



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA COMPARATIVA DOS VERTEBRADOS

**O PAPEL DO CIRCUITO HIPOCAMPO VENTRAL - CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL MEDIAL NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO E ESPACIAL
(RECENTE E REMOTA) DE RATOS WISTAR**

Ariela Maltarolo Crestani

Araraquara, SP

- 2020 -

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA COMPARATIVA DOS VERTEBRADOS

**O PAPEL DO CIRCUITO HIPOCAMPO VENTRAL - CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL MEDIAL NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO E ESPACIAL
(RECENTE E REMOTA) DE RATOS WISTAR**

ARIELA MALTAROLO CRESTANI

Tese a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Neves Girardi

Araraquara, SP

- 2020 -



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

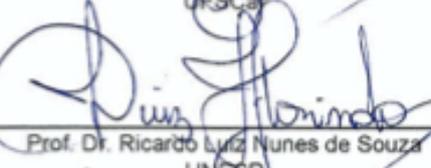
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

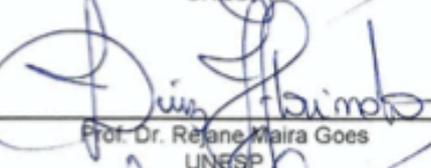
Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ariela Maltarolo Crestani, realizada em 30/03/2020:


Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
UNESP

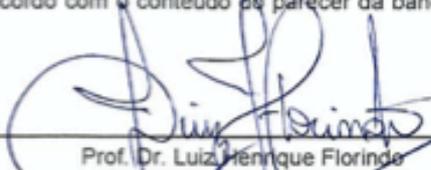

Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro
UFSCar


Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP


Prof. Dr. Rejane Maira Goes
UNESP


Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza
FAMERP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Diana Amaral Monteiro, Ricardo Luiz Nunes de Souza, Rejane Maira Goes, Dorotéia Rossi Silva Souza e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.


Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

Agradeço:

À Deus e a vida pelas pessoas que permitiu que cruzassem meu caminho, pelas oportunidades que me ofereceu, pela força que muitas vezes não sabia de onde surgia.

Ao meu orientador “Flor” que em todos esses bons anos de parceria nunca hesitou ao ouvir alguma de minhas ideias e vontades científicas; por sempre acreditar em meu potencial ainda quando eu mesma duvidava. Por me permitir conhecer a vida acadêmica com liberdade; liberdade para minhas ideias florescerem e minhas curiosidades se alimentarem. Obrigada pelos conselhos (acadêmicos e pessoais), pelos empurrões, eventuais puxões de orelha, pelos cafés no laboratório e pela amizade construída

Ao meu co-orientador Cadu, por todo apoio prestado nesses anos, pela parceria, ajuda, discussões e luzes que você sempre me deu!

Ao meu marido Marcos. Esse trabalho certamente não existiria sem o apoio incondicional que me deu. Você faz parte dele desde a decisão de iniciá-lo, vivenciou todas as expectativas, problemas, conquistas e etapas concluídas desse processo. Obrigada por sempre me lembrar do motivo pelo qual comecei e pela compreensão quando os finais de semana, recessos e feriados eram dedicados aos experimentos.

À minha família, por sempre terem fé de que essa caminhada valeria a pena, pela esperança e por acreditarem que dias melhores virão para ciência brasileira. Por entenderem minhas ausências e os dias dedicados a esse trabalho; essa compreensão de vocês sempre me impulsionou, pois vocês acreditavam e me apoiavam ainda que sem compreender muito da realidade de um doutorado. Obrigada por cada comemoração que dividiram comigo durante essa jornada.

Agradeço imensamente aos meus amigos e companheiros de laboratório, certamente o processo teria sido muito mais árduo sem o apoio de vocês; Vinicius, Mariana, Victor, Gabrielle, Noll, Isadora, Natalia e todos os alunos de iniciação científica; que me ajudaram diretamente no desenvolvimento do trabalho ou “simplesmente” tornando meus dias mais felizes; juntos conseguíamos transformar as

dificuldades (que foram muitas) em risada. Vocês me proporcionavam segurança, e serei eternamente grata por ter aprendido e crescido com pessoas tão especiais como vocês.

Agradeço aos membros da banca pela leitura do trabalho e contribuição. Sou grata ao Programa de Pós Graduação Interinstitucional em Ciências Fisiológicas (PIPGCG) por ter me acolhido durante mestrado e doutorado. Agradeço também ao Instituto de Letras, Biociências e Ciências Exatas (IBILCE) por ter sido minha casa científica durante tantos anos. Agradeço a FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro sem o qual o esse trabalho não existiria.

Por fim, dedico esse trabalho a minha avó, Inez Félix Maltarolo. Mulher que, ainda que sonhasse em estudar e cursar uma graduação, terminou sua jornada tendo estudado até o fundamental I, e feliz. Minha avó certamente foi uma das (se não a) pessoa que mais me incentivou a dedicar-me a carreira acadêmica. Vibrava tanto com cada conquista ao longo da minha formação, que parecia ser uma conquista própria. Talvez fosse mesmo. Infelizmente não tive o prazer de dividir esse momento com ela; uma enfermidade encefálica interrompeu esse momento, o que me faz acreditar ainda mais na ciência e encontrar forças para perseguir a carreira acadêmica.

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.” José Saramago (A Jangada e a Pedra).

RESUMO GERAL

O córtex pré-frontal medial (CPFm) e o hipocampo (HPC) apresentam papéis bem estabelecidos no processamento de memórias. A porção ventral do HPC (HPCv) e córtex pré-frontal medial (CPFm) possuem conexões recíprocas envolvidas com o processo de aquisição de memórias recentes (no HPC) e consolidação em memórias remotas corticais. Descobertas recentes demonstram a existência de lateralização funcional do CPFm para comportamentos que envolvem ansiedade e tomada de decisão. Entretanto, pouco se sabe sobre a possível lateralização do CPFm e HPC como moduladora da memória. Nesse contexto, a presente trabalho buscou avaliar o envolvimento do circuito HPC-CPFm no processamento de paradigmas de memória, bem como verificar a possível lateralização funcional de suas partes. Para tanto, foram realizados experimentos com lesões bilateral, direita ou esquerda do HPCv (experimento I), CPFm (experimento II) e circuito HPC-CPFm (experimento III) em ratos submetidos ao Labirinto Aquático de Morris (LAM), reconhecimento de objetos e labirinto em T, para avaliação da memória recente e remota. Nossos dados revelaram que nenhum dos grupos experimentais apresentou locomoção comprometida, assim como a memória de reconhecimento mostrou-se intacta independente da manipulação experimental. Lesões no HPCv não afetaram o desempenho dos animais nos treinos espaciais no LAM e nem a capacidade de evocar memórias recentes; entretanto animais com lesão bilateral do HPCv tiveram a evocação de memórias remotas prejudicada. Nenhum comprometimento de desempenho foi observado no labirinto em T, independente da lesão no HPCv. Quanto ao experimento II; nenhum prejuízo foi evidenciado para a aquisição do LAM, assim como evocaram memórias recentes sem qualquer dano, independente da lesão. Qualquer lesão (direita, esquerda ou bilateral) do CPFm comprometeu marcadamente a capacidade de evocação de memórias remotas no LAM, enquanto as memórias recém adquiridas foram evocadas sem qualquer prejuízo. As lesões no CPFm (uni ou bilaterais) comprometeram o desempenho dos animais no labirinto em T. Por fim, os resultados do experimento III indicaram que lesões ipsilaterais direita ou esquerda do circuito HPC-CPFm prejudicaram o desempenho dos animais ainda na fase de aquisição do LAM e comprometeu a capacidade de evocação de memórias recém e remotamente adquiridas no mesmo para; assim como afetou a performance dos animais na aquisição do labirinto em T. Nenhuma evidência de lateralização foi observada em nenhum dos experimentos. Assim, o circuito HPC-CPFm parece ser essencial para o processamento de memórias espaciais. Ainda, o HPC mostrou-se predominantemente envolvido com a evocação de memórias remotas; ao passo que aquisição de novas memórias e evocação de memórias recém-adquiridas não foram afetada enquanto o CPFm estava preservado. O CPFm por sua vez, apresentou o mesmo perfil de respostas que o HPC quando avaliada memória espacial no LAM; entretanto parece ser estrutura chave em tarefas que envolvam tomada de decisão e comportamentos reforçados; uma vez que lesões apenas nessa região levou a prejuízo de desempenho dos animais no labirinto em T.

Palavras-chave: memória episódica, memória recente, memória remota, hipocampo ventral, córtex pré-frontal medial, lateralização funcional

GENERAL ABSTRACT

The medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (HPC) have well-established roles in processing memories. Ventral portion of the HPC (vHPC) and mPFC have reciprocal connections and seems to be involved with processing recent memories (HPC) and consolidating into remote cortical memories. Recent discoveries demonstrate the existence of functional lateralization of the mPFC associated with modulation of anxiogenic states and decision making. Yet, little is known about the possible lateralization of the mPFC and HPC as memory modulator. So, present work aimed to evaluate the involvement of the HPC-mPFC circuit in processing memory in behavioral paradigms, and to verify the possible functional lateralization of its individual parts and the circuit. Therefore, experiments with bilateral, right or left HPCv (experiment I), CPFm (experiment II) and HPC-CPFm circuit (experiment III) were carried out in rats submitted to the Morris Water Maze (MWM), object recognition and T-maze, to assess recent and remote memory. Data revealed that none of the experimental groups showed impaired locomotion, and recognition memory was intact regardless of experimental manipulation. vHPC injuries did not affect the animals' performance in spatial trainings in the MWM or the ability to recall recent memories; however, animals with bilateral vHPC lesion had impaired remote memory recall. No deficit was observed in T-maze, regardless of vHPC lesion. In experiment II; animals acquired spatial navigation in MWM and recalled recent memories, regardless of the injury. Any lesion in mPFC compromised animal's ability to recall remote memories in MWM, whereas still evoked newly acquired memories. mPFC lesions (uni or bilateral) impaired animal's performance in T maze. Finally, results from experiment III indicated that ipsilateral lesion (right or left) of HPC-mPFC circuit impaired the animals' performance even during acquisition phase in MWM and the recall of recently and remotely acquired memories in the same paradigm. Also, acquisition of spatial information in T maze were impaired. No evidence of lateralization was shown. Thus, HPC-CPFm pathway seems to be essential for processing spatial memories. Still, HPC showed involvement in recalling remote memories; whereas acquisition of new memories and recall of newly acquired memories were not affected when CPFm was preserved. CPFm presented the same responses pattern as HPC when assessing spatial memory in LAM; however, it seems to be a key structure in tasks involving decision making and reinforced behaviors; since lesion only in this region led to impairments in T maze.

