apicais conectados ao corpo celular através de um longo dendrito apical (axônio) largamente ramificado [Figura 5] (Andersen et al., 2007; Spruston, 2008; Toni & Schinder, 2016).

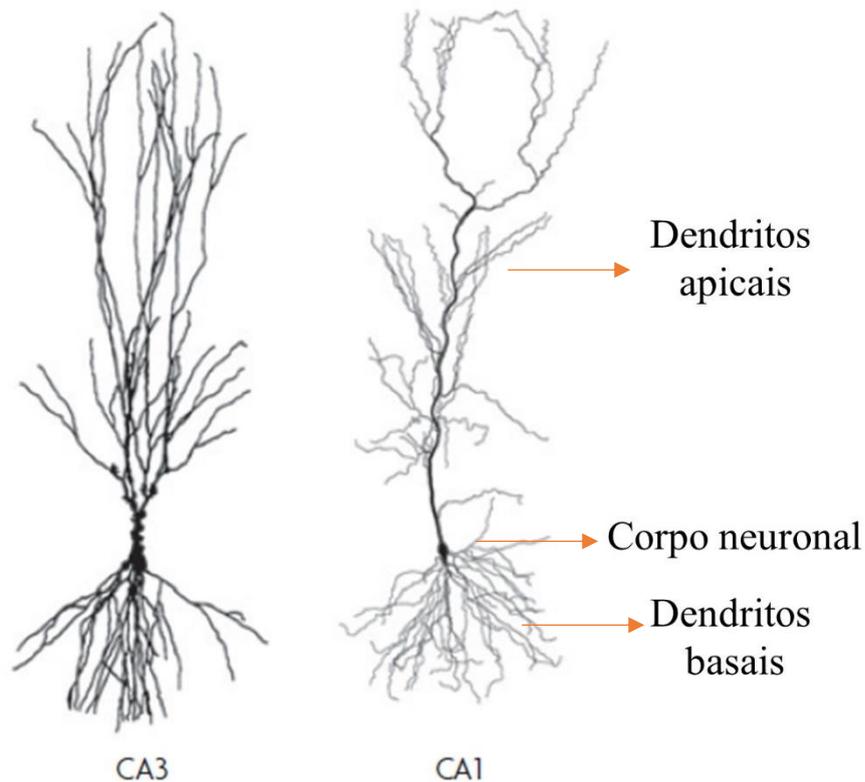


Figura 5. Estrutura dos neurônios piramidais das áreas CA1 e CA3 do hipocampo. (Adaptado de Spruston, 2008).

Entre a camada granular e a camada polimórfica do giro denteado existe uma zona denominada de zona subgranular, a qual possui células tronco neurais e células progenitoras neuronais que passam por vários estágios de diferenciação até chegarem a fase de neurônios maduros. Em roedores, ao longo desse processo de diferenciação ocorre a expressão de diferentes marcadores celulares que viabilizam a identificação do estágio e período de maturação que a célula se encontra. O DCX (Doublecortin), por exemplo, é uma proteína associada a microtúbulos expressa em neuroblastos migratórios durante o período de diferenciação celular (os microtúbulos atuam na citoarquitetura das células auxiliando a inserção daquele neurônio ao circuito neural adulto durante seu estágio de migração e maturação). A expressão do DCX ocorre durante a fase de maturação celular por volta de 2 semanas, diminuindo significativamente sua expressão após a completa maturação neuronal que ocorre em torno de 4 semanas [Figura 6] (Fasemore et al., 2018;

Gonçalves, Schafer & Gage, 2015; Toni & Schinder, 2015).

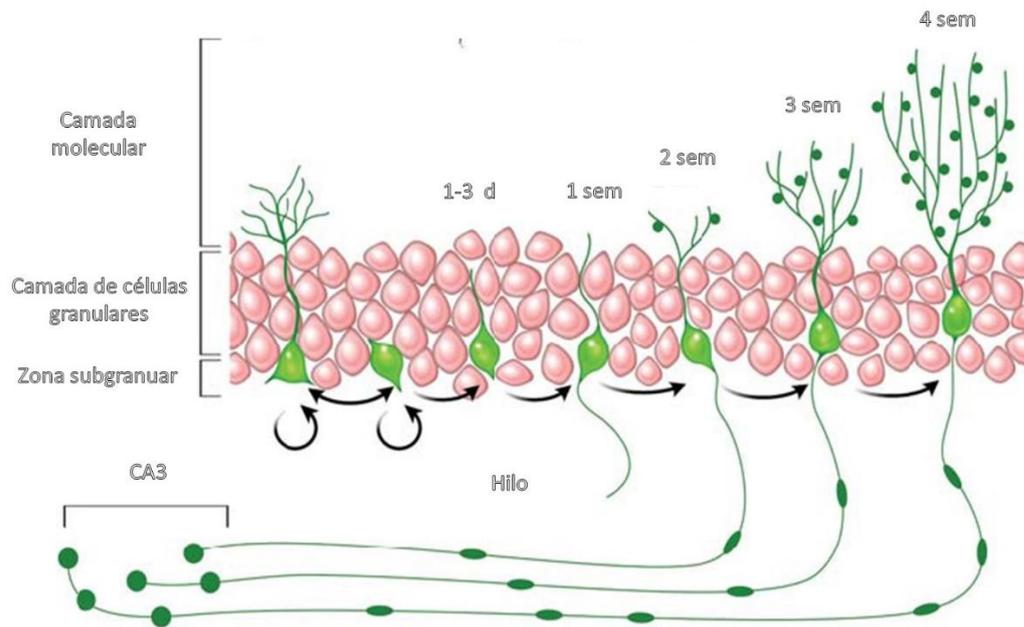


Figura 6. Representação do giro denteado demonstrando as camadas molecular, camada granular e zona subgranular, As células em verde exemplificam o processo de diferenciação celular que ocorre na zona subgranular até o estágio de maturação neuronal (Adaptado de Toni & Schinder, 2016).

O processo de geração e integração de novos neurônios é denominado de Neurogênese. Durante muito tempo a comunidade acadêmica não identificou esse processo ocorrendo no cérebro adulto, o que levou muitos pesquisadores à conclusão de que ela só ocorreria nos estados iniciais do desenvolvimento (Colucci-D'Amato, Bonavita, & di Porzio, 2006; Tavares & Gomel-Leal 2011; Ramón-y-Cajal & May, 1928).

Esse dogma começou a ser modificado a durante a segunda metade do século XX, quando na década de 1960, Joseph Altman utilizou timidina marcada radioativamente para marcar células mitóticas. Altman demonstrou a presença de células mitoticamente ativas no hipocampo de mamíferos adultos. Embora seu trabalho inicial não comprove exatamente que essas células fossem neurônios, ele marcou o início de uma sequência de estudos sobre neurogênese no encéfalo de mamíferos adultos (Altman, 1962; Colucci-

D'amato, Bonavita & di Porzio, 2006; Gomes-Leal 2009; Kaplan & Hinds 1977).

Na década de 1970 Michael Kaplan desenvolveu estudos que demonstraram que células mitóticas presentes no bulbo olfatório e hipocampo de roedores adultos apresentavam características estruturais de neurônios. Embora corrobore com o trabalho de Altman, a crítica da comunidade científica da época foi que glias também poderiam receber sinapses assim como incorporar a timidina marcada durante estágios de reparo celular. Essas afirmações desacreditaram o trabalho de Kaplan. (Altman, 1962; Colucci-D'amato, Bonavita & di Porzio, 2006; Gomes-Leal 2009; Kaplan & Hinds 1977; Nottebohm 2000).

Na década de 80 Fernando Nottebohm demonstrou que no sistema nervoso de canários existiam núcleos vocais que quando induzidos à hipertrofia produziam células mitóticas com ultraestrutura de neurônios. Nottebohm fez uma série de experimentos nesses núcleos hipertrofiados que incluíam microscopia eletrônica e registros eletrofisiológicos. Nottebohm comprovou absolutamente que essas células eram neurônios mitóticos ao invés de glias. No entanto os trabalhos foram criticados atribuindo esse evento exclusivamente ao encéfalo de pássaros e não tendo relevância para mamíferos (Altman, 1962; Colucci-D'amato, Bonavita & di Porzio, 2006; Gomes-Leal, 2009; Nottebohm 2000; Reynolds & Weiss 1992).

Durante a década de 90 a existência de neurogênese em encéfalos de mamíferos adultos foi corroborada por diversos trabalhos e gradativamente aceita pela comunidade científica. No final dessa década Eriksson realizou uma pesquisa com material encefálico de humanos que promoveu a marcação de células mitóticas concomitante com a marcação de proteínas presentes no núcleo de neurônios maduros. Dessa forma finalmente existência de neurogênese no encéfalo de humanos adultos foi comprovada (Altman, 1962; Colucci-D'amato, Bonavita & di Porzio, 2006; Eriksson et al., 1998; Gomes-Leal,

2009; Nottebohm 2000; Reynolds & Weiss 1992).

Uma metodologia comum para análise de neurogênese se fundamenta na marcação específica de neurônios recém-formados pela técnica de imunohistoquímica. Existem inúmeros anticorpos que viabilizam a análise de determinadas proteínas. O DCX (Doublecortin) é uma proteína associada a microtúbulos expressa por neuroblastos (neurônios imaturos) durante sua migração e inserção no circuito neural. O NeuN (Neuronal Nuclei) é uma proteína presente no núcleo de neurônios maduros. O BrdU (bromodeoxiuridina) é um composto análogo da timidina que quando injetado no organismo é incorporado ao DNA das células mitóticas durante a fase S da divisão celular. O DCX, o NeuN e o BrdU podem ser marcados por anticorpos que viabilizam sua visualização por microscopia (Gomes-Leal, 2009; Liu et al., 2018; Tavares & Gomes-Leal, 2011; Thored et al., 2006).

Atualmente sabe-se que o processo de geração de novos neurônios ocorre naturalmente no cérebro adulto de mamíferos em duas zonas identificadas até o presente momento, a zona subgranular do giro denteado e a zona subventricular na parede dos ventrículos laterais. Diversos trabalhos que corroboram esses resultados utilizam como metodologia marcação por imunohistoquímica (Amrein, 2015; Colucci-D'Amato et al., 2006; Danilov et al., 2009; Ernest et al., 2014; Gage, 2002; Obernier & Alvarez-Buylla, 2019).

A neurogênese adulta pode ser modulada por diversos fatores. Ela pode ser induzida pela prática de exercícios físicos, assim como pode ser inibida por privação de sono e administração crônica de álcool e drogas. Ela também pode ser alterada por uma série de alterações patológicas agudas e crônicas tais como Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington, AVE e Epilepsia. (Geil et al., 2014; Gil-Mohapel, Simpson, Ghilan & Christie 2011; Jin et al., 2006; Kreutzmann, Havekes, Abel & Meerlo, 2015; Lazarov &

Marr 2010; Nokia et al., 2016; Schlett, 2006; Zhong, Ren & Tang 2016).

Mesmo com todos esses trabalhos a área de estudos que envolve a neurogênese é relativamente nova, diferente dos estudos sobre a formação hipocampal, a qual tem sido alvo de análise há mais tempo. Os primeiros achados relacionados às funções da formação hipocampal são derivados de estudos em pacientes que possuíam danos cerebrais na região do lobo temporal medial. O paciente H.M. é um dos casos mais bem conhecidos e documentado de danos cognitivos decorrentes de lesão nos dois lobos temporais. H.M. era um paciente que possuía epilepsia do lobo temporal refratária ao tratamento medicamentoso e, devido a isto, foi submetido a um procedimento cirúrgico de retirada de uma parte significativa de ambos os lobos temporais mediais, (procedimento realizado com a finalidade de controle das crises epiléticas recorrentes). As crises foram controladas, entretanto, H.M. desenvolveu um sério prejuízo na consolidação de novas memórias (Amnésia anterógrada) (Bear, Connors & Paradiso, 2007; Kandel, Schwartz & Jessell, 1995; Squire 2009; Squire & Wixted 2011).

As memórias possuem várias formas de classificação. Com relação ao tempo de duração, elas podem ser classificadas em memórias de curto prazo ou longo prazo. As memórias de curto prazo (memória de trabalho) são aquelas que possuem duração de segundos a minutos, sendo depois eliminadas ou consolidadas em memórias de longo prazo. As memórias de longo prazo (Memória de referência) são aquelas que, quando consolidadas, possuem duração de dias, semanas, anos ou até mesmo a vida inteira do indivíduo (Bear et al., 2007; Hall & Guyton, 2011; Kandel et al., 1995; Silverthorn, 2007).

Normalmente, os estudos de mecanismo neurofisiológicos em humanos obtém material biológico proveniente de neurocirurgias (como a hipocampectomia) ou em estudos post-mortem o que dificulta o acesso a esse material. Sendo assim, os modelos animais são extremamente bem-vindos e utilizados na área das neurociências pois

apresentam uma grande eficácia e viabilidade experimental pois existe muita similaridade de vários aspectos do sistema nervoso de mamíferos (Amrein, 2015; Duncan, Lowe, Dalton & Valenzuela, 2016; Faggion, 2015; Paine, Willsher, Nicholson, Sebire, & Jacques, 2014; Scorza et al., 2009; Thom, Zhou, Martinian, & Sisodiya, 2006; Wu et al., 2001).

Esses modelos animais podem ser utilizados tanto para análises histológicas e bioquímicas quanto para análises de padrões comportamentais. Modelos animais para análises de processos de memória possuem grande viabilidade e padronização, sendo que a utilização de labirintos para as medidas de aprendizagem e memória tem sido usual. Chan et al. (2004), utilizando metodologias com labirintos, demonstrou que ratos epiléticos precisam de mais tempo para aprendizagem do que ratos não epiléticos. Zou, Yamada, Sasa e Nabeshima (1999), utilizando modelos semelhantes, demonstraram que lesão hipocampal causada por excitotoxicidade provoca déficits de memória de trabalho e memória espacial em ratos. Ward, Oler e Markus (1999) também demonstraram que lesões no hipocampo podem promover deficiência de aprendizagem e de consolidação de memória de longo prazo em treinos realizados em labirintos.

Um instrumento de análise comportamental de aprendizagem e memória é o labirinto radial de oito braços (ver metodologia). Ele consiste em um aparato amplamente padronizado para análises de memória de referência e trabalho. Ele é formado por uma plataforma central da qual se irradiam oito braços e possibilitam a avaliação de aprendizagem e memória após a exposição do animal a correlações entre comida e locais específicos do labirinto (Rathod, Khaire, Kemse, Kale & Joshi, 2014); basicamente, mede-se a memória avaliando-se se a exposição do animal às correlações entre comida e determinados braços do labirinto, isso é suficiente para que o animal, em uma nova exploração do local, acesse direto nos braços em que a comida esteve disponível no

passado (Chan et al., 2004; Iscru et al., 2013; Karnam, Zhao, Shatskikh & Holmes, 2009; Kemse, Kale, Chavan-Gautam & Joshi, 2018; Rathod et al., 2014; Rathod, Khaire, Kale & Joshi, 2015; Soman, Korah, Jayanarayanan, Mathew & Paulose, 2012).

Ao explorar o labirinto, o animal apresenta um padrão comportamental a partir do qual se pode medir regularidades ou déficits de aprendizado e memória em relação a animais não lesionados. Na exposição ao labirinto, segundo a teoria do condicionamento operante, a aprendizagem dependeria da relação entre a resposta do animal e o encontro do alimento. Neste contexto, o alimento funciona como um estímulo reforçador e o braço, como um estímulo discriminativo que controla a resposta de entrada em braços que ele já encontrou alimento previamente e braços que nunca possuíam alimento. A emissão dessas respostas está diretamente relacionada com a capacidade que o animal possui de responder sob controle discriminativo dos braços do aparato que possuíam alimento durante a exploração, e também dos braços que nunca possuíam alimento; além disso, uma boa aprendizagem no aparato, implicaria que o animal deve também responder sob controle do braço em que ele acabou de consumir o alimento, não retornando a ele durante a exploração do labirinto (Chan et al., 2004; Iscru et al., 2013; Kemse, 2018; Rathod et al., 2014,2015; Sério, Andery, Gioia, & Micheletto, 2010; Skinner, 1953).

Uma das funções do hipocampo é o processamento e consolidação de memórias de longo prazo (memória de referência). Atualmente sabe-se que informações sensoriais oriundas de várias partes do sistema nervoso chegam até o hipocampo, onde serão integradas e consolidadas, nesse contexto, o hipocampo é um importante centro de integração, no qual as memórias chegam, são processadas e enviadas para diversas partes do córtex. O processo de consolidação de memórias é extremamente importante para atividades da vida diária, déficits nesse processo podem prejudicar diretamente o estilo de vida de seus portadores (Hall & Guyton, 2011).

Já foi amplamente relatado que danos bilaterais à formação hipocampal podem produzir prejuízos na capacidade de consolidação de memórias em humanos, e que a extensão desses prejuízos está relacionada à extensão de danos à formação hipocampal e área cortical adjacente. Entretanto, os pacientes portadores de ELT submetidos ao procedimento cirúrgico de hipocampectomia unilateral geralmente não apresentam déficits relacionados a evocação e consolidação de memória. É possível que possa existir um mecanismo compensatório como, por exemplo, processos relacionados a sua atividade neurogênica. Um número maior de células neuronais hipocampais poderiam estar viabilizando esse aumento de atividade neural e explicaria os motivos pelos quais os pacientes pós cirúrgicos geralmente não apresentam déficits cognitivos relacionados a consolidação de memória (Bear et al., 2007; Squire, 2009; Squire & Wixted, 2011; Kandel et al., 1995; Vojtěch et al., 2012)

Atualmente, muitos estudos envolvendo neurogênese e epilepsia utilizam modelos animais em sua execução sabe-se, por exemplo, que é possível induzir epilepsia do lobo temporal em ratos através da administração de pilocarpina e que este é um modelo amplamente utilizado para análises dos mecanismos celulares envolvidos no quadro de epilepsia do lobo temporal. Sabe-se também que os eventos neurogênicos presentes no encéfalo de ratos são extremamente semelhantes em humanos e relatou-se, em ratos, a indução de epilepsia pode levar ao aumento da neurogênese hipocampal. No entanto, nenhum estudo relatou que esse aumento no padrão neurogênico pode ser induzido apenas pela remoção de um dos hipocampus sem a interferência do quadro epiléptico. A cirurgia de hipocampectomia por si só pode ser um evento modulatório de neurogênese hipocampal uma vez que o hipocampo remanescente provavelmente passa por uma série de eventos compensatórios para garantir a funcionalidade íntegra das atividades hipocampais remanescentes. Essa cirurgia consiste na retirada de uma parte do córtex

adjacente à formação hipocampal, parte da amígdala, cabeça e corpo do hipocampo. Essa cirurgia já foi relatada como eficiente no controle das crises epiléticas nas quais o foco epilético é o hipocampo e apresenta uma baixa morbimortalidade (Amrein, 2015; Andersen et al., 2007; Girvin & Eliasziw, 2001; Hung et al., 2012; Jobst & Cascino 2015; Mathon et al., 2015; Scorza et al., 2009; Wiebe, Blume ; Wu et al., 2001).

Desta forma, esse projeto teve como finalidade investigar os efeitos da cirurgia de hipocampectomia unilateral sobre a neurogênese do hipocampo remanescente e sobre o aprendizado e memória em modelos não-epiléticos. Essas relações foram investigadas em um modelo experimental que possuiu ratos como sujeito.

Objetivo Geral

Investigar possíveis efeitos compensatórios de neurogênese celular hipocampal e processos cognitivos de aprendizado e memória em ratos Wistar adultos submetidos ao processo de hipocampectomia unilateral.

Objetivos específico

- Implementar um modelo de remoção cirurgica em bloco e unilateraral do hipocampo e região cortical adjacente;
- Investigar os padrões neurogênicos no hipocampo remanescene após hipocampectomia unilateral para avaliar possíveis efeitos compensatórios;
- Avaliar estatisticamente se ocorrem diferenças comportamentais relacionadas à aprendizagem e memória de referência em diferentes tempos de vida pós cirurgia, de 15 e 30 dias, comparado com o controle;
- Avaliar estatisticamente se ocorrem diferenças comportamentais relacionadas à aprendizagem e memória de trabalho em diferentes tempos de vida pós cirurgia, de 15 e

30 dias, comparado com o controle.

Método

Sujeitos

Para a realização dos procedimentos foram utilizados 18 ratos da raça Wistar, obtidos do biotério central da UFPa e mantidos no biotério do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração experimental, certificado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal. Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPa (CEPAE-UFPa) sob o protocolo de número 6552280616. Foram respeitadas as normas para utilização de animais de experimentação sugeridas pela *Society for Neuroscience* (SfN, USA), *National Institute of Health* (NIH, USA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPa (CEPAE-UFPa).

Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas, com a temperatura ambiente regulada em torno de 25° C, respeitando um ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*, além do controle de ectoparasitas.

O projeto teve três grupos de animais experimentais sendo dois grupos cirúrgicos denominados G15 e G30 além de um grupo controle, (6 animais cada). Os grupos cirúrgicos foram submetidos ao procedimento cirúrgico de remoção do hipocampo esquerdo (hipocampectomia unilateral) e tiveram um período de vida pós-cirúrgica de, 15 (grupo G15) e 30 (grupo G30) dias. Os animais do grupo controle não foram expostos a quaisquer tipos de procedimentos cirúrgicos experimentais. (Ver características de cada grupo na Tabela 1).

Tabela 1. Características dos grupos experimentais (G15 e G30) e Controle, com os respectivos tempos de sobrevivência e número de animais utilizados.

Grupos	Hipocampo esquerdo	Hipocampo direito	Tempo de vida pós-cirúrgica	Nº de Animais
Controle	Preservado	Preservado	-	6
G15	Removido	Preservado	15d	6
G30	Removido	Preservado	30d	6
				Total: 18

Ambiente

O procedimento cirúrgico foi realizado em sala individualizada, devidamente iluminada e preparada para esta finalidade do Laboratório de Neurobiologia localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFPa,.

O Procedimento comportamental, por sua vez, foi realizado no Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFPa, em uma sala adaptada ao lado do biotério para facilitar a manipulação dos animais.

Procedimentos

O procedimento experimental consistiu em etapas sequenciais, cada uma com sua finalidade, e que viabilizou a etapa seguinte até o processo de obtenção dos dados da pesquisa. Os procedimentos consistiram em: Procedimento cirúrgico, o qual teve como finalidade promover a retirada do hipocampo esquerdo dos animais; Exposição ao treino e teste no labirinto radial de oito braços (LR8B), que teve como finalidade investigar como estão as capacidades cognitivas de aprendizagem e memória dos animais após a

cirurgia; Perfusão que permitiu melhor preservação de estruturas biológicas teciduais, neste caso, os encéfalos dos animais; Microtomia, que consistiu na secção do material biológico (cortes em fatias semi finas) o que viabilizou a análise celular por microscopia óptica binocular. Coloração de Nissl, que consiste na coloração inespecífica de corpos celulares. Imunohistoquímica, que consistiu na marcação específica de estruturas celulares através da utilização de anticorpos policlonais e monoclonais. (Figura 7).

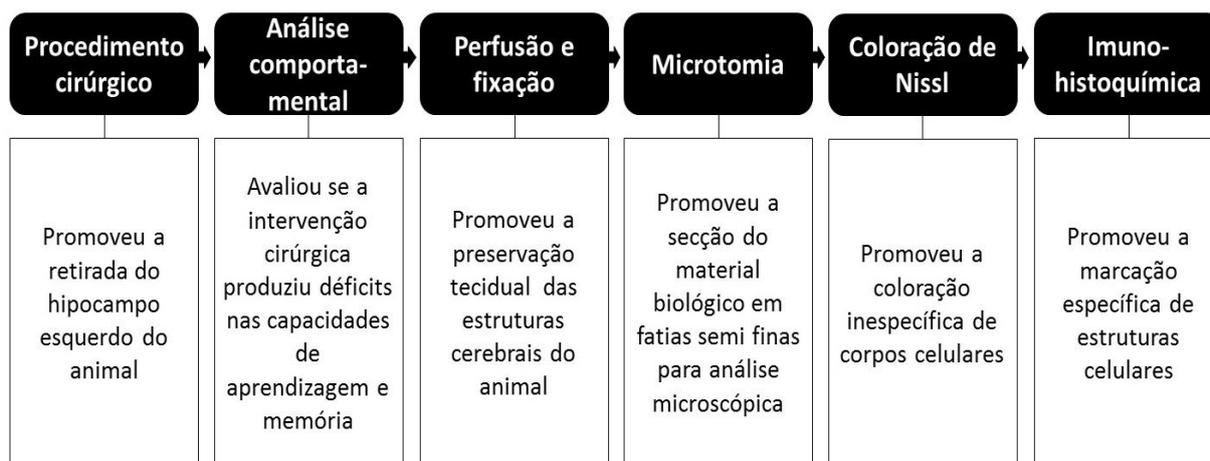


Figura 7. Representação sequencial esquemática das etapas do procedimento experimental e suas respectivas finalidades.

Procedimento cirúrgico

Os Grupos G15 e G30 foram submetidos a um procedimento cirúrgico de retirada unilateral do hipocampo esquerdo e possuíram tempos de vida pós-cirúrgica de 15 dias e 30 dias, respectivamente (Tabela 1).

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg e cloridrato de cetamina na dose de 80mg/kg, por via intraperitoneal e foi aguardado o tempo necessário para que o animal não apresentasse reflexo interdigitálico, para que o procedimento cirúrgico fosse iniciado. Durante o procedimento, foi necessário administrar injeções de reforço da anestesia em alguns animais, essas injeções foram ajustadas na proporção de 1/3 da dose inicial (Adaptado de Gomes-Leal, Corkill, Freire, Picanço-Diniz & Perry, 2004).

Primeiramente, foi realizada a tricotomia da região da cabeça do animal na qual ocorreu a cirurgia, que consistiu na remoção dos pêlos do topo da cabeça do rato. A seguir, o animal foi fixado no aparelho estereotáxico, as barras foram posicionadas e a cabeça do animal foi fixada no aparelho com anestesia local (lidocaína) no conduto auditivo do animal.

Após a fixação do animal, foi feita a assepsia da pele da cabeça do animal com álcool iodado seguida de uma incisão cirúrgica longitudinal e subsequente exposição da calota craniana com visualização do bregma e da sutura sagital.

No aparelho estereotáxico foram ajustadas as coordenadas para a localização do hipocampo dorsal segundo o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1998). Essas coordenadas distam -1.5 mm no sentido médio- lateral (M/L), e +2.8 mm no sentido Antero-Posterior (A/P) tendo o bregma como referência. A partir desse ponto, a correspondência entre as coordenadas selecionadas e a localização do hipocampo dorsal só foram confirmadas posteriormente por análise histológica.

Com a utilização de uma broca odontológica, número 1, foi realizada a craniotomia, na região ao redor da área de referência do hipocampo (indicada pelas coordenadas estereotáxicas). Com auxílio de uma lupa cirúrgica, OME 5000 para melhor visualização das estruturas anatômicas, foram removidas primeiramente as meninges, em seguida o córtex adjacente foi retirado expondo a porção dorsal do hipocampo, o qual foi individualizado e removido em bloco. Após a remoção do hipocampo, foi administrado uma pequena dose de pó hemostático na região para minimizar o sangramento. Ao final do procedimento, a pele da região da cabeça foi suturada e uma pomada anti-inflamatória foi administrada para auxiliar o processo de cicatrização. Uma sequência de antibióticos foi administrada no animal durante três dias com intervalo de 24 horas. O animal foi colocado em uma gaiola limpa e permaneceu em ambiente isolado e controlado até a

recuperação dos movimentos, após o qual foi transferido para o biotério.

Exposição ao labirinto radial de oito braços para análise de memória de referência e memória de trabalho

Os testes comportamentais tiveram como objetivo avaliar se a intervenção cirúrgica descrita na página 28 produziu déficits de aprendizagem e memória em ratos. Para avaliar esses possíveis déficits, foi usado como aparato o Labirinto Radial de 8 braços (Figura 8).



Figura 8. Labirinto Radial de oito Braços utilizado neste estudo.

Antes do início do teste, os animais passaram por um período de adaptação alimentar (em torno de 4 dias) no qual os animais tiveram uma diminuição da quantidade de ração, sendo que 24 horas antes do início do procedimento o animal foi submetido à privação total de alimento. Esta etapa tem como objetivo aumentar o valor reforçador do alimento para o animal, aumentando a probabilidade de o animal consumir o alimento durante a realização do treino e teste no labirinto, e possibilitando assim a aprendizagem.

Os procedimentos de treino e teste comportamentais foram iniciados aos animais

dos grupos experimentais G15 e G30 no oitavo (8º) e vigésimo terceiro (23º) dia, respectivamente, após a cirurgia de remoção hipocampal para que desta forma o teste comportamental se encerrasse exatamente no décimo quinto e trigésimo dia de sobrevivência após a cirurgia (este período foi escolhido com base no tempo de maturação neuronal). Os animais do grupo controle não passaram por procedimentos cirúrgicos e, portanto, para este grupo, não houve definição de data para o início do teste.

O procedimento comportamental teve duração de sete dias consecutivos e consistiu na realização de sete dias de exposição do sujeito ao labirinto. A literatura indica que há mudança nas medidas de aprendizagem abaixo descritas desde cinco dias de exposição, entretanto o período de análise pode ser estendido por mais tempo, dessa forma, o período de sete dias foi escolhido baseado em trabalhos que utilizam sete dias de exposição, em conjunto com a adaptabilidade deste período ao período de sobrevivência utilizado nessa pesquisa.