Keywords: episodic memory, recent memory, remote memory, ventral hippocampus, medial pre-frontal cortex, functional lateralization

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução Geral	11
LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2 – O papel do hipocampo ventral na modulação de memórias episódicas recentes e remotas e avaliação de lateralização funcional	23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
LISTA DE FIGURAS	26
LISTA DE TABELAS	28
LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS	26
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1. Animais	34
2.2. Drogas	34
2.3. Procedimentos Cirúrgicos	35
2.4. Delineamento experimental	37
2.5. Paradigmas comportamentais	38
<i>2.5.1. Labirinto Aquático de Morris</i>	38
<i>2.5.2. Teste de Reconhecimento de Objetos</i>	41
<i>2.5.3. Labirinto em T forçado</i>	43
2.6. Histologia	46
2.7. Análise Estatística	47
3. RESULTADOS	48
3.1. Labirinto Aquático de Morris	48
3.2. Teste de Reconhecimento de Objetos	50
3.3. Labirinto em T forçado	54
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7. ANEXOS	76
7.1. Anexo 1	76
7.2. Anexo 2	77
7.3. Anexo 3	78
7.4. Anexo 4	79
CAPÍTULO 3 – O papel do córtex pré-frontal medial na modulação de memórias episódicas recentes e remotas e avaliação de lateralização funcional	80
RESUMO	81
ABSTRACT	82
LISTA DE FIGURAS	83
LISTA DE TABELAS	85
1. INTRODUÇÃO	86
2. MATERIAIS E MÉTODOS	90
2.1. Animais	90
2.2. Drogas	90
2.3. Procedimentos Cirúrgicos	90

2.4. Delineamento experimental	92
2.5. Paradigmas comportamentais	92
2.6. Histologia	92
2.7. Análise Estatística	92
3. RESULTADOS	93
3.1. Labirinto Aquático de Morris	93
3.2. Teste de Reconhecimento de Objetos	95
3.3. Labirinto em T forçado	98
4. DISCUSSÃO	100
5. CONCLUSÕES	106
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
7. ANEXOS	115
7.1. Anexo 1	115
7.2. Anexo 2	116
7.3. Anexo 3	117

<i>CAPÍTULO 4 – O papel do circuito hipocampo - córtex pré-frontal medial na modulação de memórias episódicas recentes e remotas e avaliação de lateralização funcional</i>	118
---	-----

RESUMO	119
ABSTRACT	120
LISTA DE FIGURAS	121
LISTA DE TABELAS	123
1. INTRODUÇÃO	124
2. MATERIAIS E MÉTODOS	128
2.1. Animais	128
2.2. Drogas	128
2.3. Procedimentos Cirúrgicos	128
2.4. Delineamento experimental	130
2.5. Paradigmas comportamentais	130
2.6. Histologia	130
2.7. Análise Estatística	130
3. RESULTADOS	131
3.1. Labirinto Aquático de Morris	131
3.2. Teste de Reconhecimento de Objetos	133
3.3. Labirinto em T forçado	136
4. DISCUSSÃO	138
5. CONCLUSÕES FINAIS	142
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
7. ANEXOS	149
7.1. Anexo 1	149
7.2. Anexo 2	150

<i>CAPÍTULO 5 – Considerações finais e perspectivas futuras</i>	153
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	154
2. PERSPECTIVAS FUTURAS	154

CAPÍTULO 1

Introdução geral

LISTA DE ABREVIATURAS TEXTUAIS

ANOVA	Análise de variância
AP	Antero - posterior
BKY	Benjamini, Krieger e Yekutielle
CA	Corno de Amon
CA1	Corno de Amon 1
CA2	Corno de Amon 2
CA3	Corno de Amon 3
Cir-Di	Circuito direito
Cir-Es	Circuito esquerdo
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CPFm-Bi	Córtex Pré-frontal medial bilateral
CPFm-Di	Córtex Pré-frontal medial direito
CPFm-Es	Córtex Pré-frontal medial esquerdo
DV	Dorso - ventral
EPM	Erro padrão médio
GD	Giro dentado
GVe	Grupo veículo
HPC	Hipocampo
HPCd	Hipocampo dorsal
HPCv	Hipocampo ventral
HPCv-Bi	Hipocampo ventral bilateral
HPCv-Di	Hipocampo ventral direito
HPCv-Es	Hipocampo ventral esquerdo
IBO	Ácido ibotênico
LAM	Labirinto aquático de Morris
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTm	Lobo temporal medial
LTP	Potenciação de longo prazo (<i>long term potentiation</i>)
ML	Linha média (<i>midline</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NAcc	Núcleo accumbens

PBS	Tampão fosfato - salino
PET	Politereftalato de etileno
SO	<i>Stratum oriens</i>
SP	<i>Stratum pyramidale</i>
SR	<i>Stratum radiale</i>
SUB	Subiculum
RE	Núcleo reuniens
TEPT	Transtorno de estresse pós traumático
TRO	Teste de reconhecimento de objetos

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nossas memórias de nossa vida cotidiana, como pessoas, lugares e eventos, nos definem (SQUIRE E KANDEL, 1999). Memória trata-se de uma funcionalidade medular para o desenvolvimento de comportamentos adaptativos. Somente se as experiências anteriores puderem ser armazenadas e usadas para influenciar e alterar o comportamento futuro, a adaptação com relação ao meio ambiente e às mudanças ambientais será passível de ocorrência. Assim, a capacidade de armazenar memórias existe na grande maioria dos organismos vivos, começando desde simples formas celulares até organismos altamente complexos, incluindo animais e seres humanos. E como a capacidade de armazenar memórias também é o pré-requisito para desenvolver consciência, autoconsciência e personalidade, a memória e seus mecanismos subjacentes fascinam os pesquisadores desde então.

Atualmente, já está bem estabelecido que o conceito de memória não é um fenômeno único, e sim uma função cognitiva com características distintas de acordo com o sistema anatômico do encéfalo ao qual se encontra associada (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). Pesquisadores têm descrito nas últimas décadas que lesões em regiões específicas do encéfalo estão associadas a diferentes tipos de deficiências de memórias, o que indica a existência de sistemas múltiplos de memória anatomicamente distintos entre si (GRAFFAN, 1974; SQUIRE, 1992; FRANKLAND E BONTEMPI, 2005).

Dentre os diversos sistemas de classificação atualmente empregados, a memória pode ser classificada quanto ao seu período de duração e/ou capacidade de armazenagem (curto ou longo prazo), a idade de aquisição (recente ou remota) e conteúdo armazenado (declarativa, não declarativa) (BEAR et al., 2008). A memória de curto prazo tem capacidade limitada de armazenamento e pode durar apenas alguns segundos, ao passo que a memória de longo prazo armazena muitas informações por tempo virtualmente ilimitado (SHARMA et al., 2010), e ainda pode ser dividida em memória declarativa (explícita) e memória não-declarativa (implícita) (ANDERSON, 1976).

Memória declarativa fornece respostas às perguntas “O que?”, inclui conhecimento de fatos tais como lugares, coisas, pessoas e o significado destes fatos. Pode ainda ser subdividida em memória episódica, que se trata de eventos vividos pessoalmente pelo indivíduo e é específica a contextos particulares, tais como lugares e tempo; e em memória semântica que envolve o conhecimento desses fatos ocorridos independente do contexto em que foram aprendidos (MILLER, 1956; TULVING, 1972; SHARMA et al.,

2010). A principal estrutura cerebral envolvida com memória declarativa é o hipocampo (HPC) entre outras estruturas do lobo temporal medial (LTm) (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1991).

Outro conceito de memória surgiu com Miller e colaboradores (MILLER et al., 1960); denominada memória de trabalho, e foi desenvolvido para resolver falhas existentes no modelo proposto de memória de curto prazo. A memória de trabalho possui capacidade limitada para reter informações por um curto período, e é utilizada para planejar e realizar determinadas ações/comportamentos (GAZZANIGA et al., 2006; COWAN, 2008).

Como mencionado, a memória também pode ser classificada em relação ao período de tempo em que foi adquirida; memórias adquiridas há pouco tempo (minutos até poucos dias) são denominadas memória recente, enquanto memórias adquiridas há um período de tempo maior (vários dias, meses, anos) são classificadas como memória remota (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). As memórias recém-adquiridas são gradualmente transformadas de um estado inicialmente lábil (mais sensível à perda) para um estado mais permanente (mais resistente à perda) (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). O psicólogo francês Ribot, foi o primeiro pesquisador a sugerir que as memórias podem ser gradualmente reorganizadas ao longo do tempo (RIBOT, 1882). Ele descreveu como a perda de memórias após uma lesão cerebral estava frequentemente relacionada à idade da memória: o efeito de perda sobre as memórias recentes era tipicamente maior do que sobre as memórias adquiridas remotamente. Essa dissociação observada sugere que exista um processo de reorganização mnemônica dependente do tempo, o que hoje é conhecido como: a lei de Ribot.

Foi apenas a partir da segunda metade do século XX que se traçou uma relação mais precisa entre o local da lesão cerebral e os tipos de memória que se mostravam mais suscetíveis à perda (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). Uma das regiões encefálicas que ganhou atenção dos pesquisadores foi o LTm. Pessoas com lesões nessa região apresentavam grande dificuldade de formar novas memórias de longa duração, enquanto suas memórias remotas geralmente permaneciam intactas (SCOVILLE E MILNER, 1957; PENFIELD E MILNER, 1958; CORKIN, 1984). Essas constatações sugerem que o LTm, especialmente o HPC, é essencial para a aquisição inicial e evocação de novas memórias declarativas, mas que essa estrutura deixa de fazer parte desse processo com passar do tempo (SQUIRE, 1992). Além do LTm, uma segunda região encefálica se mostra bastante relacionada ao processamento da memória: o córtex pré-frontal medial (CPFm) (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). Pesquisadores descreveram que, quando

essa região é acometida por alguma patologia encefálica, a memória remota do paciente geralmente é prejudicada (GRAHAM E HODGES, 1997; SQUIRE et al., 2001; BAYLEY et al., 2003). Essa constatação sugere que regiões do CPFm atuem como sítios de armazenamento de memórias remotas e que, apesar de novas memórias serem inicialmente dependentes do HPC, elas gradualmente se consolidam em circuitos neocorticais (ALVAREZ E SQUIRE, 1994). Mas, por que o encéfalo precisa de dois sistemas de memória complementares para promover a consolidação mnemônica a longo prazo?

A partir dos trabalhos de Marr (1970 e 1971), McClelland e colaboradores (1995) sugeriram que a intercalação gradual de memórias no neocórtex é essencial para o desenvolvimento de generalidades e eventual formação de sistemas de conhecimento. Por meio de modelos conexionistas, os autores demonstraram que a incorporação rápida de novas memórias em um sistema de conhecimento já consolidado poderia causar interferências catastróficas. Uma vez que a nova informação poderia dominar ou apagar informações previamente adquiridas. Dessa forma, os autores sugerem que esse é o motivo pelo qual a consolidação cortical é um processo lento e extenso; e porque o HPC é necessário como um link temporário entre as memórias recentes e remotas. Memórias novas precisam ser incorporadas em sistemas de conhecimento já consolidados no córtex por meio de um processo lento para evitar a perda de novas informações.

Em contrapartida, o HPC é projetado para realizar exatamente o oposto: codificar novas informações rapidamente (WILTGEN et al., 2004). Essas novas informações podem ser perdidas posteriormente via decaimento espontâneo e/ou via interferências causadas por novas aprendizagens (MCCLELLAND et al., 1995; SHIMIZU et al., 2000). Alternativamente, um estudo mais recente sugere que o processo de neurogênese no giro dentado (GD) pode contribuir com a remoção periódica de memórias do HPC (FENG et al., 2001). Além desse papel de codificar temporariamente novas memórias com potencial para consolidação cortical, acredita-se que o HPC também desempenhe papel importante na reativação dessas futuras memórias consolidadas. A reativação das mesmas pelo HPC serve para fortalecer gradualmente as conexões fracas entre os sítios neocorticais (WILTGEN et al., 2004).