Nos sete dias, durante as sessões, o rato explorava o labirinto, sendo uma sessão de exploração por dia para cada animal. Em todos os dias, pedaços de alimento eram colocados em quatro braços específicos do labirinto, sempre nos mesmos quatro braços.

Cada dia de exploração era iniciado com o animal sendo colocado na plataforma central, permitindo que o mesmo explorasse livremente o aparato. O animal podia explorar o labirinto pelo tempo máximo de dez minutos (600 segundos) ou pelo tempo necessário para que ele consumisse todo o alimento presente no aparato, o que ocorresse primeiro. Para medir a aprendizagem por meio da exploração, foi avaliada a duração total de cada sessão. Essa medida foi avaliada nos sete dias de exposição ao labirinto.

A medida de memória de referência (memória de longo prazo) foi avaliada pela quantidade de entradas nos braços em que nunca havia alimento; cada uma dessas entradas era contabilizada como um erro de memória de referência (EMR).

Por fim, a medida de memória de trabalho foi a quantidade de entradas nos braços em que ele já havia consumido o alimento; cada uma dessas reentradas era contabilizada como um erro de memória de trabalho (EMT).

Essas duas medidas (EMR e EMT) foram avaliadas apenas nos dois últimos dias de exposição ao labirinto.

Perfusão

O procedimento de perfusão foi realizado após o término dos procedimentos comportamentais, como os grupos G15 e G30 tiveram seus dias de testes comportamentais adaptados para que seu término coincidissem com o dia final do seu período de sobrevivência pós-cirúrgica, a perfusão foi realizada no 15º dia de sobrevivência no grupo G15 e 30º dia de sobrevivência no grupo G30.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg e cloridrato de cetamina na dose de 80mg/kg, por via intraperitoneal. Foi verificado, continuamente, se o animal apresentava reflexo interdigitálico, somente após o animal não responder mais a este estímulo, o procedimento cirúrgico foi iniciado. (Adaptado de Gomes-Leal et al., 2004).

Nesta metodologia, a caixa torácica foi exposta e o coração do animal foi conectado a um sistema de perfusão extracorpórea, que viabilizou a injeção de solução salina 0,9% com heparina (1mL de heparina por litro de solução salina) para lavagem do sistema circulatório do animal e retirada do sangue. Em seguida, os animais foram perfundidos com solução fixadora de paraformaldeído 4% em PB 0,1M para a fixação imediata dos tecidos do animal. Após a realização desse procedimento, foi feita uma craniotomia, que consistiu na remoção da calota craniana do animal e possibilitou a retirada do encéfalo do animal. Em seguida, esse encéfalo foi imediatamente imerso em solução de paraformaldeído 4% por cerca de três dias.

Microtomia e preparo do material biológico

Anterior ao processo de corte em criostato os encéfalos foram retirados da solução de paraformaldeído e mergulhados em uma sequência de três soluções de crioproteção (soluções de glicerina e sacarose em Tampão fosfato 0.1M,) com concentrações crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) onde permaneceram em cada solução por dois dias.

Após a crioproteção os encéfalos foram seccionados em criostato Leica CM1850 em temperatura ajustada para -35°C com espessura de corte de 30µm. As secções (foram armazenadas em tubos contendo solução anticongelante e armazenados em freezer a -20°C para posterior análise histológica.

Coloração de Nissl

A coloração de Nissl foi utilizada para avaliar se o procedimento cirurgico viabilizou a remoção completa do hipocampo esquerdo dos animais. A coloração foi realizada conforme o protocolo a seguir.

Foram selecionados cortes dos animais dos grupos cirúrgicos e controle. Esses cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e submetidos a uma bateria de coloração (álcool 100%, 70%, 50%, 20%, Água destilada, solução de tionina 0,1%, xilol). As lâminas foram imersas nas soluções de álcool na sequência de solução com maior concentração para menor concentração (álcool 100%, 70%, 50%, 20%) com tempo de incubação de 1 minuto em cada solução. Em seguida os cortes foram imersos em água destilada por 1 minuto seguido pela imersão na solução de tionina 0,1% durante 8 segundos.

Após a tionina 0,1%, as lâminas foram novamente imersas em água destilada por 45 segundos seguido da imersão sequencial nas soluções de álcool desta vez com sequência indo de solução com menor concentração para maior concentração (Álcool

20%, 50%, 70%, 90% 100%) com tempo de incubação de 45 segundos em cada.

As lâminas foram imersas em xilol durante 30 minutos na sequência foi realizada montagem com Permount (Fisher Scientific) e lamínula, para proteção tecidual.

Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi utilizada para avaliação das possíveis alterações no mecanismo de compensação neural nos hipocampus remanescentes dos ratos após os períodos de sobrevida pós-cirúrgica pré-estabelecidos para cada grupo. As marcações foram realizadas conforme demonstra a tabela a seguir:

Tabela 2: Anticorpos primários e secundários usados, fabricantes, espécies com as quais reage, diluições recomendadas pelo fabricante e diluições utilizadas.

Anticorpo	Fabricante (código)	Reatividade	Diluição recomendada	Diluição utilizada
Anti-DCX Policlonal feito em cabra	Santa Cruz (sc-8066)	Camundongo, rato e humano	1:50 – 1:500	1:100
Anti-NeuN Monoclonal feito em camundongo (clone A60)	LSBio (LS-C312122)	Camundongo, rato, humano, furão, porco, aves e salamandra.	1:25 – 1:100	1:50
Anticorpo secundário biotinilado anti-cabra feito em cavalo	Vector (BA9500)	Cabra	1:200	1:200
Kit LSAB2 SYSTEM-HRP	Dako (K0675)	Camundongo/ Coelho	Solução pronta para uso	

O procedimento de imuno-histoquímica foi realizado em modelo free-floating e dividido em duas metodologias ambas com dois dias de experimento.

Para a marcação de neurônios maduros foi utilizado o anticorpo anti-NeuN (Mullen, Buck & Smith, 1992). A metodologia utilizada está descrita a seguir: No primeiro dia, os cortes foram escolhidos, retirados da solução anticongelante e transferidos para poços de placas de cultura devidamente identificados, a seguir foi realizada uma bateria de três lavagens com tampão Fostato Salino 0.1M (PBS 0.1M) para

remoção da solução anticongelante (cada lavagem durou 5 minutos em agitação). Na sequência, as secções foram incubadas com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂ 3%) durante 15 minutos, no escuro, para bloqueio da peroxidase endógena. Após os quinze minutos, outra bateria de lavagens com PBS 0.1M para remoção da solução da solução de bloqueio foi realizada.

Para promover a recuperação antigênica as secções foram finalmente incubadas com solução de ácido cítrico em banho maria a 90°C durante 20 minutos. Outra bateria de lavagem com PBS 0.1M foi realizada para remoção da solução de ácido cítrico. A permeabilização do tecido efetuada com solução de saponina durante 10 minutos, seguida de outra bateria de lavagem com PBS 0.1M.

O tecido foi incubado com solução de BSA (Bovine Serum Albumin) 10% durante 30 minutos para bloqueio de proteínas inespecíficas e posteriormente incubado com o anticorpo primário Anti-NeuN (ver tabela 2) durante toda a noite (overnight).

No segundo dia, foi realizada uma bateria de lavagem com PBS 0.1M para remoção do excesso de anticorpo primário, seguida da incubação com biotina por 30 minutos, outra bateria de lavagem com PBS 0.1M e incubação com estreptavidina durante 30 minutos. O método utilizado foi o LSAB-Labelled Streptavidin Biotin (Dako K0675), que consiste na ligação da biotina com o anticorpo primário seguido da ligação entre a biotina e a estreptavidina (esta conjugada com enzima peroxidase). Na sequência, a revelação com solução DAB (Diaminobenzidina) foi realizada conforme descrito a seguir.

Nesta etapa mais uma bateria de lavagem com PBS 0.1M foi feita para remoção do excesso de estreptavidina, na sequência a revelação com solução DAB (Diaminobenzidina) foi realizada com tempo de reação variando entre 01 e 03 minutos. A reação foi interrompida pela lavagem em solução de Tampão Fosfato 0.1M (PB 0.1M).

Para a marcação com o anticorpo Anti-DCX a metodologia utilizada está descrita

a seguir.

No primeiro dia, os cortes foram escolhidos, retirados da solução anticongelante e transferidos para poços de placas de cultura devidamente identificados, a seguir realizou-se uma bateria de duas lavagens com PBS 0.1M para remoção da solução anticongelante (cada lavagem durou 5 minutos em agitação). Na sequência, foi feito o pré-tratamento com tampão borato em banho maria com temperatura de 60°C durante 25 minutos, em seguida a placa foi retirada do banho maria e mantida em temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento. Na sequência, as secções foram incubadas com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂ 3%) durante 20 minutos, no escuro, para bloqueio da peroxidase endógena. Após os 20 minutos, uma bateria de 3 lavagens com PBS/TWEEN (5 minutos em agitação cada lavagem) para remoção da solução de bloqueio foi realizada.

Os cortes foram incubados em soro normal de cavalo durante uma hora para bloqueio de proteínas inespecíficas e posteriormente incubado com o anticorpo primário anti-DCX (ver tabela 2) durante toda a noite (overnight).

No segundo dia, foi realizada uma bateria de lavagem com PBS/TWEEN para remoção do excesso de anticorpo primário, seguida da incubação com anticorpo secundário biotilado anti-cabra feito em cavalo (ver tabela 2) durante 2 horas. Outra bateria de lavagem em PBS/TWEEN para remoção do anticorpo secundário foi realizada.

Os cortes foram incubados com solução ABC para formação do complexo biotina estreptavidina durante 2 horas e novamente submetidos a bateria de lavagem com PBS/TWEEN. Na sequência, a revelação com solução DAB (Diaminobenzidina) foi realizada com tempo de reação variando entre 04 e 05 minutos. A reação foi interrompida pela lavagem em solução de Tampão Fosfato 0.1M (PB 0.1M).

Todos os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e submetidos a uma

bateria de desidratação (álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, xilol 1, xilol 2, com tempo de incubação de 2 minutos em cada solução) seguidos pela montagem com Permount e lamínula, para proteção tecidual.

Análise de dados

Análise Morfológica do Hipocampo

Análise qualitativa

Após o procedimento de imunohistoquímica as secções de todos os grupos experimentais e do grupo controle foram analisadas em microscópio óptico Zeiss Imager Z1. Imagens de campos representativos foram obtidas com auxílio de uma câmara (Zeiss AxioCam HRc) acoplada ao microscópio.

Análise quantitativa

A análise microscópica foi feita em um microscópio binocular OLYMPUS BX41. As células marcadas positivas para anti-DCX de todos os grupos experimentais foram contadas com auxílio de uma objetiva de 40X com retículo de contagem de área $0,0625\text{mm}^2$ acoplado a ocular do microscópio OLYMPUS BX41. Para a contagem foram utilizadas no mínimo 4 secções por animal, com pelo menos 3 animais por grupo.

O retículo de contagem de área total de $0,0625\text{mm}^2$ dividido em 100 campos iguais foi posicionado na área escolhida para a contagem. A contagem foi realizada em toda a extensão do giro denteado e na área inicial do hilo. Na região do giro denteado o retículo foi posicionado sobre a camada de células granulares. Por esta camada apresentar característica morfológica mais compacta a área contada nesta região limitou-se a $0,01875\text{mm}^2$ equivalente aos 30 campos do retículo de contagem que cobriam a região (Figura 9).

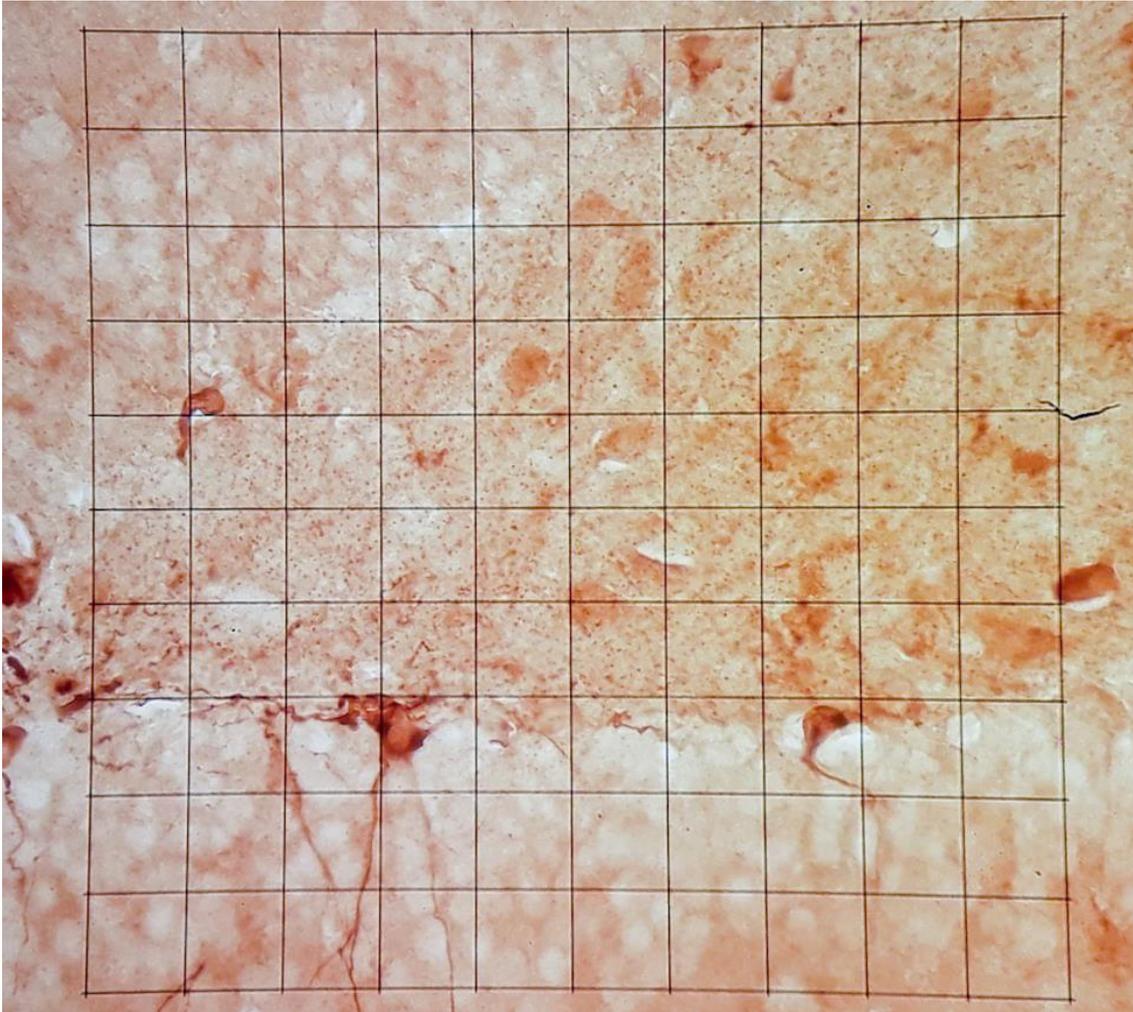


Figura 9. Posicionamento do retículo de contagem sobre o giro denteado. Observa-se que a camada de células granulares é completamente coberta pelas três linhas inferiores do retículo (equivalente a 30 campos com área igual a 0,01875mm²)

Análise Estatística

Tanto a análise comportamental quanto a análise quantitativa das células DCX+ foram avaliada estatisticamente através da comparação entre grupos controle e os dois grupos experimentais (G15 e G30) utilizando o teste de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn ou ANOVA um critério com pós teste de Tukey. O nível de significância estipulado foi de $p < 0,05$.

A análise estatística foi expressa através de médias, desvios padrão e erros padrão de cada grupo G15, G30 e grupo controle e foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 7.0.

Resultados

Análise morfológica e Imunohistoquímica nos hipocampus contralaterais

Foi realizada análise imunohistoquímica em 14 hipocampus contralaterais retirados após o tempo de sobrevivência e fixação tecidual. Somente 4 hipocampus, 3 controles e 1 G30, não foram utilizados na análise por apresentarem má fixação e/ou má preservação tecidual. Em todos os grupos realizou-se a coloração de Nissl a fim de observar a integridade do tecido e a marcação completa do hipocampo.

Coloração de Nissl

A coloração de Nissl apresentou boa coloração e visualização das estruturas morfológicas hipocâmpais. É possível visualizar ambos os hipocampus do animal controle (Figura 10A) assim como o hipocampo remanescente do animal do grupo cirúrgico (Figura 10B). Observa-se que no animal cirúrgico o hipocampo esquerdo foi completamente removido enquanto que o hipocampo direito foi preservado (Figura 10B).

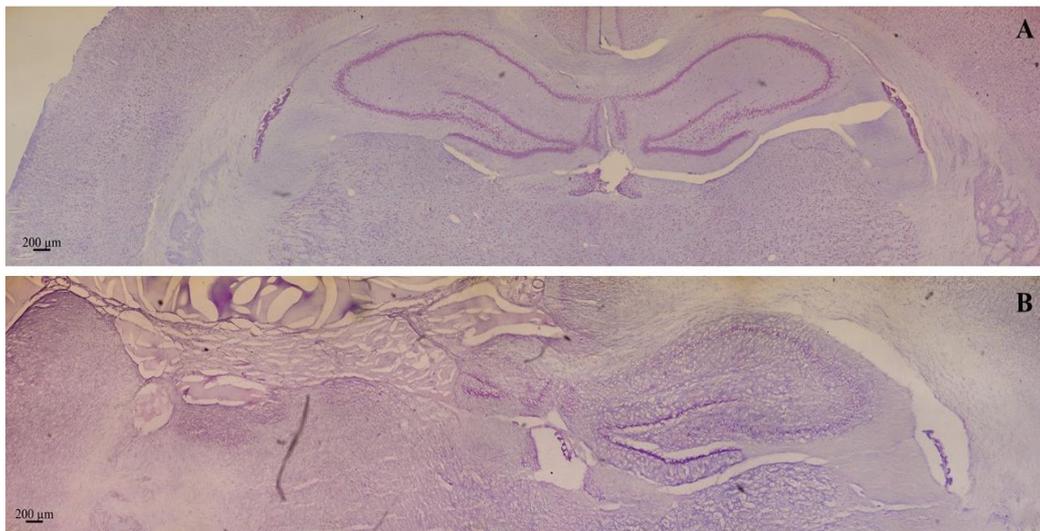


Figura 10. Fotoreconstrução de encéfalo de rato Wistar com seções de 30 µm de espessura coradas por tionina 0,1%. A: Seção referente a animal do grupo controle mostrando os hipocampus direito e esquerdo íntegros. B: Seção referente a animal do cirúrgico mostrando o hipocampo direito íntegro e ausência do hipocampo esquerdo.

Aumento do número de neuroblastos migratórios nos hipocampus dos animais submetidos a hipocampectomia unilateral

A marcação de neuroblastos migratórios foi realizada com o anticorpo anti-DCX (ver Tabela 2) e apresentou marcação positiva para neuroblastos migratórios (DCX+) para as secções dos três grupos experimentais na área do giro denteado e no hilo (Figura 11). No entanto, foram encontradas diferenças no padrão de marcação entre os grupos. No grupo controle (Figuras 11A e 11D) a marcação evidenciada que ocorreu no giro denteado e no hilo apresentou células imunorreativas ao anti-DCX, no entanto quando comparado com os grupos experimentais G15 (Figuras 11B e 11E) e G30 (Figuras 11C e 11F) observou-se que a marcação positiva que também foi evidente nas áreas nas regiões do hilo (h) e giro denteado (GD) apresentou um aumento do número de neuroblastos marcados (Figura 11).

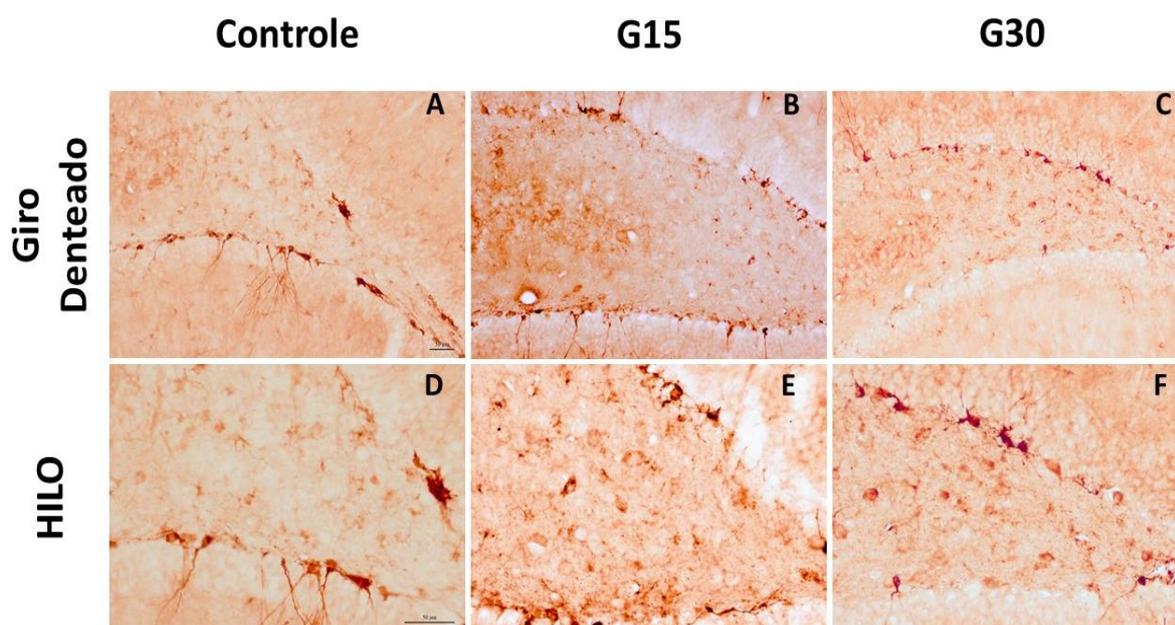


Figura 11. Fotomicrografias de secções hipocâmpais das áreas do Giro denteado e Hilo de animais dos três grupos experimentais (Controle, G15 e G30) com marcação positiva para o anticorpo anti-DCX obtidas em objetiva de 20X (A, B e C) 40X (D, E e F). Escala = 50µm.

Análise Giro Denteado

A marcação com anti-DCX no giro denteado apresentou marcação positiva tanto no grupo controle quanto nos grupos G15 e G30 na camada de células granulares (Figura 11A, 11B e 11C). A contagem de células indica que nos grupos cirúrgicos G15 e G30 a quantidade de células imunoreativas é significativamente maior quando comparado com o grupo controle (Figura 12). Observa-se também essa diferença entre os grupos cirúrgicos, o grupo G15 apresenta um maior número de células DCX+ quando comparado com o grupo G30. Esses resultados indicam um aumento na expressão de DCX nos grupos cirúrgicos principalmente no período de 15 dias após a cirurgia (grupo G15).

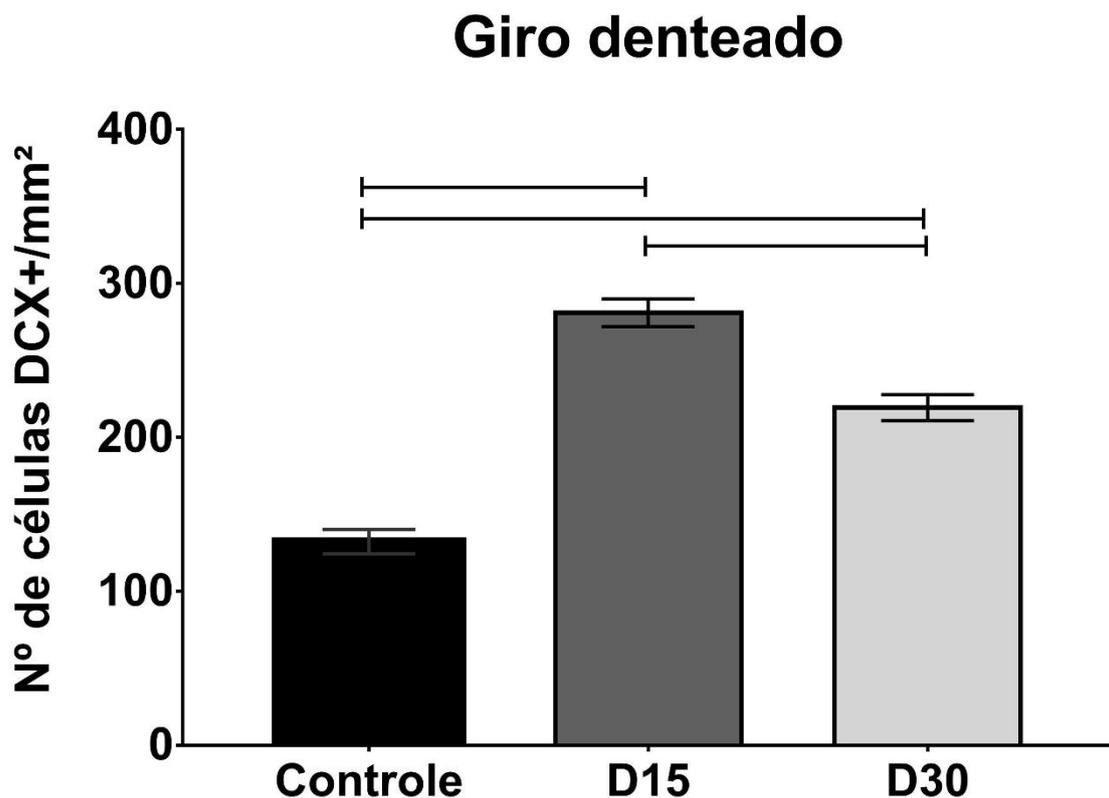


Figura 12. Quantificação do número de células DCX+ na área do giro denteado dos animais dos grupos controle, G15 e G30 (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm erro padrão. Foi considerado significativo $p < 0,001$).

Análise Hilo

Na área do hilo foi observado células marcadas positivamente para DCX nos três grupos (Figuras 11D, 11E e 11F). Entretanto, nos grupos G15 e G30, a densidade celular é maior quando comparado com o grupo controle (Figura 11E e 11F). Essa diferença é confirmada pela contagem de células imunorreativas que demonstra que esse aumento é significativo (Figura 13). Os grupos G15 e G30 não apresentam diferenças significativas entre si. Esses resultados indicam que na região do hilo também ocorre um aumento do número de células imunorreativas ao anti-DCX nos animais dos grupos cirúrgicos (G15 e G30).

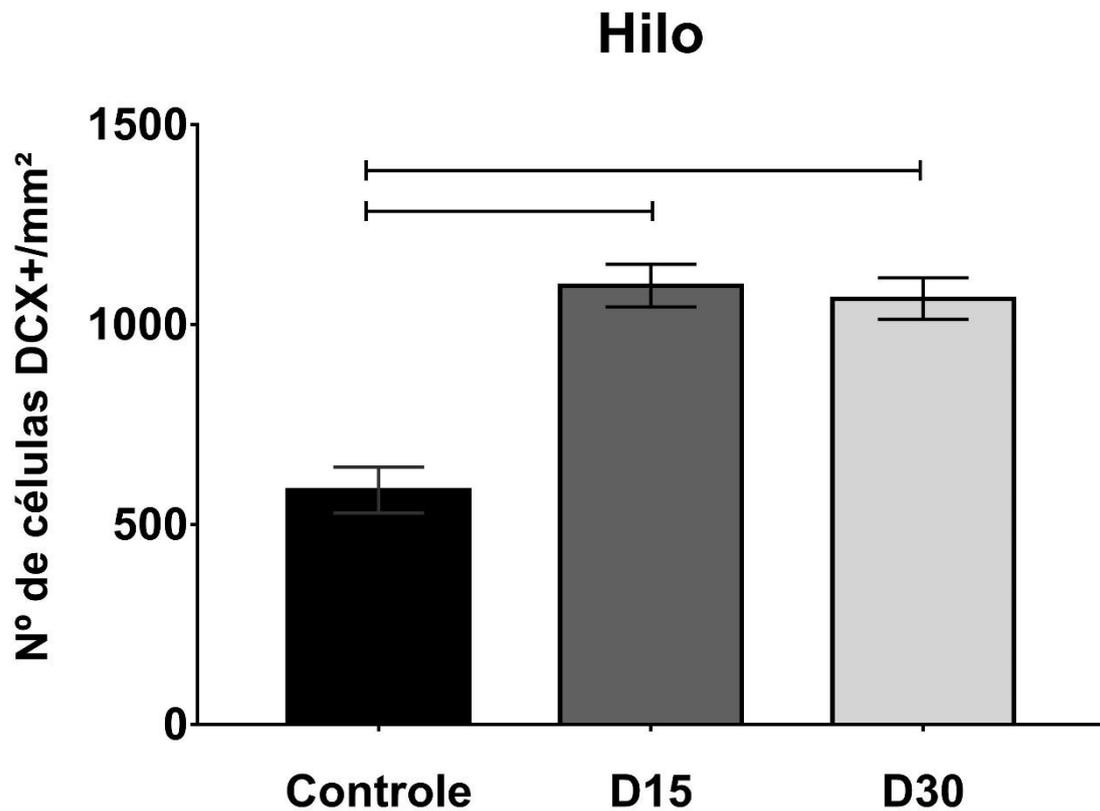


Figura 13. Quantificação do número de células DCX+ na área do hilo dos animais dos grupos controle, G15 e G30 (ANOVA um critério com pós teste de dunn. Barra de erro \pm erro padrão. Foi considerado significativo $p < 0,001$).