Dessa forma, essas duas regiões, HPC e CPFm são essenciais para a codificação e evocação de memórias episódicas (KENNEDY, 2004; HASSELMO et al., 2005; DIANA et al., 2010; PRESTON E EICHENBAUM, 2013) e estabelecem entre si aferências e eferências, diretas e/ou indiretas de maneira a formar um circuito crucial para sistemas

mnemônicos: circuito hipocampo – córtex pré-frontal medial (circuito HPC – CPFm). Diversos trabalhos recentes têm demonstrado a existência de lateralização funcional do CPFm no labirinto em cruz elevado (SULLIVAN E GRATTON, 2002; CERQUEIRA et al., 2008; COSTA et al., 2016) tarefas de aversão ao sabor (SULLIVAN E GRATTON, 2002) e tomada de decisão (CROXSON et al., 2014).

Até algumas décadas atrás, pesquisadores acreditavam que a lateralização de comportamentos e de estruturas encefálicas era uma característica exclusiva dos seres humanos, associada superioridade cognitiva (BISAZZA et al., 1998; VALLORTIGARA et al., 1999; FRASNELLI, 2013). Entretanto, nas últimas décadas tem se acumulado diversas evidências de que outros animais também apresentam funções cerebrais lateralizadas (BISAZZA et al., 1998; VALLORTIGARA et al., 1999). Atualmente já se tem descrito lateralização funcional para todo subfilo dos vertebrados (ANDREW, 1991; WARD E HOPKINNS, 1993; FRASNELLI, 2013). Ainda não está claro se essa lateralização funcional deve ser interpretada como uma homologia básica, ou como um evento evolutivo paralelo, porém independente entre os grupos (BISAZZA et al., 1998).

Possuir um sistema nervoso lateralizado pode conferir algumas vantagens ao indivíduo (FRASNELLI, 2013). Animais com lateralização funcional do encéfalo apresentaram desempenho superior ao de animais não lateralizados: pombos com lateralização visual tiveram mais sucesso na discriminação de alimentos do que animais sem lateralização visual (GÜNTÜRKÜN et al., 2000), chimpanzés destros ou sinistros conseguiram capturar mais alimento do que indivíduos que utilizavam igualmente as duas mãos (MCGREW E MARCHANT, 1999), galinhas com lateralização cerebral tiveram mais êxito ao executar duas tarefas simultâneas (encontrar alimento e vigiar ambiente contra predadores) do que animais não lateralizados (ROGERS et al., 2004), e por fim, drosófilas com assimetria encefálica tiveram sucesso na formação e retenção de memória de longo prazo, o que não foi observado em indivíduos sem lateralização do encéfalo (PASCUAL et al., 2004).

Esses dados indicam que a lateralização contribui de maneira significativa para a aptidão biológica (FRASNELLI, 2013). A lateralização encefálica pode evitar que duas regiões sejam recrutadas ao mesmo tempo para emitir uma resposta frente a um mesmo estímulo/situação, impedindo que haja duplicação de funções nos dois hemisférios (LEVY, 1977) e processamento de informações em paralelo (OLTON et al., 1979) (RODGERS, 2002; ROGERS et al., 2004); e prevenir a evocação simultânea de respostas incompatíveis através do controle de um dos hemisférios sobre todas as ações do outro

(especialmente em animais com órgãos sensoriais posicionados lateralmente, (ANDREW, 1991; VALLORTIGARA, 2000).

Além disso, Rogers (2000) sugeriu que o aumento da capacidade cognitiva é um dos benefícios potenciais de ser ter um encéfalo lateralizado, pois animais com encéfalos fortemente lateralizados podem ter a capacidade de agir diretamente sobre muitas fontes de informação ao mesmo tempo. O que nos leva a questionar a possível existência de lateralização funcional em estruturas sabidamente associadas ao processo de aquisição, formação e consolidação de memórias em mamíferos, conferindo, possivelmente, vantagens na execução dessas funções cognitivas.

Diante das evidências apresentadas, o presente trabalho buscou: (i) avaliar a contribuição do circuito HPC-CPF-m; bem como de suas regiões separadamente (HPCv e CPFm) nos processos de aquisição, consolidação e evocação de memórias espaciais recentes e remotas e de memória de reconhecimento; (ii) investigar a presença de lateralização funcional do HPC-CPF-m; bem como de suas regiões separadamente (HPCv e CPFm) no processamento de memórias episódicas (de reconhecimento e espacial recentes e remotas).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, P.; SQUIRE, L. R. Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 91, p. 7041–5, 1994.

ANDERSON, J. R. **Language, memory and thought**. Primeira edição. Hillsdale: Editora Psychology Press, 1976. P. 223 – 245.

ANDREW, R. J.; BRENNAN, A. A. The lateralization of fear behaviour in the male domestic chick: a developmental study. **Anim. Behav.**, v. 31, p. 1166-1176. 1983.

ANDREW, R. J. **Neural and behavior plasticity. The use of the chick as a model**. Primeira edição. Oxford: Editora Oxford University Press, 1991. p. 536–554.

BAYLEY, P. J.; HOPKINS, R. O.; SQUIRE, L. R. Successful recollection of remote autobiographical memories by amnesic patients with medial temporal lobe lesions. **Neuron**, v. 38, p. 135–144, 2003.

BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**. Primeira edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008. p. 212-228.

BISAZZA, A; ROGERS, L. J.; VALLORTIGARA, G. The origin of cerebral asymmetry: a review of evidence of behavioral brain lateralization in fishes, reptiles, and amphibians. **Neurosci. and Behav. Reviews**, v. 22, p. 411–426, 1998.

CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X.; SOUSA, N. The stressed prefrontal cortex. Left? Right! **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, p. 630–638, 2008.

CORKIN, S. Lasting Consequences of Bilateral Medial Temporal Lobectomy: Clinical Course and Experimental Findings in H.M. **Seminars in Neurology**, v. 4, p. 249–259, 1984.

COSTA, N. S. et al. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice : Left or right ? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82–90, 2016.

COWAN, N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? **Prog Brain Res**. v. 169, p. 323–338, 2008.

CROXSON, P. L.; WALTON, M. E.; BOORMAN, E. D.; MATTHEW, F. S.; BANNERMAN, D. M. Unilateral medial frontal cortex lesions cause a cognitive decision-making deficit in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, p. 3757–3765, 2014.

DIANA, R. A; YONELINAS, A. P.; RANGANATH, C. Medial temporal lobe activity during source retrieval reflects information type, not memory strength. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 22, p. 1808–1818, 2010.

FENG, R.; RAMPON, C.; TANG, Y. P.; SHROM, D.; JIN, J.; KYIN, M.; SOPHER, b.; MILLER, M. W.; WARE, G. M.; MARTIN, G. M.; KIM, S. H.; LANGDON, R. B.; SISODIA, S. S.; TSIEN, J. Z. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1

knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. **Neuron**, v. 32, p. 911–926, 2001.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature reviews Neuroscience**, v. 6, p. 119–30, 2005.

FRASNELLI, E. Brain and behavioral lateralization in invertebrates. **Frontiers in Psychology**, v. 4, p. 1–10, 2013.

GAZZANIGA, M. S.; IVRY, R. B.; MANGUN, G. R. **Neurociência cognitiva**. Segunda edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006. p. 115 - 118.

GRAFFAN, D. Recognition impaired and association intact in the memory of monkeys after transection of the fornix. **J Comp Physiol Psychol**, v. 86, p. 1100–1109, 1974.

GRAHAM, K. S.; HODGES, J. R. Differentiating the roles of the hippocampal complex and the neocortex in long-term memory storage: evidence from the study of semantic dementia and Alzheimer's disease. **Neuropsychology**, v. 11, p. 77–89, 1997.

GÜNTÜRKÜN, O.; DIEKAMP, B.; MANNS, M.; NOTTELMANN, F.; PRIOR, H.; SCHWARZ, A.; SKIBA, M. Asymmetry pays: Visual lateralization improves discrimination success in pigeons. **Current Biology**, v. 10, p. 1079–1081, 2000.

HASSELMO, M. E.; HOWARD EICHENBAUM. Hippocampal mechanisms for the context-dependent retrieval of episodes. **Neural Networks**, v. 18, p. 1172–1190, 2005.

KENNEDY, P. J. Retrieving Memories via Internal Context Requires the Hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 6979–6985, 2004.

LEVY, J. The mammalian brain and the adaptive advantage of cerebral asymmetry. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 299, p. 264–272, 1977.

MARR, D. A. Theory for Cerebral Neocortex. **Proc Roy Soc Lond**, v. 176, p. 161–234, 1970.

MARR, D. Simple memory: a theory for archicortex. **Philos Trans R Soc Lond Bio Sci**, n. 262, p. 23–81, 1971.

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

MCGREW, W. C.; MARCHANT, L. F. Laterality of hand use pays off in foraging success for wild chimpanzees. **Primates**, v. 40, p. 509–513, 1999.

MILLER, G. A. The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. **Psychological review**, v. 101, p. 343–352, 1956.

- MILLER, G.; GALANTER, E.; PRIBRAM, K. Plans and structure of behavior. Primeira edição. Nova York: Editora Hoet, Rinehart and Winston, 1960. p. 331-346.
- OLTON, D. S.; BECKER, J. T.; HANDELMANN, G. E. Hippocampus, space, and memory. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 2, 313-365, 1979.
- PASCUAL, A.; HUANG, K. L.; NEVEU, J.; PRÉAT, T. Bain asymmetry and long term memory. **Nature**, v. 427, p. 604–605, 2004.
- PENFIELD, W.; MILNER, B. Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. **AMA Arch Neurol Psychiatry**, n. 79, p. 475–497, 1958.
- PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. **Current Biology**, v. 23, p. R764–R773, 2013.
- RIBOT, T. **Diseases of memory**. Primeira edição. Nova York: Editora Appleton Century Crofts, 1882. p. 52 – 59.
- ROGERS, L. J. Evolution of hemispheric specialization: advantages and disadvantages. **Brain and language**, v. 73, p. 236–53, 2000.
- ROGERS, L. J.; ZUCCA, P.; VALLORTIGARA, G. Advantages of having a lateralized brain. Proceedings. **Biological sciences / The Royal Society**, v. 271, p. 420-422, 2004.
- SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 20, p. 11–21, 1957.
- SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life sciences**, v. 87, p. 521–36, 2010.
- SHIMIZU, E.; TANG, Y, P.; RAMPON, C.; TSIEN, J. Z. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. **Science**, v. 290, p. 1170–1174, 2000.
- SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological review**, v. 99, p. 195–231, 1992.
- SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E.; KNOWLTON, B. J. Retrograde amnesia. **Hippocampus**, v. 11, p. 50–55, 2001.
- SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memory: From Mind to Molecules**. Primeira edição. Nova York: Editora W. H. Freedman & Co., 1999, p. 359 – 623.
- SQUIRE, L. R.; ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science**, v. 253, p. 1380–1386, 1991.
- SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. **Brain research**, v. 927, p. 69–79, 2002.