Morfologia e integridade das camadas dos hipocampus atestada pela marcação de neurônios maduros

A marcação de neurônios maduros foi feita com o anticorpo anti-NeuN (Ver tabela 2) e apresentou marcação positiva nas secções dos hipocampus de animais dos três grupos conforme ilustrado na figura 14.

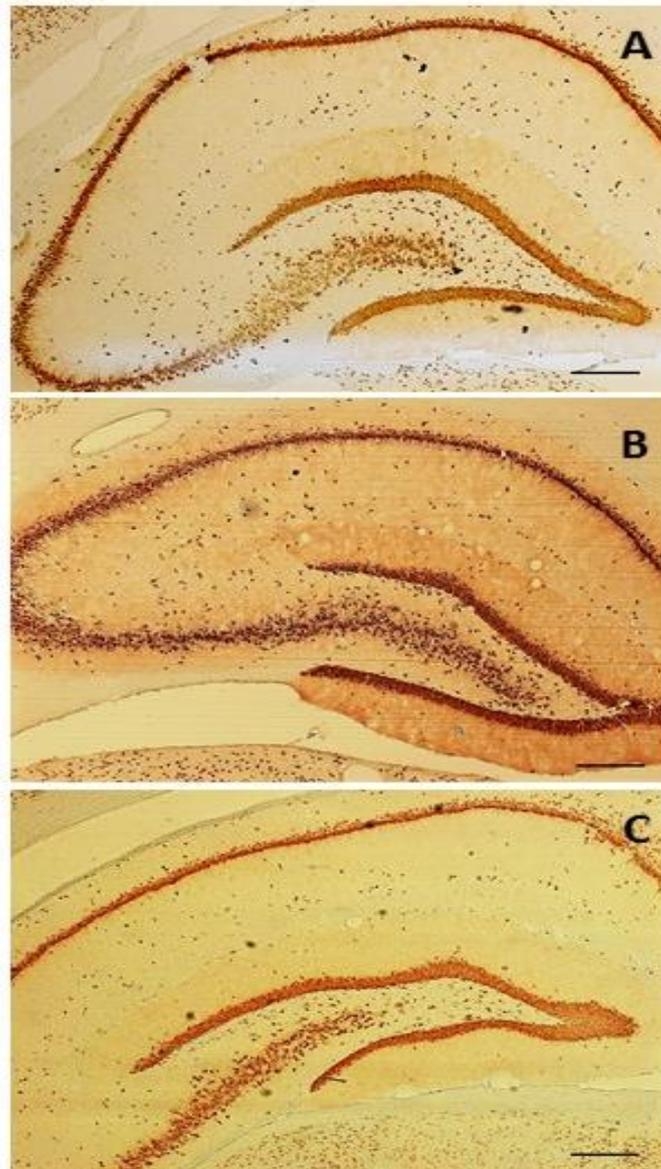


Figura 14. Fotomicrografias de secções do hipocampo de ratos Wistar marcados com anticorpo anti-NeuN mostrando a distribuição de neurônios maduros ao longo das áreas do hipocampo. Em A: Secção de hipocampo do grupo controle. Em B Secção de hipocampo do grupo G15 Em C: Secção de hipocampo do grupo G30. A marcação corresponde a coloração marrom nas ilustrações. (Escala = 300 μ m).

Análise CA1

A marcação de NeuN na camada de células de CA1 evidencia corpos celulares de neurônios maduros em formação linear característica na camada de células granulares (Figuras 15A, 15B e 15C e 16A, 16B e 16C).

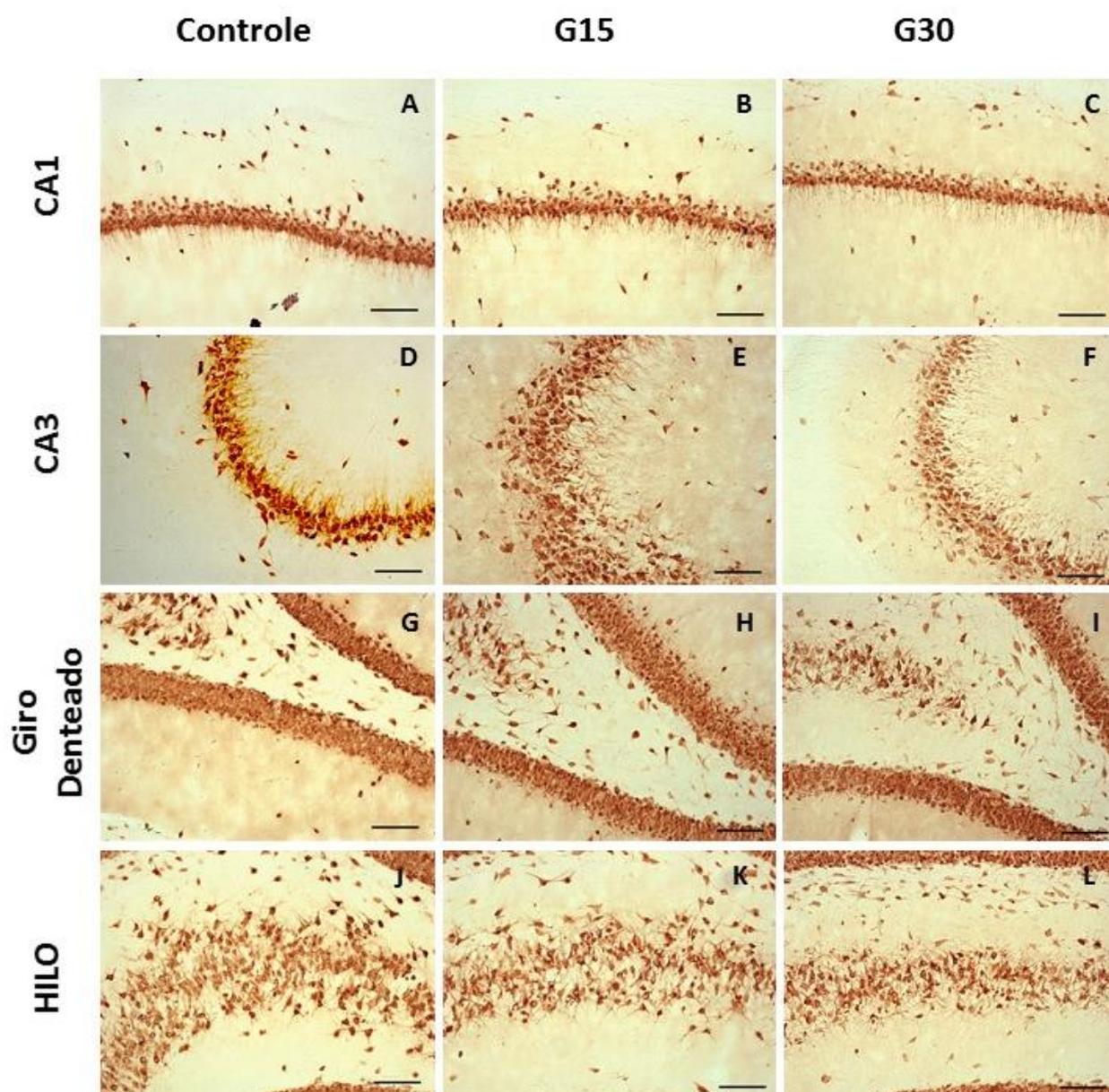


Figura 15. Fotomicrografias de seções hipocâmpais das áreas de CA1, CA3, Giro dentado e Hilo de animais dos três grupos experimentais (Controle, G15 e G30) com marcação positiva para o anticorpo anti-NeuN obtidas em objetiva de 20X (Escala = 100 μ m).

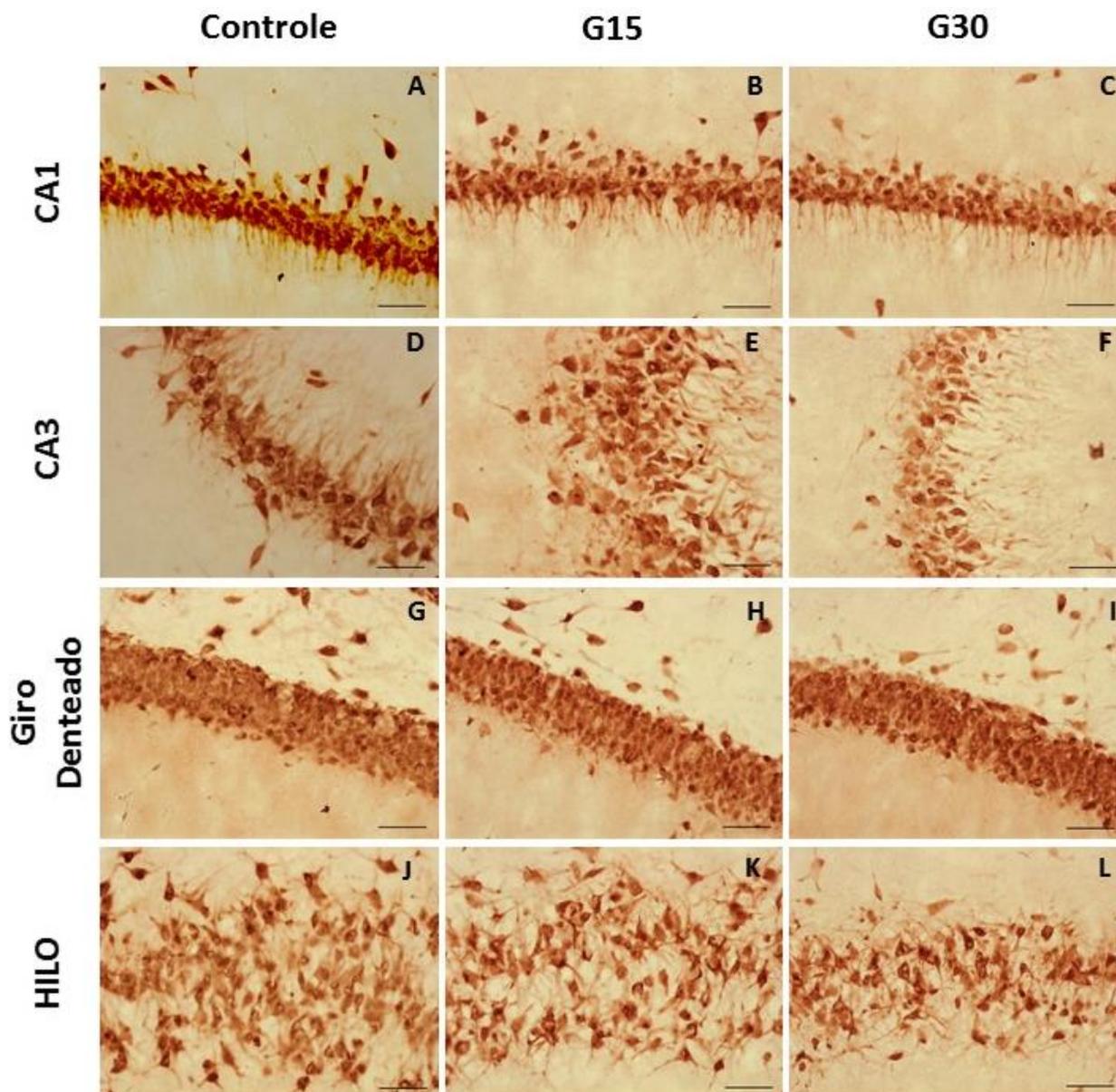


Figura 16. Fotomicrografias de secções hipocâmpais das áreas de CA1, CA3, Giro denteado e Hilo de animais dos três grupos experimentais (Controle, G15 e G30) com marcação positiva para o anticorpo anti-DCX obtidas em objetiva de 40X (Escala = 50µm).

Análise CA3

A marcação na região de CA3 mostrou a distribuição diferenciada dos neurônios maduros na área de CA3. Em uma análise qualitativa e comparativa entre o grupo controle (Figura 15D), grupo G15 (Figura 15E) e o grupo G30 (Figura 15F) notou-se que parece haver uma maior expressão de neurônios imunorreativos a NeuN no grupo G15 (Figura

15E e 16E) que, por conseguinte espalham-se na camada granular. Não houve aparente diferença significativa entre os grupos controle (Figura 15D e 16D) quando comparados ao grupo G30 (Figura 15F e 16F).

Análise Giro Denteado:

A marcação de NeuN no giro denteado mostra a marcação positiva de neurônios maduros em todos os três grupos (Controle, G15 e G30) sem grandes diferenças visuais entre os grupos. Podemos observar a camada de células granulares com distribuição das células em formação linear e padrão de marcação celular típico da camada de células granulares (Figura 15G-I E 16G-I).

Análise Hilo:

Na área do Hilo foi observado marcação positiva dos neurônios maduros nos três grupos (Controle, G15 e G30) conforme ilustrado nas figuras 15J-L e 16J-L. No grupo G15 foi observada diminuição da densidade de células marcadas quando comparado ao grupo controle. (Figura 15K e 16K). No grupo G30 foi observada diminuição da densidade de células marcadas com estreitamento da camada de células em comparação com os demais grupos. (Figura 15L e 16L).

Exposição ao labirinto radial de oito braços para análise de memória de referência e memória de trabalho

Para a avaliação de aprendizagem e memória, 18 animais adultos foram utilizados (n = 6 cada grupo). Todos os animais aprenderam a coletar o alimento presente no final dos quatro braços do aparato e nenhum rato apresentou problemas de adaptação ao labirinto. O tempo máximo que os animais permaneceram no labirinto foi de 10 minutos (600 segundos) e o mínimo registrado foi de 143 segundos.

A tabela 3 mostra a porcentagem de animais que completaram o teste no labirinto

antes de 10 minutos no decorrer dos sete dias de experimento para todos os três grupos. Todos os animais do Grupo Controle completaram o teste a partir do segundo dia de exposição até o dia final, com exceção do dia 4, em que um dos animais apenas não completou (83%). As porcentagens foram menores para os animais dos grupos experimentais. Para o G30, a porcentagem de animais que terminavam antes do tempo foi crescendo gradualmente, até que 100% dos animais terminaram o teste antes do tempo do Dia 4 em diante. Para o Grupo G15, com exceção do primeiro dia, de 83% a 100% dos animais terminavam o teste antes de 10 minutos.

Tabela 3. Porcentagem de animais que completaram o teste comportamental no labirinto radial de oito braços em cada um dos 7 dias de experimento. O total de animais expostos por dia, em cada grupo, era 6 (n = 6 por grupo).

Grupo	Dias de teste						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle	33%	100%	100%	83%	100%	100%	100%
G15	0%	83%	100%	83%	83%	100%	100%
G30	33%	50%	67%	100%	100%	100%	100%

O tempo médio que cada grupo permaneceu no labirinto foi quantificado em todos os sete dias e foi observada diminuição deste tempo para todos os grupos (G15, G30 e Controle) no decorrer dos dias, indicando maior rapidez na execução da tarefa, ou seja, na consumação dos quatro pedaços de alimento. Embora o menor tempo tenha sido observado para os sujeitos do Grupo Controle em todos os dias, a comparação das medidas entre os três grupos não apresentou diferença significativa (Figura 17).

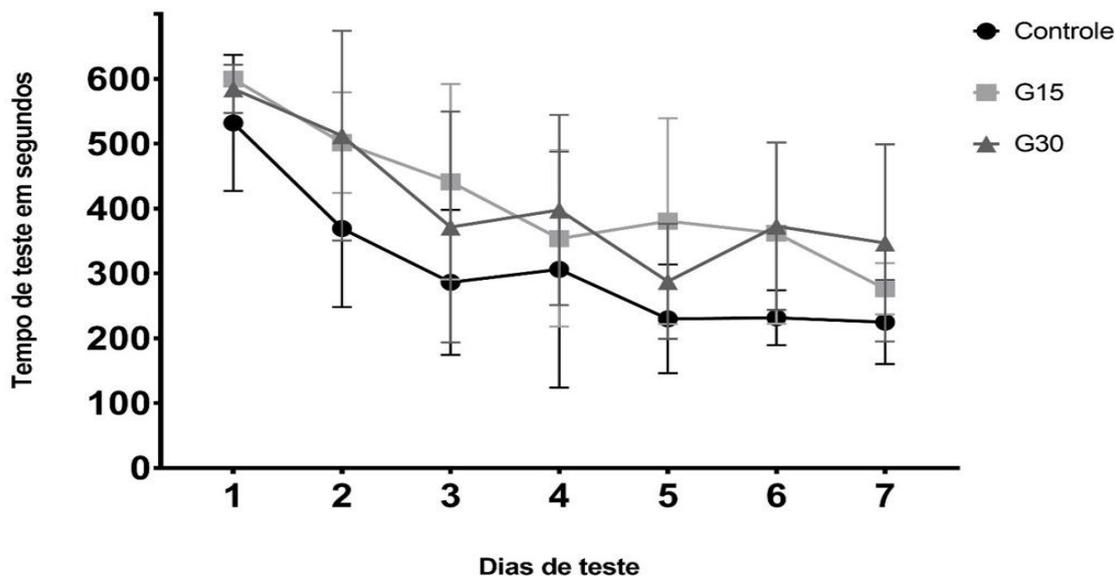


Figura 17. Tempo médio de exploração do labirinto radial de oito braços por grupo em cada dia de experimento. (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05$).

Para avaliar se a diminuição de tempo intra-grupo era significativa, comparamos o tempo de exposição ao labirinto no primeiro dia com o tempo nos demais dias. No Grupo Controle, houve uma diferença significativa entre o tempo no dia 1 e o tempo nos dias 5, 6 e 7 (Figura 18A); no Grupo G15, houve uma diferença entre o tempo no dia 1 e nos dias 4, 6 e 7 (Figura 18B); e no grupo G30, houve uma diferença entre o dia 1 e os dias 5 e 7 (Figura 18C). Desta forma, no geral, foi observado diferença significativa na diminuição do tempo para realizar a tarefa entre o dia 1 e o dia 7 em todos os grupos, controle e ambos os cirúrgicos.

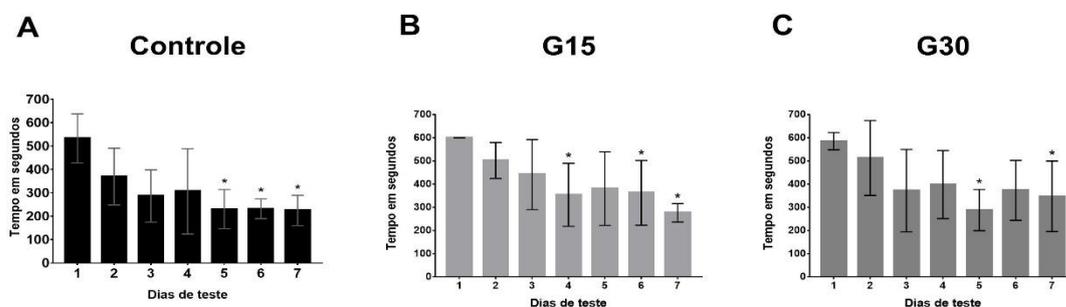


Figura 18. Tempos de realização do teste nos dias de experimento. A: Grupo controle. B: Grupo G15. C: Grupo G30. (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05$).

Com relação às medidas de memória, a análise dos erros de memória de trabalho (EMT) e dos erros de memória de referência (EMR) dos animais no labirinto foi realizada através da comparação entre o grupo controle e os demais grupos no sexto e sétimo dia de experimento. A comparação dos EMT e EMR entre os grupos não demonstrou diferenças significativas em ambos os dias analisados (Figuras 19 e 20) Esses resultados reforçam a ideia de que a aprendizagem no labirinto radial de oito braços não foi permanentemente afetada pela cirurgia.

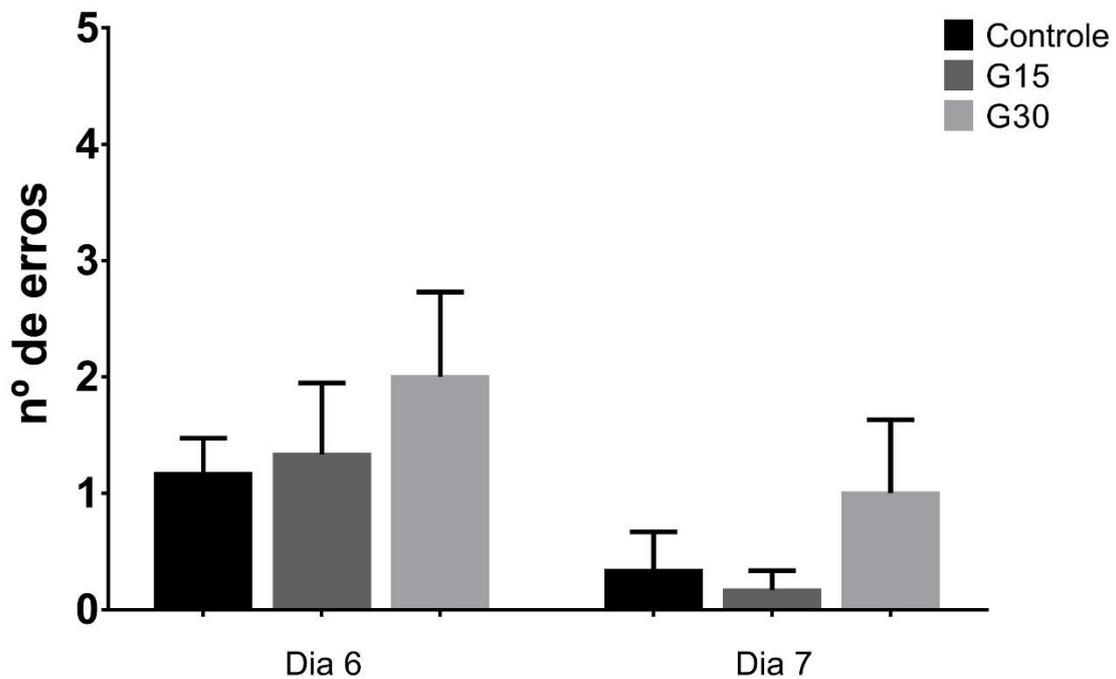


Figura 19. Quantificação de erros de memória de trabalho (EMT) no sexto e sétimo dia de teste. A medida de memória de trabalho foi a quantidade de entradas nos braços em que ele já havia consumido o alimento; cada uma dessas reentradas era contabilizada como um EMT (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05$).

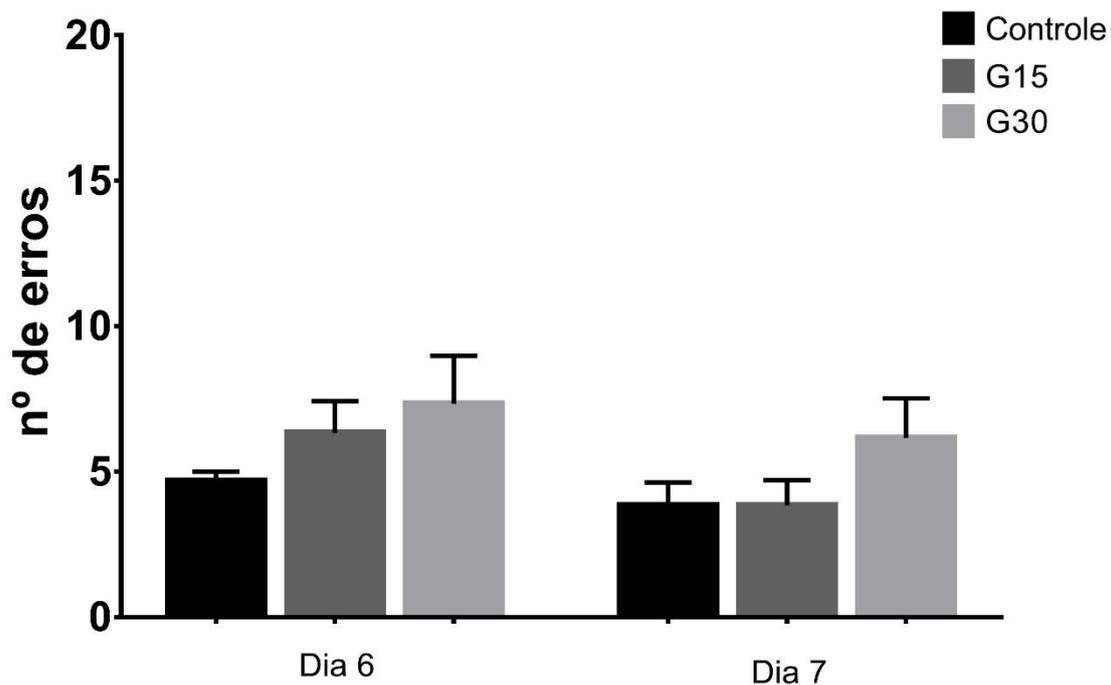


Figura 20. Quantificação de erros de memória de referência no sexto e sétimo dia de teste. A medida de memória de referência (memória de longo prazo) foi avaliada pela quantidade de entradas nos braços em que nunca havia alimento; cada uma dessas entradas era contabilizada como um EMR. (Kruskal Wallis com pós teste de dunn. Barra de erro \pm desvio padrão. Foi considerado significativo $p < 0,05$).

Discussão

Aspectos da morfologia hipocampal evidenciados pela coloração de Nissl

A cirurgia de hipocampectomia unilateral realizada em pacientes humanos portadores de ELT refratária promove a remoção unilateral do hipocampo afetado pela patologia assim como da área cortical adjacente. (Boling, 2018; Jobst & Cascino 2015). Essa cirurgia é uma alternativa de tratamento para aqueles pacientes que não obtêm controle das crises com o tratamento medicamentoso e é relatada como eficaz nos controles das crises epiléticas recorrentes (Liao et al., 2018; Malmgren & Thom 2012).

Nesse estudo foi desenvolvido um modelo de cirurgia em ratos Wistar que mimetiza a cirurgia de hipocampectomia unilateral realizada em humanos (ver métodos página 31). Conforme visualizado na figura 10 nossos resultados demonstram que o modelo cirurgico desenvolvido promoveu a remoção completa do hipocampo esquerdo e preservação do hipocampo direito dos animais cirúrgicos (Figura 10B) indicando a viabilidade dessa metodologia cirúrgica para a remoção unilateral do hipocampo.

Aspectos gerais da marcação imunohistoquímica

Atualmente o estudo da neurogênese no encéfalo de adultos identificou duas áreas neurgênicas até o momento, uma delas se encontra na zona subgranular do giro denteado, porém muitos aspectos neurais relacionados a neurogênese ainda não foram completamente esclarecidos (Amrein 2015; Colucci-D'amato et al., 2006; Gage, 2002) Uma das metodologias utilizada nos estudos de neurogênese é a marcação por imunohistoquímica, a qual viabiliza a análise de proliferação celular utilizando a ligação específica de anticorpos a proteínas expressas durante os estágios do processo proliferativo (Danilov et al., 2009; Liu et al 2018; Radick et al 2017; Thored et al, 2006; Toni & Schinder, 2016).

Os padrões de imunomarcacão para DCX e NeuN obtidos nesse trabalho foram semelhantes aos encontrados na literatura descritos por Lee, (2018) e Radic, (2017). Foi possível evidenciar com nitidez não somente a anatomia geral do hipocampo e dos perfis celulares de neuroblastos migratórios e neurônios maduros, mas também a visualização da anatomia específica das camadas hipocâmpais evidenciando a integridade dos hipocâmpos utilizados e nos dando a certeza de que a metodologia foi bem empregada.

Imunomarcacão de neuroblastos migratórios

Neste estudo o grupo controle (Figura 11A e 11D) apresentou um padrão de imunoreatividade geral mais discreto nas áreas analisadas (Hilo e Giro denteado) quando comparado aos outros dois grupos (G15 e G30) que demonstraram maior expressão de DCX no giro denteado e hilo (Figuras 11B, 11C, 11E e 11F). Estas diferenças foram confirmadas pela contagem de células DCX+ (figuras 12 e 13) que apresentou diferenças estatísticas significativas entre os grupos cirúrgicos e controle (Hilo: ANOVA um critério com pós teste de Tukey, $p < 0,0001$; Giro denteado: Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, $p < 0,0001$), isto pode indicar a existência uma possível neurogênese compensatória no hipocampo contralateral dos ratos dos grupos cirúrgicos.

Observou-se também diferenças entre os grupos G15 e G30 na área do Hilo. Foi observado que nesta região o grupo G15 apresenta um número de células imunoreativas significativamente maior do que o grupo G30 [Figuras 13] (ANOVA um critério com pós teste de Tukey, $p < 0,0001$). Talvez essas diferenças sejam resultado da maturação e migração desses neuroblastos. Como o grupo G30 apresenta um tempo de 30 dias após o procedimento cirúrgico é possível que essas células possam ter passado pelo processo de maturação tornando-se neurônios maduros e diminuindo assim a expressão de DCX. A marcação observada no giro denteado (figura 11B, 11C, 11E e 11F), por outro lado, não

apresenta diferenças significativas entre os grupos G15 e G30 isso indica o mesmo padrão de produção de neuroblastos entre estes dois grupos nessa área.