TULVING, E. Episodic and semantic memory. In: _____ (Eds.) TULVING, E.; DONALDSON, W. **Organization of Memory**. Primeira edição. Nova York: Editora Academic Press, 1972. p. 381–403.

VALLORTIGARA, G. Comparative neuropsychology of the dual brain: a stroll through animals' left and right perceptual worlds. **Brain and language**, v. 73, p. 189–219, 2000.

VALLORTIGARA, G.; ROGERS, L. J.; BISAZZA, A. Possible evolutionary origins of cognitive brain lateralization. **Brain Research Reviews**, v. 30, p. 164–175, 1999.

WARD, J.; HOPKINNS, W. **Primate laterality: Current behavioural evidence of primate asymmetries**. Primeira edição. Nova York: Editora Springer Vertag, 1993, p. 35 – 59.

WILTGEN, B. J.; BROWN, R. A. M.; TALTON, L. E.; SILVA, A. J. New circuits for old memories: The role of the neocortex in consolidation. **Neuron**, v. 44, p. 101–108, 2004.

CAPÍTULO 2

O papel do hipocampo ventral na modulação de memórias episódicas recentes e remotas e avaliação de lateralização funcional

RESUMO

Apesar de ser alvo de intensas pesquisas há mais de seis décadas, o hipocampo (HPC) ainda é uma estrutura que atrai atenção, sendo alvo de muitos debates atuais. Trata-se de uma região essencial para a aquisição e consolidação de memória episódicas, em especial das memórias espaciais *per se*. E, em conjunto com outras regiões, tais como o córtex pré-frontal medial (CPFm), atua como substrato para circuitos importantíssimos para a modulação temporal de memórias (circuito hipocampo – córtex pré-frontal medial). Mais recentemente, pesquisadores da área de neurociência têm voltado sua atenção para possíveis lateralizações do sistema nervoso central. Entretanto, dentre os estudos que se dedicam ao HPC, nota-se uma esmagadora falta de consideração pelas diferenças existentes entre os hemisférios dessa estrutura. Objetivando acrescer o conhecimento a respeito da funcionalidade do HPC na modulação temporal de memória episódicas, assim como possíveis lateralizações funcionais dessa estrutura, o presente estudo (experimento I) investigou os efeitos de lesões por ácido ibotênico (IBO) na porção ventral do HPC (HPCv) durante a execução de paradigmas de memória: labirinto aquático de Morris (LAM), teste de reconhecimento de objetos (TRO) e labirinto em T forçado. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: (i) grupo veículo, que receberam injeções bilaterais do veículo farmacológico (tampão salina fosfato – PBS) em ambos HPCv; (ii) grupo HPCv esquerdo, animais receberam uma injeção de PBS no HPCv direito e uma injeção do lesionador IBO (10µg/µl) no HPCv esquerdo; (iii) grupo HPCv direito, animais receberam uma injeção de PBS no HPCv esquerdo e uma injeção de IBO no HPCv direito; (iv) e grupo HPCv bilateral, animais receberam injeção bilateral de IBO em ambos HPCv. Os dados do LAM, indicaram que independente da lesão no HPCv (esquerda, direita ou bilateral) os animais aprenderam a tarefa espacial e evocaram memórias espaciais recentemente adquiridas. Entretanto, animais com lesão bilateral do HPCv tiveram prejuízo para evocar memórias espaciais remotamente adquiridas. Nenhum prejuízo foi observado em comportamentos locomotores e exploratórios para nenhum grupo com manipulação farmacológica; bem como a memória de reconhecimento mostrou-se inalterada independente da lesão em questão. No labirinto em T forçado, nenhum prejuízo no desempenho dos animais foi observado para nenhum dos grupos experimentais. Apesar das crescentes evidências, nenhum indicativo de lateralização funcional do HPCv foi observado nesse estudo para modulação de memórias episódicas. Assim, a integridade de ambos hemisférios do HPCv parece ser essencial para evocação de memórias espaciais remotas; enquanto a aquisição e evocação de memórias espaciais recentes aparenta independe desse sítio; assim como a memória de reconhecimento e tarefas espaciais que dependem de comportamento motivado e tomada de decisões (labirinto em T forçado).

Palavras-chave: HPCv, lateralização funcional, memória recente, memória remota, consolidação.

ABSTRACT

Despite being the object of intense research for more than six decades, the hippocampus (HPC) still is a structure that attracts attention, being the subject of many current debates. It is an essential region for the acquisition and consolidation of episodic memories, especially space memories *per se*. And, together with other regions, such as the medial prefrontal cortex (mPFC), forms substrate for pathways very important for temporal modulation of memories (such as hippocampal - medial prefrontal cortex pathway). Recently, neuroscientists have turned their attention to possible lateralizations of the central nervous system. However, among the studies dedicated to HPC, there is an overwhelming lack of consideration for the existing differences between the hippocampal hemispheres. Aiming to increase knowledge about the functionality of HPC in the temporal modulation of episodic memory, as well as its possible functional lateralization, the present study (experiment I) investigated the effects of lesions with ibotenic acid (IBO) in the ventral portion of HPC (HPCv) during the execution of memory paradigms: Morris water maze (MWM), object recognition test (ORT) and forced T maze. Animals were divided into four experimental groups: (i) vehicle group, which received bilateral injections of the pharmacological vehicle (saline phosphate buffer - PBS) in both HPCv; (ii) left HPCv group, animals received an injection of PBS in the right HPCv and an injection of the IBO (10 µg /µl) in the left HPCv; (iii) right HPCv group, animals received an injection of PBS in the left HPCv and an injection of IBO in the right HPCv; (iv) and bilateral HPCv group, animals received bilateral injection of IBO in both HPCv. MWM data indicated that regardless of HPCv lesion (left, right or bilateral) animals learned the spatial task and evoked recently acquired spatial memories. However, animals with bilateral HPCv lesions had impairments in recalling remotely acquired spatial memories. No impairments were observed in locomotor and exploratory behavior for any group with pharmacological manipulation; as well as the recognition memory was unaffected regardless of the lesion in question. In the forced T maze, no performance's impairments were observed for any of the experimental groups. Despite the growing evidence, no indication of functional HPCv lateralization was observed in this study for modulation of episodic memories. Thus, the integrity of both hemispheres of HPCv appears to be essential for recalling remote spatial memories; whereas the acquisition and recall of recent spatial memories seems to be independent of this site; as well as the memory of recognition and spatial tasks that depend on motivated behavior and decision making (forced T maze).

Keywords: HPCv, functional lateralization, recent memory, remote memory, consolidation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Hipocampo de mamíferos.** A figura a) destaca a localização da formação hipocampal no lobo temporal de humano. A figura b) ilustra a mesma estrutura no encéfalo do roedor e suas principais subdivisões (CA1, CA3, subiculum, giro dentado) em corte transversal 30
- Figura 2. Loop trissináptico no hipocampo.** O córtex entorrinal projeta-se principalmente para a região de GD (primeira sinapse). As fibras do DG então projetam-se para a região CA3 por meio da via das fibras musgosas (segunda sinapse); os neurônios da região CA3 por sua vez projetam-se para a CA1 por meio da via colateral de Schaffer (terceira sinapse). Por fim, a região CA1 projeta-se de volta para o córtex entorrinal, completando o *loop* 31
- Figura 3. Representações esquemáticas dos sítios de injeção considerados corretos no procedimento de lesão do hipocampo ventral.** Utilizando-se das coordenadas estereotáxicas (AP: -6,0; ML: ±5,5 e DV: -7,5), foram considerados acertos cirúrgicos quando a droga foi infundida nas regiões ventrais da CA1 e/ou subiculum. A figura 4A indica o sítio de injeção no hemisfério esquerdo. A figura 4B indica o sítio de injeção no hemisfério direito. E a figura 4C indica os sítios de injeção em ambos hemisférios para os animais do grupo com lesão bilateral (cortes coronais) 36
- Figura 4. Cortes histológicos em plano coronal da região de córtex pré-frontal medial de um animal com lesão por IBO no hemisfério esquerdo.** 4A – ambos hemisférios encefálicos parcialmente expostos, a região pontilhada e destacada, resalta um sítio com alteração morfológica dos neurônios, a qual envolve parte da região infra e pré-límbicas do córtex pré-frontal medial esquerdo (representado do lado direito da imagem devido ao processamento histológico), aumento de 40X. 4B destaque para região com alteração morfológica evidenciada por uma coloração mais discreta, aumento de 100x. 4C - destaque para a morfologia da região com menor grau de coloração, observa-se apenas estruturas celulares alteradas, aparentemente carentes de núcleo – aumento de 200X. 4D – imagem representando a estrutura celular de neurônios fora da área da lesão, com núcleos evidenciados 37
- Figura 5. Esquema representando a ordem cronológica de realização dos experimentos comportamentais** 38
- Figura 6. Esquema do arranjo experimental e aparato do LAM** 39
- Figura 7. Fotografia de dois objetos empregados no teste de reconhecimento de objeto.** A imagem mostra uma torre de peças de Lego e uma garrafa Falcon de cultura de tecido preenchida com areia. Durante a fase de familiarização grupos de animais foram apresentado a duas garrafas idênticas outros. A dois blocos de lego idêntico. Na etapa de teste os mesmo foram substituídos por um novo objeto de acordo com o grupo em questão 42
- Figura 8. Representações esquemáticas do protocolo adotado no labirinto em T.** A imagem 8A apresenta o arranjo do aparato durante os treinos espaciais. A figura 8B indica o arranjo experimental durante os *probe trials*. A organização do teste como um todo está representado na imagem 8C 46
- Figura 9. Treinos espaciais.** A figura 9A apresenta a média de tempo (s) que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa (latência de escape) durante os 30 treinos espaciais realizados no Labirinto Aquático de Morris. A figura 9B apresenta a média diária de tempo que os animais levaram para localizar a plataforma submersa 49
- Figura 10. Tempo de retenção nos *probe trials*.** Os gráficos apresentam o temo médio que os animais passaram nadando sobre o quadrante que continha a plataforma submersa durante os treinos espaciais no Labirinto Aquático de Morris 50

Figura 11. Parâmetros locomotores e exploratórios. A figura 11A apresenta a frequência total de entradas nos quadrantes do aparato de campo aberto durante a primeira sessão de habituação dos animais. A figura 11B apresenta a frequência média de levantamentos no aparato de campo aberto. A figura 11C apresenta o tempo médio que os animais passaram realizando o comportamento de <i>grooming</i> durante a habituação ao campo aberto	51
Figura 12. Teste de reconhecimento de objetos. A figura 12A apresenta o tempo em segundos que os animais passaram explorando os objetos idênticos (1 e 2) apresentados durante a etapa de familiarização. A figura 12B apresenta a média de tempo (s) que os animais passaram explorando o objeto com o qual foram familiarizados (velho – V) e o novo objeto (N) apresentado durante o teste de reconhecimento	53
Figura 13. Treinos espaciais. A figura 13A apresenta a % média de escolhas corretas (entradas no braço com alimento acessível) realizadas ao longo dos 60 treinos espaciais no labirinto em T forçado. A figura 13B apresenta a média diária de % de escolhas corretas em uma curva de aprendizagem	55
Figura 14. Probe trials no labirinto em T forçado. A imagem apresenta a porcentagem média de animais classificados como <i>place learners</i> durante os três <i>probe trials</i> realizados ao longo do protocolo	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média de tempo explorando objetos idênticos durante a sessão de familiarização no teste de reconhecimento de objetos	52
Tabela 2. Tempo médio explorando o objeto velho (previamente apresentado na sessão de familiarização) e o objeto novo (apresentado no teste de reconhecimento de objeto)	52
Tabela 3. Tempo médio (em segundos) que os animais levaram para atingir o critério da tarefa ..	53
Tabela 4. Média de porcentagem de escolhas corretas (entradas nos braços com alimento disponível) durante os 60 treinos espaciais no labirinto em T forçado	54

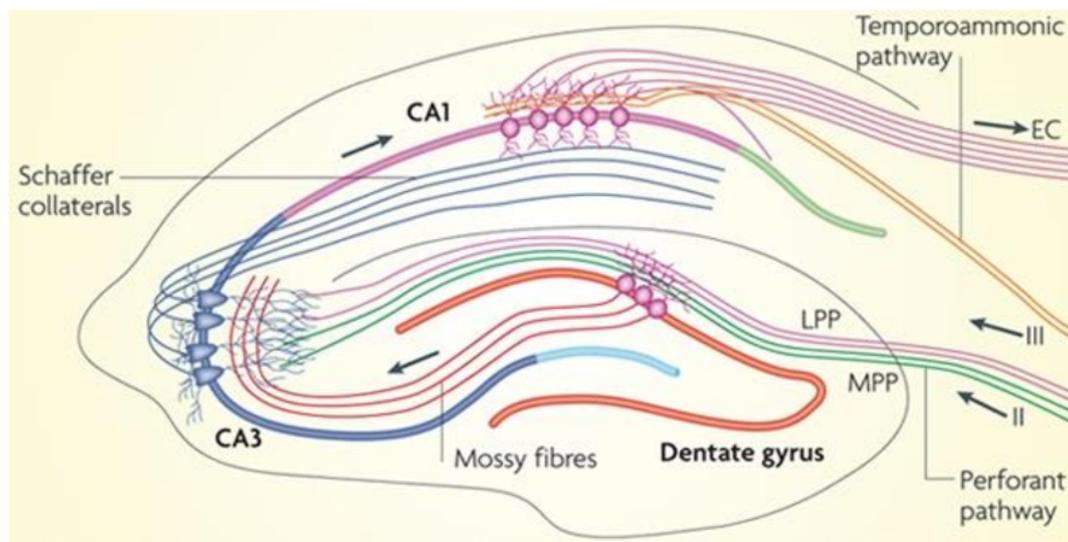
1. INTRODUÇÃO

Em um intervalo de 19 anos, entre os anos de 1957 e 1976, três estudos importantíssimos alavancaram o hipocampo (HPC) e o lobo temporal medial (LTm) para a vanguarda da pesquisa neurobiológica sobre aprendizagem e memória. Em 1957, Scoville e Milner descreveram o emblemático caso H.M. que perdeu muito de sua memória com a retirada de seus lobos temporais mediais na tentativa de curar um quadro de epilepsia intratável; e a partir deste, uma vastidão de estudos têm relacionado o HPC à memória. Em 1973, Bliss e Lomo descreveram a potenciação de longo prazo (LTP) estudando o HPC de coelhos, que se tornou o modelo base que explica os mecanismos celulares do armazenamento memórias. Enfim, em 1976, John O'Keefe descreveu a presença de neurônios no HPC que se tornavam seletivamente ativos quando um rato ocupava um local específico em seu ambiente (O'KEEFE E DOSTROVSKY, 1971; O'KEEFE, 1976). A estas células deu-se o nome de “*place cells*” e graças a sua descoberta e estudo, o livro de O'Keefe e Lynn Nadel (1978); “*The Hippocampus as a Cognitive Map*” marcou o campo da neurobiologia criando uma nova área de pesquisa que aflorou estudos importantíssimos para a compreensão da cognição em níveis de circuitos e sistemas neurais.

A anatomia do HPC foi descrita há mais de quatro séculos, mas sua função ainda permanecia incerta até o início da era da neurociência moderna (DUVERNOY et al., 2013; BIR et al., 2015). Hoje conhece-se muito de suas funcionalidades, sendo o processamento de memórias o eixo central, sendo esta alvo de muitos transtornos neurológicos e psiquiátricos tais como Doença de Alzheimer, epilepsia do lobo temporal, acidentes vasculares cerebrais entre outros (BARTSCH, 2012; DUVERNOY et al., 2013; BIR et al., 2015). É um consenso na comunidade acadêmica que a primeira descrição e denominação dessa estrutura foi feita pelo italiano Giulio Cesare Aranzio (Arantius – 1530-1589), um anatomista e cirurgião pupilo de Vesalius (BRAMBILLA, 1781; JUDAŠ E PLETIKOS, 2010; BIR et al., 2015); ele descreveu e nomeou essa formação anatômica por meio de estudo do encéfalo humano e publicou essa informações no primeiro volume do *Anatomicarum Observation Liber* (O livro das observações anatômicas). O nome hipocampo, segundo o autor, faz alusão a semelhança anatômica a uma cavalo-marinho (gênero *Hippocampus*, do grego hippo= cavalo e kampus= monstro marinho – ARANTIUS, 1587; TILNEY, 1939; JUDAŠ E PLETIKOS, 2010; BIR et al., 2015). E, de acordo com a maioria dos autores da área, a primeira ilustração do HPC humano foi

da literatura; o *loop* trissináptico (KNIERIM, 2015) (Figura 2). O córtex entorrinal é responsável pela maior aferência cortical que o HPC recebe, e essa estrutura pode ser dividida em três zonas relativamente independentes orientadas rostro-caudalmente em paralelo: (i) zona caudo-lateral; (ii) zona intermediária; e (iii) zona rostro-medial que parecem representar três unidades funcionais distintas, pois suas aferências são singulares e a conectividade entre essas três regiões é muito escassa (INSAUSTI et al., 1997; BURWELL, 2006). A porção caudo-lateral recebe informações viso-espaciais por meio de aferências oriundas dos córtices pós-rinal e peririnal adjacente, e projeta-se para o hipocampo dorsal (HPCd). A banda mediana (rostro-medial) é suprida com informações olfativas, viscerais e gustativas e suas eferências projetam-se para o hipocampo ventral (HPCv). Por fim, a banda intermediária parece receber aferências ainda mais difusas e projeta-se principalmente para as porções intermediárias do HPC (FANSELOW E DONG, 2010). Ademais das regiões CA1 e subiculum partem aferências diretas de volta ao córtex entorrinal (TAMAMAKI E NOJYO, 1995; NABER et al., 2001; KLOOSTERMAN et al., 2003; CENQUIZCA E SWANSON, 2007).

Figura 2. Loop trissináptico no hipocampo. O córtex entorrinal projeta-se principalmente para a região de GD (primeira sinapse). As fibras do DG então projetam-se para a região CA3 por meio da via das fibras musgosas (segunda sinapse); os neurônios da região CA3 por sua vez projetam-se para a CA1 por meio da via colateral de Schaffer (terceira sinapse). Por fim, a região CA1 projeta-se de volta para o córtex entorrinal, completando o *loop*.



Adaptado de Deng et al., 2010

Assim, hoje dispomos de evidências comportamentais suficiente indicando a existência de uma porção anatômica mais rostral/dorsal, comumente relacionada com o processamento cognitivo, especialmente aprendizado e memória espaciais; usualmente

denominado como hipocampo “frio” ou cognitivo, uma vez que trata-se da principal porta de entrada para as memórias declarativas independente de seu conteúdo emocional ou falta do mesmo. Enquanto que a porção ventral do hipocampo, denominado hipocampo “quente” ou emocional, está intimamente associada a processamentos emocionais, regulando respostas ao estresse, sendo importante para aprendizagem e memória emocional (FANSELOW E DONG, 2010).

Apesar de ser alvo de intensas pesquisas experimentais há mais de 60 anos, o hipocampo é uma estrutura encefálica que ainda atrai atenção e é alvo de muito debate, especialmente no que tange seu papel/funcionalidades biológicas basais (FANSELOW E DONG, 2010). Ratos que aprenderam a tarefa espacial no labirinto aquático de Morris (LAM) apresentam alterações na expressão de diversos genes, especificamente no HPCd, oito vezes maior no hemisfério direito comparado ao esquerdo (KLUR et al., 2009). Consistente a isso, a inativação transiente do hemisférios direito, mas não esquerdo do HPCd prejudica a evocação de memórias espaciais (KLUR et al., 2009). Dados de estudos com humanos, apontam que taxistas quando diante de rotas de deslocamento espacialmente complexas, apresentam maior padrão de ativação do hipocampo direito comparado ao esquerdo (MAGUIRE, 1997). Tais evidências levantam a hipótese de que além de todas as particularidades apontadas entre sub-regiões do HPC, essa estrutura parece possuir lateralização anatômica e funcional.

As assimetrias anatômicas, moleculares e funcionais entre os hemisférios direito e esquerdo do encéfalo são uma questão central da neurociência a ser elucidada (GOTO et al., 2010). No que tange o HPC, alguns estudos apontam que a distribuição das subunidades $\epsilon 2$ de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) no HPC de camundongos é assimétrica, tanto para as sinapses formadas nos dendritos apicais e basais de neurônios individuais, quanto entre as sinapses formadas pelas aferências de neurônios piramidais no hemisférios direito e esquerdo (KAWAKAMI et al., 2003; WU et al., 2005). E essa distribuição assimétrica das subunidades $\epsilon 2$ parece afetar as propriedades dos receptores NMDAs nas sinapses hipocampais, gerando duas populações de sinapses com propriedades complementares: sinapses com predominância das subunidades $\epsilon 2$ desenvolvem plasticidade mais rapidamente; enquanto a plasticidade carece de mais tempo para ocorrer em grupos neurais com menor densidade de $\epsilon 2$ (GOTO et al., 2010) e essas duas populações sinápticas distribuem-se assimetricamente pela circuitaria hipocampal. Goto e colaboradores (2010) trabalhando com camundongos geneticamente

modificados com perda da assimetria hipocampal, observaram que estes animais apresentaram navegação espacial e retenção da memória de trabalho prejudicadas comparada aos animais selvagens (com assimetria hipocampal). Segundo os autores, tal assimetria direita/esquerda para nessa estrutura é crítica para boa execução de algumas funções cerebrais de ordem superior. Somando-se a isso, diversos estudos tem relacionado um volume hipocampal menor em pessoas com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) comparada a pessoas não afetadas (LIBERZON E PHAN, 2003; SMITH, 2005); especificamente o hemisfério direito do HPC, mas não o esquerdo apresenta volume reduzido nesses pacientes comprado a pessoas expostas a um trauma, mas que não desenvolveram TEPT (WOON et al., 2010); tais resultados reforçam a ideia de assimetrias estruturais e funcionais dessa estrutura. Ainda, Klur e colaboradores (2009) observaram que na CA1 do hemisfério direito de ratos que treinavam navegação espacial, o número de genes expressos relacionados a navegação e informação espacial era de 623; enquanto que para a CA1 do hemisfério esquerdo apenas 74 desses genes estavam em expressão. Adicionalmente, no LAM, durante a fase de aquisição da tarefa o HPC esquerdo se mostrou dominante, enquanto que na fase de evocação das memórias o HPC direito parecia estar mais ativo.