O DCX (Doublecortin) é uma proteína associada a microtúbulos expressa por neurônios imaturos durante sua inserção na circuitaria neuronal. A marcação imunohistoquímica de células anti-DCX+ tem sido recorrente na literatura, mostrando-se eficaz na identificação de neuroblastos migratórios (Fasemore et al., 2018; Liu et al., 2018; Radick et al., 2017; Toni & Schinder, 2016) Neste trabalho identificou-se a marcação de neuroblastos DCX+ nos hipocampos dos ratos dos três grupos utilizados (Controle G15 e G30), e foi observado diferenças de imunoreatividade entre os grupos (figura 11). As células marcadas apresentam morfologia de neuroblastos migratórios e a marcação é semelhante a evidenciada por trabalhos como o de Fasemore (2018) indicando que nossa metodologia foi bem aplicada e que nossos resultados são relevantes.

Imunomarcção de Neurônios maduros

O anticorpo anti-NeuN marca proteínas específica do núcleo celular de neurônios maduros sendo utilizado na literatura para marcação desses tipos celulares (Danilov et al., 2009; Liu et al., 2018). Sua marcação viabilizou atestar a integridade do hipocampo (Figura 14) e a distribuição neuronal de suas camadas sendo importante para nos auxiliar a localizar as áreas de CA1, CA3 Hilo e Giro denteado.

As áreas do giro denteado (figuras 15G-I e 16G-I) e CA1 (figura 15A-C e 16A-C) apresentaram boa marcação e imunoreatividade em todos os grupos, as camadas de células granulares apresentam morfologia específica de suas regiões estando de acordo com o relatado na literatura (Andersen et al., 2007) com formação linear e compacta sem grandes alterações de densidade e dispersão celular entre os grupos.

No hilo nós observou-se uma diminuição gradual das células marcadas caracterizada pelo grupo controle com maior número de células NeuN+, Grupo G15 com diminuição da densidade celular quando comparado ao controle e grupo G30 com menor densidade de células marcadas e diminuição da espessura da camada de células. Esses resultados podem ser consequência do aumento de neuroblastos nessa região visualizado na imunomarcação para DCX. Os neuroblastos migratórios podem estar causando uma reorganização no hilo com consequente diminuição do número de neurônios maduros nos grupos G15e G30 (Figura 15J-L e 16 J-L).

Um resultado curioso observado em CA3, foi que o grupo G15 aparentou possuir uma densidade de neurônios maduros maior do que o grupo controle e o grupo G30 e somente uma análise da densidade celular posterior poderá nos revelar a magnitude desse aumento e sua real significância. (Figura 15D-F e 16D-F).

Existência de neurogênese compensatória em modelos animais

Nesta pesquisa observou-se uma diferença no padrão de distribuição de neuroblastos migratórios nos hipocampos dos grupos cirúrgicos, quando comparados com o grupo controle. Embora ainda não seja possível afirmar que existe aumento de neurogênese no hipocampo contralateral à cirurgia, nossos resultados sugerem a ocorrência de uma possível modulação neural. Somente com experimentos futuros de dupla marcação das células proliferativas e/ ou apoptóticas aliadas a marcação de neuroblastos e /ou glias, assim como associações a métodos de diagnóstico por imagem (tais como ressonância magnética funcional), será possível sugerir um possível mecanismo compensatório do hipocampo que poderia justificar uma adicional neurogênese nos animais submetidos a hipcampectomia unilateral e nos processos subjacentes ao processo de epileptogênese.

Aspectos comportamentais observados em modelos animais submetidos a hipocampectomia unilateral

A utilização do labirinto radial de 8 (LR8B) braços nesse estudo foi adotada levando em consideração a adequação do equipamento ao delineamento experimental e ao objetivo de avaliação comportamental. O aparato se ajustava ao tempo de sobrevivência dos grupos de sujeitos e é usualmente aplicado em estudos que avaliam padrões comportamentais referentes ao aprendizado e à memória de ratos *Wistar* relacionadas à lesão no hipocampo (Chan et al ., 2006, Iscu et al ., 2013; Rathod, 2015; Rathod, 2014; Duncan, 2016; Wu et al. 2001; Scorza et al., 2009).

O LR8B permitiu a avaliação de aprendizagem extra e intra grupo por meio das medidas de tempo médio de permanência no labirinto (Figura 17 e Figura 18) e da porcentagem de animais que completaram o teste no decorrer dos dias (Tabela 3).

No presente estudo, foram utilizados sete dias de exposição ao labirinto para avaliar aprendizagem e memória. O número de dias de exposição ao LR8B apresentou certa variação nos trabalhos presentes na literatura, Chan et al. (2004) utilizaram 12 dias de exposição ao labirinto, enquanto Kemse (2018) e Rathod (2014-2015) demonstraram mudança nos padrões comportamentais de grupos avaliados com cinco dias de exposição ao LR8B. Os sete dias de exposição do presente estudo parece ter sido uma escolha adequada na medida em que se adaptava ao tempo mínimo de sobrevivência dos grupos (15 dias), assim como parece ter permitido a recuperação física dos animais após o procedimento cirúrgico para que a avaliação de comportamento pudesse ocorrer.

A Tabela 3 demonstra a porcentagem de animais por grupo que completou o teste ao longo dos sete dias de exposição. Observa-se que do dia 1 ao dia 5 essa porcentagem sofre variação em pelo menos um dos três grupos utilizados, enquanto que nos dias 6 e 7

a porcentagem para todos os grupos é de 100%, ou seja, nos dias 6 e 7 todos os três grupos (G15, G30 e Controle) completaram o teste em menos de 10 minutos.

A análise entre os grupos está demonstrada na Figura 17, na qual se apresenta a curva temporal que cada grupo obteve durante a exposição ao labirinto. Notou-se visível a diminuição do tempo de exploração em todos os grupos ao longo dos dias de exploração. Ao testar o grau de significância dessas diferenças em cada dia a partir da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, observou-se que não houveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos cirúrgicos e o grupo controle (Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn: dia 1 $p = 0,5588$; dia 2 $p = 0,0711$; dia 3 $p = 0,4411$; dia 4 $p = 0,4167$; dia 5 $p = 0,1528$; dia 6 $p = 0,0549$; dia 7 $p = 0,1394$)

Podemos observar na Figura 18 a comparação intragrupo do tempo de permanência no LR8B entre o dia um e os demais dias de exposição. Notou-se que em todos os três grupos o tempo necessário para o animal finalizar a tarefa foi visivelmente maior no primeiro dia do que nos demais dias. Ao testar o grau de significância dessas diferenças, ainda utilizando o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, observou-se que todos os três grupos possuíam diferença significativa entre o primeiro e o sétimo dia de experimento (Grupo controle Kruskal-Wallis statistic = 17,13 valor de $p = 0,0088$; Grupo G15 Kruskal-Wallis statistic = 19,59 valor de $p = 0,0033$; Grupo G30 Kruskal-Wallis statistic = 14,45 valor de $p = 0,0250$).

Esses resultados parecem sugerir a ocorrência de um processo de aprendizagem tanto no grupo controle quanto nos grupos cirúrgicos, sendo que esse processo é aparentemente semelhante em todos os três grupos (G15, G30 e Controle).

Ainda na Figura 18, foi observado que no grupo controle o tempo de exploração nos dias 5, 6 e 7 se mantém relativamente constante nesses dias (Figura 18A). Ao analisar

os grupos cirúrgicos, observou-se que existe maior variação no tempo de exploração dos últimos dias (Figura 18B e 18C). No grupo G15, a diferença foi observada nos dias 4, 6 e 7 e no grupo G30, nos dias 5 e 7. Uma possível explicação para esses resultados é de que possivelmente os grupos cirúrgicos necessitem de mais dias para que essa variação diminua e se torne constante e semelhante ao observado no grupo controle. Esta hipótese poderia ser investigada mais detalhadamente em uma análise com um grupo que possua um tempo de sobrevivência superior a 30 dias.

O aprendizado e a memória são funções cognitivas fundamentais aos organismos e prejuízos a essas funções podem afetar significativamente a qualidade de vida (Hall & Guyton, 2011). A memória de referência (memória de longo prazo) é um tipo de memória que tem maior duração, e sua consolidação é realizada pela formação hipocampal, podendo ser afetada por eventuais danos a essa estrutura. Essa consolidação é induzida pela repetição da informação, ou seja, quanto mais uma informação é repetida, maiores as chances dela ser consolidada. A memória de trabalho (memória de curto prazo) permite o armazenamento temporário de informações, sendo utilizada durante a execução de determinadas tarefas sendo geralmente eliminada ao final da tarefa executada (Bear, et al., 2007; Kandel et al, 1995).

A amnésia anterógrada (incapacidade de se consolidar novas memórias) é descrita em indivíduos que apresentam danos bilaterais na área do lobo temporal (Squire, 2009; Squire & Wixted, 2011). No entanto, a cirurgia de hipocampectomia unilateral é relatada como segura e geralmente não correlacionada a danos cognitivos relacionados ao processamento e evocação de memória aos pacientes. Isso provavelmente se deve ao fato deste procedimento cirúrgico consistir na retirada de apenas um dos hipocampos do indivíduo. Todavia, essa ausência de prejuízo cognitivo é, no mínimo, curiosa levando em conta que o hipocampo é um grande centro de integração e consolidação de memórias.

Muito provavelmente, o hipocampo contralateral remanescente continua realizando sua atividade, compensando a ausência do hipocampo contralateral (Mathon et al., 2015; Wiebe et al., 2001).

Nós avaliamos os efeitos da cirurgia de hipocampectomia unilateral sobre a memória e aprendizagem nos ratos dos grupos Controle, G15 e G30, utilizando um teste específico para avaliar memória de referência (memória de longo prazo) e memória de trabalho (memória de curto prazo) executado no labirinto radial de 8 braços (ver método). Esta análise foi feita nos dias 6 e 7 de teste comportamental nos grupos Controle G15 e G30. Esses dias foram selecionados, pois foram os dias em que 100% dos animais dos três grupos completaram o teste (ver Tabela 3).

Durante a execução da tarefa (consumir todo o alimento presente no labirinto), era esperado que, ao consumir o alimento de um braço, o animal não retornasse ao mesmo braço, pois a informação de que o alimento daquele braço já havia sido consumido ainda estaria em processamento (este processamento é característico de memória de trabalho). A reentrada nos braços em que o alimento foi consumido foi então classificada como erro de memória de trabalho (EMT), e a contabilização desses erros foi utilizada para análise de déficits no processamento desse tipo de memória (Iscru et al., 2013, Scorza et al., 2009; Wu et al., 2001). A contabilização dos EMT que os grupos Controle, G15 e G30 cometeram e a subsequente comparação entre os grupos não demonstrou diferenças estatísticas significativas (Figura 19). Esses resultados indicam que mesmo após o procedimento de hipocampectomia unilateral os grupos G15 e G30 não apresentaram déficits no processamento de memória de trabalho.

Quanto à avaliação de memória de referência (memória de longo prazo), foram contabilizadas as entradas que os ratos fizeram em braços nos quais nunca havia sido disponibilizado alimento. Nesta análise, era esperado que a repetição da tarefa durante os

dias de exposição ao labirinto consolidasse a informação de que naqueles braços o alimento não era disponibilizado, diminuindo, no decorrer dos dias, a resposta de entrada aos mesmos. A entrada nos braços que nunca continham alimento foi contabilizada como erro de memória de referência (EMR) e a contabilização desses erros (assim como dos EMT) foi utilizada na análise de déficits no processamento de memória de referência (Iscru et al., 2013, Scorza et al., 2009; Wu et al., 2001). A comparação dos EMR entre os grupos Controle, G15 e G30 também não apresentou diferenças estatísticas, indicando que a hipocampectomia unilateral também não acarretou prejuízos no processamento de memória de referência (Figura 20).

É importante ressaltar que durante a exposição ao labirinto a visibilidade para as pistas visuais espalhadas pela sala tinham como finalidade permitir que o animal se localizasse espacialmente no labirinto e dessa forma identificassem quais eram os braços que possuíam ou não alimento. A limpeza realizada no aparato com álcool 70% e água destilada antes e após o procedimento também foi importante para minimizar possíveis variáveis externas relacionadas ao olfato dos animais que pudessem interferir na análise comportamental.

Nossos resultados comportamentais indicam que houve aquisição de repertório comportamental nos animais dos grupos G15, G30 e Controle e o uso de sete dias de exposição foi suficiente para se observar aprendizagem no labirinto em todos os grupos, indicando que a aprendizagem no labirinto radial de oito braços não foi afetada pela hipocampectomia unilateral. Esses resultados assemelham-se aos relatos da literatura de que a cirurgia de hipocampectomia unilateral é segura, apresenta baixa morbimortalidade e geralmente não acarreta danos cognitivos (Jobst & Cascino 2015; Mathon et al., 2015; Wiebe et al., 2001), indicando-o como um modelo viável e eficaz para a avaliação

comportamental e para análises de possíveis processos neurais compensatórios induzidos pela cirurgia.

Referências

- Altman, J., (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127–1128
- Amrein, I., (2015) Adult hippocampal neurogenesis in natural populations of mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7. a021295. doi: 10.1101/cshperspect.a021295.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss & T., O'keefe J. (2007) *The hippocampus book*. New York, EUA: oxford university press.
- Anyanwu, C. & Motamedi, G. K. (2018). Diagnosis and Surgical Treatment of Drug-Resistant Epilepsy. *Brain sciences*, 8. 49. doi:10.3390/brainsci8040049
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience: Exploring the brain*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Boling W. W. (2018). Surgical Considerations of Intractable Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Brain sciences*, 8(2), 35. doi:10.3390/brainsci8020035
- Celiker, U. S., Yuksel, B., Tekin, B., Sariahmetoglu, H. &, Atakli, D. (2018) Cognitive impairment and drug responsiveness in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 90. 162-167. doi:10.1016/j.yebeh.2018.10.034.
- Chan, K. F., Jia, Z., Murphy, P. A., Burnham, W. M., Cortez, M. A., & Snead, O. C. (2004) Learning and memory impairment in rats with chronic atypical absence seizures. *Experimental Neurology* 190. 328-336. doi:10.1016/j.expneurol.2004.08.001
- Colucci-D'Amato, L., Bonavita, V., & di Porzio, U. (2006) The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurological Sciences*. 27. 266-70. doi:10.1007/s10072-006-0682-z

- Danilov, A. I., Gomes-Leal, W., Ahlenius, H., Kokaia, Z., Carlemalm, E., & Lindvall, O. (2009) Ultrastructural and antigenic properties of neural stem cells and their progeny in adult rat subventricular zone. *Glia*. 57. 136-152. doi:10.1002/glia.20741.
- Duncan, T., Lowe, A., Dalton, M. A., & Valenzuela, M. (2016). Isolation and Expansion of Adult Canine Hippocampal Neural Precursors. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 117. 549-453. doi:10.3791/54953
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4. 1313–1317. doi:10.1038/3305
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., Frisén, J., (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 156. 1072-1083. doi:10.1016/j.cell.2014.01.044
- Faggion, C. M. Jr. (2015) *European Journal of Oral Sciences*. 123. 61-64. doi:10.1111/eos.12175
- Fasemore, T. M., Patzke, N., Kaswera-Kyamakya, C., Gilissen, E., Manger, P. R., & Ihunwo, A. O. (2018) The Distribution of Ki-67 and Doublecortin-Immunopositive Cells in the Brains of Three Strepsirrhine Primates: Galago demidoff, Perodicticus potto, and Lemur catta. *Neuroscience*. 372. 46-57. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.12.037
- Fernandes, M. J. S., (2013). Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estudos Avançados*. 27 85-98. doi:10.1590/S0103-40142013000100007
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J. Jr., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy.

- Epilepsia*. 55. 475-482. doi:10.1111/epi.12550
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet, P. E., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017) Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 58. 522-530. doi:10.1111/epi.13670
- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 46. 470-472. doi: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x
- Gage, F. H. (2002) Neurogenesis in the adult brain. (2002) *Journal of Neuroscience*. 22. 612-613.
- Geil, C. R., Hayes, D. M., McClain, J. A., Liput, D. J., Marshall, S. A., Chen, K. Y., & Nixon, K. (2014). Alcohol and adult hippocampal neurogenesis: promiscuous drug, wanton effects. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 54, 103-13.
- Giap, B. T., Jong, C. N., Ricker, J. H., Cullen, N. K., & Zafonte, R. D. (2000) The hippocampus: anatomy, pathophysiology, and regenerative capacity. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*. 15. 875-894
- Gil-Mohapel, J., Simpson, J. M., Ghilan, M., & Christie, B. R. (2011) Neurogenesis in huntington's disease: can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies? *Brain Research*. 1406. 84-105. doi:10.1016/j.brainres.2011.06.040
- Gomes-Leal, W., Corkill, D. J., Freire, M. A., Picanço-Diniz, C. W., & Perry, V. H. (2004) Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and

- pyknosis following acute spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 190. 456-467.
doi:10.1016/j.expneurol.2004.06.028
- Gomes-Leal, W., (2009) Neurogênese no cérebro adulto: a morte de um dogma e o sonho de Cajal. *Neurociências*. 5. 16-19.
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H., (2016) Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*. 167, 897-914.
doi:10.1016/j.cell.2016.10.021
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
- Hung, Y. W., Yang, D. I., Huang, P. Y., Lee, T. S., Kuo, T. B., Yiu, C. H., Shih, Y. H., & Lin, Y. Y. (2012) The duration of sustained convulsive seizures determines the pattern of hippocampal neurogenesis and the development of spontaneous epilepsy in rats. *Epilepsy Research*. 98. 206-215. doi:10.1016/j.eplesyres.2011.09.015
- Iscru, E., Goddyn, H., Ahmed, T., Callaerts-Vegh, Z., D'Hooge, R., & Balschun, D. (2013) Improved spatial learning is associated with increased hippocampal but not prefrontal long-term potentiation in mGluR4 knockout mice. *Genes Brain Behavior*. 12. 615-625. doi:10.1111/gbb.12052
- Jin, K., Wang, X., Xie, L., Mao, X. O., Zhu, W., Wang, Y., Shen, J., Mao, Y., Banwait, S., Greenberg, D. A. (2006). Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103. 13198-202.
- Jobst, B. C., & Cascino, G. D. (2015) Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: a review. *JAMA*. 313. 285-293. doi:10.1001/jama.2014.17426
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (1995). *Essentials of neural science and behavior*. Norwalk, CT: Appleton & Lange.

- Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197. 1092–1094
- Karnam, H. B., Zhao, Q., Shatskikh, T., & Holmes, G. L. (2009). Effect of Age on Cognitive Sequelae Following Early Life Seizures in Rats. *Epilepsy Research*, 85. 221–230.
- Kemse, N., Kale, A., Chavan-Gautam, P., & Joshi, S. (2018) Increased intake of vitamin B12, folate, and omega-3 fatty acids to improve cognitive performance in offspring born to rats with induced hypertension during pregnancy. *Food Function*. 9. 3872-3883. doi:10.1039/c8fo00467f
- Kreutzmann, J. C., Havekes, R., Abel, T., Meerlo, P. (2015) Sleep deprivation and hippocampal vulnerability: changes in neuronal plasticity, neurogenesis and cognitive function. *Neuroscience*. 309. 173-190. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.053.
- Lazarov, O., & Marr, R. A. (2010). Neurogenesis and Alzheimer's disease: At the crossroads. *Experimental Neurology*, 223, 267–281. doi:10.1016/j.expneurol.2009.08.009
- Lee, S. H., Choi, B. Y., Kho, A. R., Jeong, J. H., Hong, D. K., Kang, D. H., Kang, B. S., Song, H. K., Choi, H. C., & Suh, S. W. (2018). Inhibition of NADPH Oxidase Activation by Apocynin Rescues Seizure-Induced Reduction of Adult Hippocampal Neurogenesis. *International journal of molecular sciences*, 19. 3087. doi:10.3390/ijms19103087
- Liao, C., Wang, K., Cao, X., Li, Y., Wu, D., Ye, H., Ding, Q., He, H., & Zhong, J. (2018) Detection of Lesions in Mesial Temporal Lobe Epilepsy by Using MR Fingerprinting. *Radiology*. 288. 804-812. doi:10.1148/radiol.2018172131
- Liu, J., Matarin, M., Reeves, C., McEvoy, A. W., Miserocchi, A., Thompson, P., Sisodiya, S. M., & Thom, M. (2018). Doublecortin-expressing cell types in temporal

- lobe epilepsy. *Acta neuropathologica communications*, 6. 60. doi:10.1186/s40478-018-0566-5
- Malmgren, K., & Thom, M. (2012) Hippocampal sclerosis--origins and imaging. *Epilepsia*. 53. 19-33. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03610.x
- Martin, J.H. *Neuroanatomia: texto e atlas. 4. ed.* Porto Alegre: AMGH, 2013.
- Mathon, B., Bédos, U. L., Adam, C., Baulac, M., Dupont, S., Navarro, V., Cornu, P., & Clemenceau, S. (2015) Surgical treatment for mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Revue neurologique* 171. 315-325. doi:10.1016/j.neurol.2015.01.561
- Moreira, S. R. G., (2004). Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. *Mental*, 2. 107-122.
- Mullen, R. J., Buck C. R., & Smith A. M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116. 201-211.
- Nakahara, S., Adachi, M., Ito, H., Matsumoto, M., Tajinda, K., & van Erp, T. (2018). Hippocampal Pathophysiology: Commonality Shared by Temporal Lobe Epilepsy and Psychiatric Disorders. *Neuroscience journal*. 4852359. doi:10.1155/2018/4852359
- Nokia, M. S., Lensu, S., Ahtiainen, J. P., Johansson, P. P., Koch, L. G., Britton, S. L., & Kainulainen, H. (2016). Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. *The Journal of physiology*, 594(7), 1855-73.
- Nottebohm, F. (2000) Why are some neurons replaced in adult brain? *J Neuroscience* 22, 624–628
- Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*, 146. doi:10.1242/dev.156059

- Paine, S. M. L., Willsher, A. R., Nicholson, S. L., Sebire, N. J., & Jacques, T. S. (2014). Characterization of a population of neural progenitor cells in the infant hippocampus. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40. 544–550. <http://doi.org/10.1111/nan.12065>
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Fourth Edition). Press, San Diego, CA.
- Radic, T., Frieß, L., Vijikumar, A., Jungenitz, T., Deller, T., & Schwarzacher, S. W. (2017). Differential Postnatal Expression of Neuronal Maturation Markers in the Dentate Gyrus of Mice and Rats. *Frontiers in neuroanatomy*, 11. 104. doi:10.3389/fnana.2017.00104
- Ramón-y-Cajal. C. S., & May, R. M. (1928). *Degeneration & regeneration of the nervous system*. London: Oxford University Press, Humphrey Milford.
- Rathod, R., Khaire, A., Kemse, N., Kale, A., & Joshi, S. (2014) Maternal omega-3 fatty acid supplementation on vitamin B12 rich diet improves brain omega-3 fatty acids, neurotrophins and cognition in the Wistar rat offspring. *Brain and Development*. 36. 853-863. doi:10.1016/j.braindev.2013.12.007
- Rathod, R. S., Khaire, A. A., Kale, A. A., & Joshi S. R., (2015) Beneficial effects of omega-3 fatty acids and vitamin B12 supplementation on brain docosahexaenoic acid, brain derived neurotrophic factor, and cognitive performance in the second-generation Wistar rats. *Biofactors*. 41. 261-272. doi:10.1002/biof.1222
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto. L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H., & Zuberi, S. M. (2017) ILAE classification of the

- epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 58. 512-521. doi:10.1111/epi.13709
- Schlett, K. (2006) Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 6. 949-60.
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014) Anatomy of the hippocampal formation. *Frontiers of neurology and neuroscience*. 34, 6-17. doi:10.1159/000360925
- Scorza, F. A., Arida, R. M., Naffah-Mazzacoratti, Graça, M., Scerni, D. A., Calderazzo, L., & Cavalheiro, E. A. (2009). The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81. 345-365.
- Sério, Andery, Gioia, & Micheletto (2010). *Controle de estímulos e comportamento operante: Uma (nova) introdução 3a ed*
- Silverthorn, D. U. (2007). *Human physiology: An integrated approach*. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings.
- Skinner, B. F. (1953). *Science and human behavior*. New York: McMillan
- Soman, S., Korah, P.K., Jayanarayanan, S., Mathew, J., & Paulose, C. S. (2012) Oxidative stress induced NMDA receptor alteration leads to spatial memory deficits in temporal lobe epilepsy: ameliorative effects of *Withania somnifera* and Withanolide A. *Neurochemical Research*. 37. 1915-27. doi:10.1007/s11064-012-0810-5
- Spruston, N. (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*. 9. 206-221. doi:10.1038/nrn2286.
- Squire, L. R. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*, 61. 6–9.
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, J. (1991). The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annual Review of Neuroscience*. 34. 259–288.
- Tavares, P. A. N., & Gomes-Leal, W. (2011) Neurogênese no sistema nervoso central adulto: função e participação na manutenção e reparo dos circuitos neurais

- Thom, M., Zhou, J., Martinian, L., & Sisodiya S. (2006) Quantitative post-mortem study of the hippocampus in chronic epilepsy: seizures do not inevitably cause neuronal loss. *Brain* 128. 1344-1357.
- Thored, P., Arvidsson, A., Cacci, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2006) Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*. 24. 739-47. doi:10.1634/stemcells.2005-0281
- Toni, N., & Schinder, A. F. (2016). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8. a018903. doi:10.1101/cshperspect.a018903
- Vojtěch, Z., Krámská, L., Malíková, H., Seltenreichová, K., Procházka, T., Kalina, M., & Liščák, R. (2012) Cognitive outcome after stereotactic amygdalohippocampectomy. *Seizure*. 21. 327-333.
- Ward, M. T., Oler, J. A., & Markus E. J. (1999) Hippocampal dysfunction during aging I: deficits in memory consolidation. *Neurobiology of Aging*. 20. 363-372.
- Wiebe, S., Blume, W.T., Girvin, J. P., & Eliasziw, M. (2001) A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *The New England Journal of Medicine*. 345. 311-318. doi:10.1056/NEJM200108023450501
- World Health Organization. (2006). *Neurological disorders: Public health challenges*. Geneva: World Health Organization.
- Wu, C. L., Huang, L. T., Liou, C. W., Wang, T. J., Tung, Y. R., Hsu, H. Y., & Lai, M. C. (2001) Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats result in long-term deficits in spatial learning and hippocampal cell loss. *Neuroscience Letters*. 312. 113-117.

Zhong, Q., Ren, B. X., & Tang, F. R. (2016) Neurogenesis in the Hippocampus of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 16. 20. doi:10.1016/j.expneurol.2009.08.009

Zou, L. B., Yamada, K., Sasa, M., & Nabeshima, T. (1999) Two phases of behavioral plasticity in rats following unilateral excitotoxic lesion of the hippocampus *Neuroscience*. 92. 819-826.

ANEXOS

Anexo A

Instrumentos

Aparelho estereotáxico

O estereotáxico é um aparato que permite a localização de estruturas cerebrais através da utilização de um sistema tridimensional de coordenadas geométricas alinhadas aos planos de corte sagital, coronal e axial. O aparato consiste em uma plataforma com uma estrutura de fixação da cabeça do animal, e uma torre articulada que permite a inserção de coordenadas geométricas já padronizadas em atlas estereotáxico. O aparato está ilustrado na Figura 7.

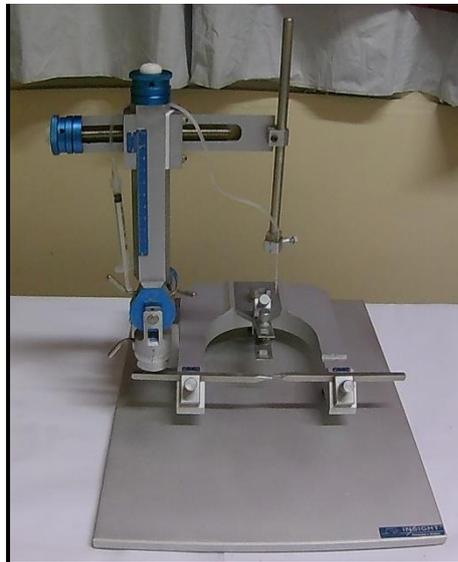


Figura 7. Aparelho estereotáxico Insight modelo EFF 331. Gentilmente cedido para nossos experimentos pelo Laboratório de Biofísica celular.

Material cirúrgico.

A série de instrumental cirúrgico consistiu em microdissectores, pinças kelly, pinças halsted, pinças dente de rato, pinças de relojoeiro, pinças anatômicas, porta agulha, cabo de bisturi nº3, lâmina de bisturi nº10, fio de sutura nº4, tesouras metzenbaum, tesouras romba/fina e broca odontológica nº1.

Lupa Binocular Estereoscópica

As cirurgias foram realizadas com o auxílio de uma lupa cirúrgica, OME 5000 (Marca Olympus) que possibilitou melhor visão das estruturas anatômicas dos encéfalos dos animais durante o procedimento. A visualização das estruturas cerebrais pode ser identificada com aumento de até 2x vezes.

Labirinto Radial de 8 Braços

O Labirinto Radial de 8 Braços (LR8B) consiste em uma plataforma em acrílico, octogonal com diâmetro de 34 cm, da qual se irradiam 8 braços com 47,5 cm de extensão e 13 cm de largura (ver Figura 8). A plataforma e os braços estão posicionados a uma altura de 60 cm em relação ao chão.



Figura 8. Labirinto Radial de oito Braços utilizado neste estudo.

Filmagem

O animal era monitorado através de filmagens realizadas por uma câmera modelo Action Câmera H9s acoplada a um tripé e posicionada acima do labirinto.

Criostato

As secções dos tecidos foram realizadas no aparelho criostato Leica modelo

CM1850

Microscópio

Microscópio óptico Zeiss Imager Z1, com câmera Zeiss AxioCam HRc acoplada para documentação fotográfica.