Diante de tais evidências, fica claro que o HPC de roedores exibe lateralização anatômica e funcional impressionantes; apesar disso, a maioria dos trabalhos que investigam o papel dessa estrutura desconsidera tais diferenças importantíssimas. As assimetrias identificadas até o presente momento sugerem que a compreensão do HPC como um estrutura bilateral é essencial para o estudo desse sítio encefálico. Assim, a consideração da lateralização do HPC na elaboração de estudos pode fornecer informações inatingíveis de outra maneira sobre a função do HPC e a neurobiologia da memória. Isso posto, o presente estudo (experimento I) objetivou; (i) avaliar a contribuição da porção ventral do HPC (HPCv) nas memórias episódicas (espaciais e de reconhecimento); (ii) avaliar o papel do HPCv no processamento temporal de memórias espaciais (recente e remota); (iii) investigar se essa estrutura apresenta lateralização funcional no processamento de memórias episódicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos machos, adultos (8 semanas), Wistar. Os animais foram divididos em grupos de quatro indivíduos por gaiola e mantidos em biotério com temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12:12 horas (com luzes acesas às 19h30min) controlados. Os animais tinham acesso a água e alimento (especificar ração) *ad libitum*, exceto durante os breves períodos de realização dos protocolos experimentais. Os experimentos foram realizados durante a fase escura do ciclo (entre às 08h00 e às 16h00) sob luz artificial vermelha. Todos os procedimentos empregados nesse estudo foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP- CSJRP 134/2016).

2.2. Drogas

O protocolo anestésico/analgésico empregado nesse estudo, foi adaptado a partir do trabalho publicado por Kirby e colaboradores (2012) específico para lesões excitotóxica. Assim, as drogas empregadas nessa etapa do estudo foram:

- **sulfato de morfina** (4,5 mg/kg – subcutânea - Hipolabor Farmacêutica, Belo Horizonte, MG) - utilizado como analgésico e medicação pré-anestésica;
- **atropina em solução** (0,4 mg/kg – subcutânea - Vansil, Descalvado, SP) – administrada 25 minutos após a injeção de sulfato de morfina para prevenir depressão cardiorrespiratória;
- **tiopental sódico** (50 mg/kg – intraperitoneal – Cristália, São Paulo, SP) – administrado 5 minutos após a injeção de atropina para induzir o plano anestésico;
- **meloxicam** (2 mg/kg – subcutâneo – Intervet Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ) – administrado após a finalização do procedimento cirúrgico como anti-inflamatório e indutor de analgesia pós-operatória;
- **cloridrato de lidocaína** (solução injetável 2% - subcutânea - Vansil, Descalvado, SP) – administrada sob a pele onde a incisão cirúrgica era realizada para indução de anestesia local;
- **pentabiótico** (56,7 mg/kg – intramuscular – Zoetis, Campinas, SP) – administrado após a finalização do procedimento cirúrgico como antibiótico de amplo espectro;

- **rifamicina sódica** (10 mg/ml – solução tópica - Aventis, Suzano, SP) – aplicada sobre a incisão cirúrgica dos animais após finalização da cirurgia estereotáxica.

Para indução das lesões encefálicas no HPCv foi utilizado ácido ibotênico (IBO) (5µg/0,5µL, Sigma-Aldrich). O IBO tem sido amplamente utilizado como indutor de lesões neuronais permanentes (KOHLENER E SCHWARCZ, 1983; JARRARD, 1989; LIPSKA et al., 1992; SULLIVAN E GRATTON, 1999) devido sua natureza neurotóxica. Trata-se de um aminoácido excitatório isolado a partir do cogumelo *Amantia muscaria* que atua como potente agonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos (receptores NMDA e metabotrópicos). A neurotoxicidade do IBO se dá por meio da indução da abertura de canais de Ca²⁺ que, em excesso, promove apoptose dos neurônios expostos a esse composto (SCHWARCZ et al., 1979; ZINKAND et al., 1992; HERMIT et al., 2004).

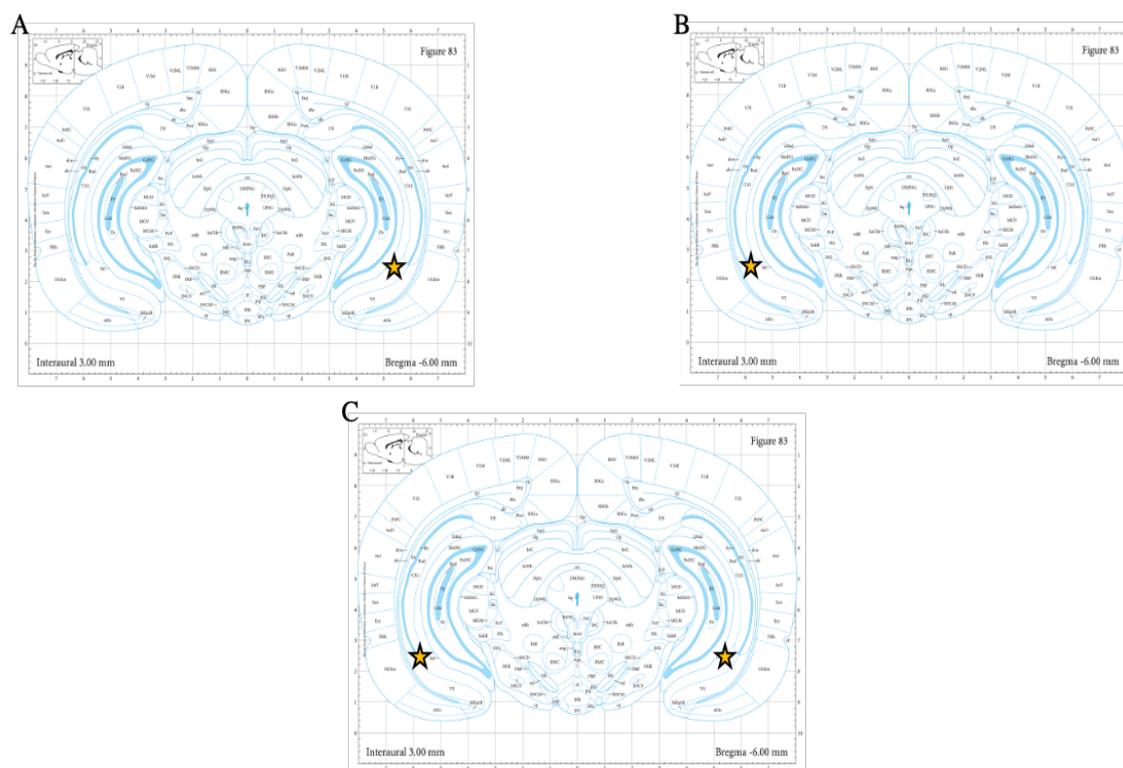
2.3. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados seguindo o protocolo descrito no item anterior. Após avaliação de reflexos a estímulos mecânicos na cauda e membros, os animais foram posicionados no estereotáxico e uma incisão ao longo da linha média do crânio foi realizada para exposição da porção superior do crânio. Após remoção dos tecidos moles aderidos ao crânio por meio do uso de tesuras oftalmológicas cirúrgicas e secagem com hastes flexíveis, os sítios para injeção do veículo ou IBO foram determinados e indicados com marcadores permanentes e então o desgaste ósseo foi realizado por meio de uma broca dental acoplada a um micromotor. As coordenadas estereotáxicas (a partir do crânio) foram baseadas no livro de Paxinos & Watson (2005) “*Rat brain atlas*”. Para injeção bilateral/unilateral no HPCv foram utilizadas as seguintes coordenadas: AP: -6,00 mm (a partir do bregma), ML: ±5,5 mm (a partir da linha média) e DV: -7,5 mm (a partir da superfície do crânio).

Após exposição do sítio de injeção, os animais receberam uma injeção única de IBO diluído em tampão fosfato-salino (PBS) (Sigma Aldrich, 5µg/0,5µL – grupos com lesão) ou uma injeção única de PBS (0,5 µL – grupo veículo) por meio de uma seringa de Hamilton de 1µL. A taxa de infusão utilizada foi de 0,5µL/min (Bomba de infusão - Insight[®]) e a agulha permaneceu no sítio por 4 minutos para garantir a infusão da droga. Finalizada a injeção, as perfurações no crânio foram cobertas com acrílico dental (Vipiflash – VIPI Indústria, Pirassununga, SP) e a incisão na pele foi suturada.

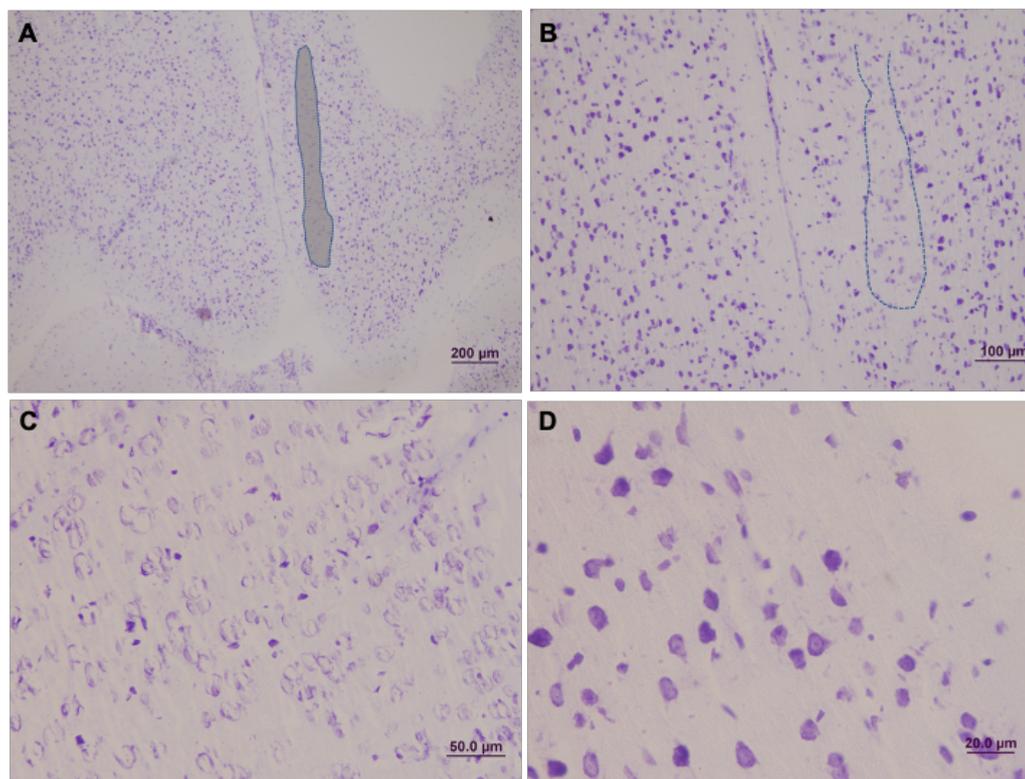
Foram considerados como “acerto” cirúrgico, animais nos quais a lesão hipocampal (ventral) envolveu as regiões CA1 ventral e/ou subiculum (Figura 3). Animais que receberam injeções em outras regiões encefálicas foram removidos da amostra experimental. Ao final desse capítulo, na seção 8. Anexos, é possível observar o perfil de lesões neuronais produzidas (Itens 8.2.; 8.3. e 8.4.). A figura 4 apresenta o perfil das lesões evidenciado por um animal modelo pertencente ao grupo com lesão no CPFm esquerdo.

Figura 3. Representações esquemáticas dos sítios de injeção considerados corretos no procedimento de lesão do hipocampo ventral. Utilizando-se das coordenadas estereotáticas (AP: -6,0; ML: $\pm 5,5$ e DV: -7,5), foram considerados acertos cirúrgicos quando a droga foi infundida nas regiões ventrais da CA1 e/ou subiculum. A figura 4A indica o sítio de injeção no hemisfério esquerdo. A figura 4B indica o sítio de injeção no hemisfério direito. E a figura 4C indica os sítios de injeção em ambos hemisférios para os animais do grupo com lesão bilateral (cortes coronais).



A figura foi criada pela autora utilizando-se de imagens retiradas do livro *The rat brain atlas in stereotaxic coordinates* dos autores George Paxinos e Charles Watson, 6ª ed, 2005.

Figura 4. Cortes histológicos em plano coronal da região de córtex pré-frontal medial de um animal com lesão por IBO no hemisfério esquerdo. 4A – ambos hemisférios encefálicos parcialmente expostos, a região pontilhada e destacada, resalta um sítio com alteração morfológica dos neurônios, a qual envolve parte da região infra e pré-límbicas do córtex pré-frontal medial esquerdo (representado do lado direito da imagem devido ao processamento histológico), aumento de 40X. 4B destaque para região com alteração morfológica evidenciada por uma coloração mais discreta, aumento de 100x. 4C - destaque para a morfologia da região com menor grau de coloração, observa-se apenas estruturas celulares alteradas, aparentemente carentes de núcleo – aumento de 200X. 4D – imagem representando a estrutura celular de neurônios fora da área da lesão, com núcleos evidenciados.



Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em suas gaiolas e passaram por um período de recuperação de 14 dias, com alimentação *ad libitum*. Passado o período de recuperação, foram submetidos aos testes comportamentais de LAM, reconhecimento de objetos e labirinto em T.

2.4. Delineamento experimental

Para esse experimento, foram utilizados 40 indivíduos divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

Grupo veículo (GVe, n=10): Os animais foram utilizados como controle cirúrgico. Dessa forma, apesar de passarem pela cirurgia, receberam apenas uma injeção de tampão fosfato-salino (PBS) em ambos HPCVs;

Grupo HPCv-Di (n=9): Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico com uma injeção de IBO no HPCv direito, lesionando-o permanentemente e uma injeção de PBS no HPCv esquerdo, como controle cirúrgico;

Grupo HPCv-Es (n=10): Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico com uma injeção de IBO no HPCv esquerdo, lesionando-o permanentemente e uma injeção de PBS no HPCv direito, como controle cirúrgico;

Grupo HPCv-Bi (n=11): Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico com injeção bilateral de IBO nos HPCvs lesionando-os permanentemente.

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos de acordo com o grupo experimental em questão, os animais foram mantidos em suas caixa-moradia em rack ventilado (Alesco, Monte Mor, SP) por 14 dias em recuperação cirúrgica com água e alimento *ad libitum*. Após o período de recuperação, foram submetidos aos protocolos comportamentais do labirinto aquático de Morris (LAM), teste de reconhecimento de objetos (TRO) e labirinto em T forçado (Figura 5).

Figura 5. Esquema representando a ordem cronológica de realização dos experimentos comportamentais.



Da autora.

2.5. Paradigmas Comportamentais

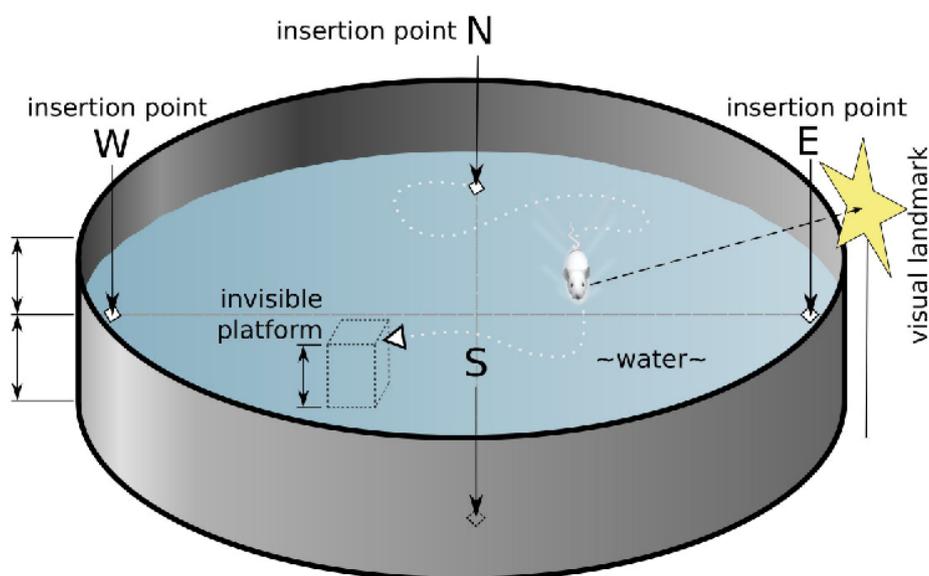
2.5.1. Labirinto Aquático de Morris

O labirinto aquático de Morris (LAM) trata-se de uma metodologia consolidada e amplamente utilizada para avaliação e aprendizagem e memória espacial (MORRIS et al., 1982; D’HOOGE E DE DEYN, 2001; GALLAGHER et al., 2003), criado no início da década de 1980 (MORRIS et al., 1982) pelo neurocientista britânico Richard Morris como alternativa para o então utilizado labirinto radial (MORRIS, 1981, MORRIS et al., 1982; MORRIS, 1984). Esse teste comportamental baseia-se na aversão inata que

roedores apresentam pela água. E na capacidade que esses animais possuem de construir mapas espaciais mentais baseando-se em pistas visuais do contexto ao qual são expostos (O'KEEFE E NADEL, 1978).

O aparato consiste em uma piscina de fibra de vidro (170 cm de diâmetro e 58 cm de altura) preenchida com água e leite em pó para conferir turbidez ao líquido (25°C, 40 cm de profundidade). No centro de um dos quadrantes foi posicionada uma plataforma de escape removível abaixo do nível da água. A piscina foi dividida em quatro quadrantes (A, B, C e D) por duas linhas imaginárias que cruzam o centro do aparato (Figura 6). Além do aparato experimental, pistas visuais se fazem essenciais para a realização desse teste, uma vez que é por meio dessas que os animais podem criar um mapa espacial do contexto e adequar sua navegação diante deste (O'KEEFE E NADEL, 1978). Dessa forma, o aparato experimental foi acomodado em uma sala de ensaio com várias pistas visuais externas: recortes de papel cartão com cores e formas distintas (estrela preta, quadrado amarelo, triângulo vermelho e círculo azul – com dimensões aproximadas de 60 cm de altura e largura) fixados nas paredes a uma distancia de cerca de 1,5 m do labirinto).

Figura 6. Esquema do arranjo experimental e aparato do LAM.



Adaptada de CASTELL; JENSON; LARIOS (2015).

Este teste comportamental foi realizado em 6 dias experimentais seguindo as 2 etapas descritas a seguir:

- Treinos Espaciais (dias 1 a 5): A plataforma de escape feita de acrílico transparente (13 cm x 13 cm; 1,5 cm abaixo da superfície da água, tornando-se assim invisível aos animais) foi posicionada no quadrante B para metade do grupo experimental e no quadrante oposto (C) para outra metade do grupo experimental, para evitar qualquer tipo de viés experimental e permaneceu nesta localização ao longo de todo esse treino espacial. Cada animal foi submetido a 5 treinos diários, com intervalo de 30 segundos entre cada treino, durante 7 dias experimentais consecutivos. Para cada tentativa, os animais eram gentilmente posicionados na água encarando a parede da piscina a partir de um dos quatro pontos de início. A sequência de liberação dos animais nos pontos foi variável entre as treinos de um mesmo dia, mas idêntica para todos os animais dentro de uma mesma sessão/dia. O tempo (segundos) necessário para encontrar a plataforma invisível foi registrado com um cronômetro, sendo denominado **latência de escape**. A latência de escape é uma das medidas fornecidas por esse paradigma indicativa da força e acurácia da aprendizagem espacial e da memória de trabalho (D'HOOGE; DE DEYN, 2001). Caso a plataforma não fosse localizada em até 90 segundos, os animais eram retirados da água e posicionados em cima da plataforma. Em ambas as situações (animal localizar a plataforma sozinho ou ser posicionado sobre ela), os indivíduos permaneceram sobre a mesma durante 30 segundos.

Entre os treinos sucessivos de um mesmo animal, este era retirado da plataforma e permanecia em uma caixa de plástico durante 30 segundos até iniciar seu próximo treino. Durante esse intervalo de 30 segundos o experimentador retirava os bolos fecais do tanque. Após o último treino da sessão, cada animal era seco com uma toalha e reposicionado em sua caixa moradia extra, quando todos os residentes de uma mesma caixa moradia finalizavam os treinos diários, retornavam para a caixa-moradia original e ao rack ventilado.

- Teste espacial (dia 6 e dia 38): A plataforma de escape era removida do tanque nessa etapa. Cada animal realizava uma única sessão de teste, durante a qual era solto no quadrante oposto ao que continha a plataforma invisível durante seus treinos espaciais. Foi permitido que o animal nadasse por 60 segundos e então se quantificou o tempo gasto (s) nadando sobre cada um dos quadrantes do aparato (**tempo de retenção**). O tempo de

retenção é indicativo dos níveis de retenção de memória apresentado pelo animal, assim, quanto maior o tempo de retenção, assume-se que maior a capacidade de retenção de memória do animal (BROMLEY-BRITS; DENG; SONG, 2011). Foram realizadas duas sessões de *probe trials*; (i) a primeira delas, 24 horas após a finalização do sétimo dia de treino espacial do LAM (portanto no 8º dia experimental); e a segunda delas (ii) no 38º dia experimental, ou seja, 30 dias após a realização do primeiro *probe trial* no LAM (e 24 horas após a finalização do último dia experimental do labirinto em T forçado). Assim, durante a primeira sessão de *probe trial*, o tempo de retenção obtido refere-se a uma memória espacial recém- adquirida (ao longo dos 7 dias experimentais); enquanto a segunda sessão de *probe trial* mede o tempo de retenção de uma memória remotamente adquirida (há 30 dias).

2.5.2. Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos (TRO) é um paradigma comportamental que avalia a memória de reconhecimento e está entre os testes comportamentais mais usados com roedores (LEGER et al., 2013). Nesse teste, os animais são individualmente apresentado à dois objetos semelhantes durante a primeira sessão e, em seguida, um dos dois objetos é substituído por um novo objeto durante uma segunda sessão. A quantidade de tempo necessária para explorar o novo objeto fornece um índice de memória de reconhecimento (LEGER et al., 2013). Esse teste não requer estímulos reforçadores, bem como não baseia-se em aversões inatas, fundamenta-se puramente baseado na preferência inata que roedores de explorarem um novo objeto ao invés de algo familiar (LEGER et al., 2013). Assim, espera-se que um roedor que se lembra do objeto familiar passará mais tempo explorando o novo.

Para realização do mesmo, foi utilizada uma caixa quadrada de campo aberto para ratos (60 x 60 x 60 cm – Insight, ribeirão Preto, SP), tendo sua base dividida em 16 quadrantes por quatro linhas que se inter cruzam. Nesse contexto, os animais foram habituados e expostos a dois tipo de objetos idênticos : (i) garrafas PET (politereftalato de etileno – 330 ml) preenchidas com areia; ou (ii) colunas montadas com peças de lego; seguindo as sugestões do protocolo publicado na *Nature Protocols* (LEGER et al., 2013 – Figura 7).

Figura 7. Fotografia de dois objetos empregados no teste de reconhecimento de objeto. A imagem mostra uma torre de peças de Lego e uma garrafa Falcon de cultura de tecido preenchida com areia. Durante a fase de familiarização grupos de animais foram apresentado a duas garrafas idênticas outros. A dois blocos de lego idêntico. Na etapa de teste os mesmo foram substituídos por um novo objeto de acordo com o grupo em questão.

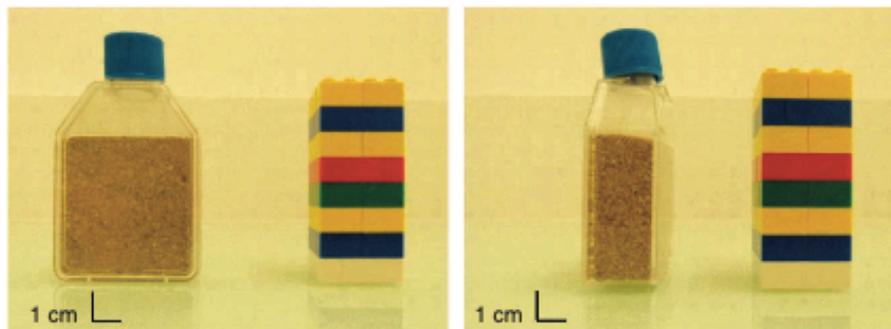


Imagem retirada do artigo “*Object recognition test in mice*” de Leger e colaboradores (*Nature Protocols* – 2013).

Inicialmente, o animal foi apresentado a dois objetos idênticos durante uma primeira sessão (fase de familiarização). Posteriormente, um dos objetos apresentados foi substituído por um novo durante a segunda exposição (teste de reconhecimento).

O protocolo consiste de três etapas, descritas a seguir:

- Habituação (dias 1 a 3): Os animais foram, individualmente, posicionados no campo aberto com a face voltada para a parede do aparato mais próxima ao experimentador. Foi permitido que explorassem o aparato por 5 minutos. Encerrada a sessão, o animal era acomodado em uma caixa moradia provisória até que todos os moradores de sua caixa completassem a tarefa e retornassem a sua caixa moradia original. O aparato foi limpo com álcool etílico 20% e seco com papel toalha entre cada sessão. Cada indivíduo passou por duas sessões diárias de habituação, com intervalo de 6 horas entre elas. As sessões foram gravadas e analisadas posteriormente com auxílio do “X-plo-rat 2005”, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Morato na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP (to software pode ser adquirido livremente em: <http://www.oocities.org/xplorat/>), quantificando comportamentos exploratórios, a fim de avaliar possíveis prejuízos locomotores. Foram quantificadas: frequência de entrada nos quadrantes do aparato, frequência de levantamento e tempo em segundos realizando comportamento de autolimpeza.

- Familiarização (dia 4): Essa etapa do protocolo foi realizada 24 horas após a última habituação ao aparato. Antes do início de cada sessão, foram posicionados dois objetos

idênticos no campo aberto, com 5 cm de distância das paredes. Os animais foram expostos aleatoriamente aos pares de objetos idênticos (alguns animais se familiarizaram com as garrafas e outros com os blocos de lego). Após o posicionamento dos objetos, os indivíduos foram introduzidos no aparato com sua face voltada para a direção oposta dos objetos (voltada para a parede da caixa). Neste momento era iniciado um cronômetro para quantificar o tempo que os animais levava para explorar cada um dos objetos por 20 segundos. Foi permitido que o animal explorasse livremente. Um segundo cronômetro equipado com dois canais de registro, foi utilizado para quantificar o tempo que o animal explorava cada um dos objetos até que atingisse o critério de 20 segundos por objeto. A sessão era finalizada quando atingido o tempo de exploração de 20 segundos para cada objeto exposto, ou após 10 minutos de sessão (o que ocorresse primeiro). Foi considerada exploração, quando o indivíduo dirigia seu focinho/nariz para o objeto a uma distância máxima de 2 cm e/ou tocasse o objeto enquanto olhava para o mesmo. Foi realizada uma única exposição aos objetos e o aparato. Os objetos e aparato eram cuidadosamente higienizados com álcool etílico 20% para excluir qualquer tipo de estímulo odorífero.

- Teste de reconhecimento (dia 5): No dia seguinte à sessão de familiarização, os animais realizavam o teste de reconhecimento de objetos. Indivíduos que passaram pela familiarização com as garrafas tiveram uma das garrafas substituídas por um bloco de lego; e os familiarizados com os blocos de lego, tiveram um deles substituídos por uma garrafa. Os objetos eram posicionados no aparato de maneira variável (direita e esquerda) entre cada animal e grupo testado para evitar qualquer tipo de viés experimental. O procedimento experimental empregado nessa etapa foi o mesmo realizado durante a etapa de familiarização

2.5.3. *Labirinto em T forçado*

O labirinto em “T” trata-se de um método simples para avaliação de memória espacial (SHARMA et al., 2010). O aparato utilizado trata-se de um labirinto em cruz aberta, em que, durante os testes, apenas três de seus braços estavam de fato acessíveis aos animais, pois um dos braços era fechado, de maneira que o aparato passava a assumir a forma e funcionalidade de um labirinto em “T”.

O aparato é composto por quatro braços (norte, sul, leste e oeste), os quais apresentam dimensões de 50 x 9 cm e se encontra elevado em relação ao solo por uma haste com 50 cm de altura. A tarefa baseia-se em uma aprendizagem com reforço positivo, uma vez

que é oferecido ao animal reforço alimentar em um dos braços do labirinto. A recompensa alimentar utilizada consiste em um pellet doce, palatável (cereal *Frootloops* – Kellogg's®) aos animais e previamente apresentado durante as sessões de manejo e habituação ao experimentador para evitar o estresse da novidade. A localização da recompensa alimentar foi padronizada para o final do braço oeste para alguns animais e final do braço leste para outros, de maneira a evitar vieses experimentais. Enquanto que nos braços opostos, os animais encontravam o alimento inacessível cerrado em um comedouro. Assim como descrito para o LAM (item 3.5.1.), o labirinto foi acomodado na mesma sala experimental com as mesmas pistas visuais descritas previamente.

Ao final das sessões de treino/teste, o aparato era higienizado com álcool etílico 20% e seco com papel toalha para eliminar possíveis pistas olfativas que pudessem permanecer no labirinto. Antes do início dos treinos espaciais no labirinto, os animais passaram por uma redução na oferta de alimento, de maneira que os animais atingissem o peso equivalente a 85% do que pesavam originalmente e foi mantido assim durante todo período de experimentação no labirinto em T. Tomando como base estudos anteriores (PACKARD, 1999), os animais atingiram o peso almejado em um período de sete dias (que correspondia ao intervalo adotado entre a finalização do TRO e início do labirinto em T). A restrição da dieta é um estresse essencial para a motivação por busca por alimento, necessária para que a presença de alimento no final do braço seja um estímulo reforçador, caracterizando o teste como uma tarefa de aprendizado reforçado. Assim como descrito anteriormente, os animais passaram por um período de cinco dias de habituação à manipulação do experimentador, antes de ser exposto ao aparato.

O protocolo experimental adotado consiste em 2 etapas que foram realizadas ao longo de 15 dias de experimentos e estão descritas a seguir:

- Habituação ao aparato (dias de 1 a 3): Os três primeiros dias do procedimento experimental foram de habituação ao aparato metodológico. Assim, foi permitido que os animais explorassem o labirinto por cinco minutos durante uma sessão de habituação, sem oferta alguma de alimento no labirinto. Foram realizadas duas sessões diárias com intervalo de 4 horas entre elas. O acesso ao braço norte do labirinto em cruz era bloqueado durante a habituação e subsequentes treinos com recompensa alimentar (Figura 6). Após cada sessão de habituação ao experimentador e ao labirinto, foi dado um *pellet* do alimento reforçador ao animal em sua caixa moradia e o animal era observado até que

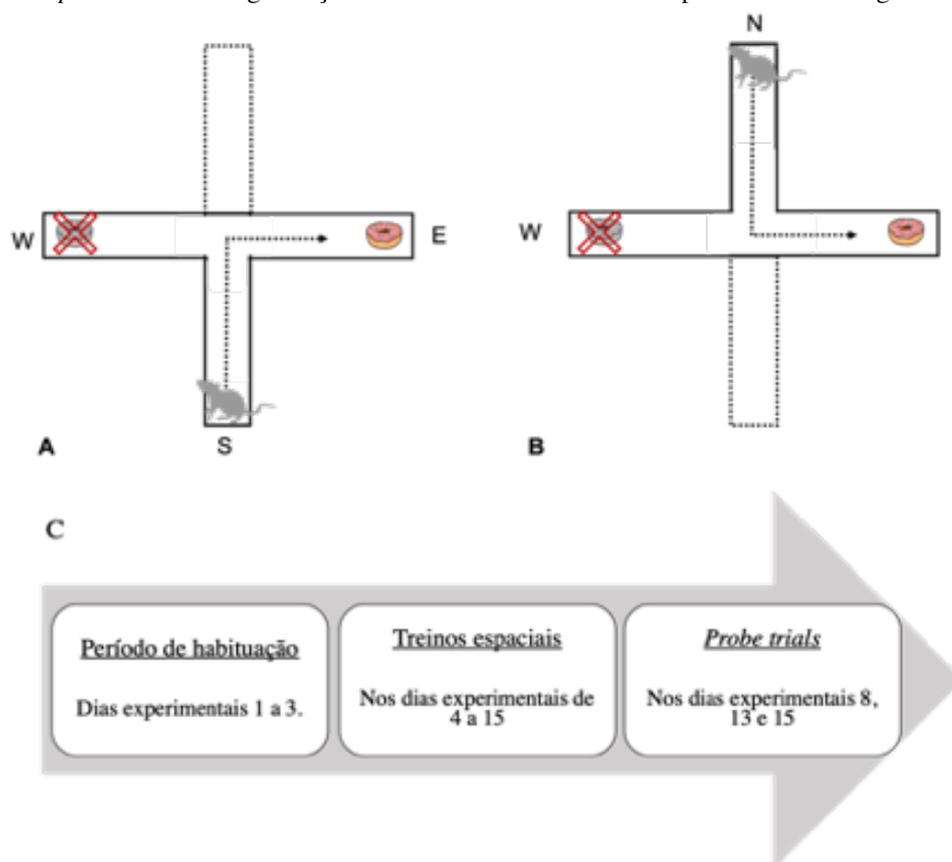
comesse o alimento, para garantir que todos estivessem igualmente habituados à recompensa. O labirinto era higienizado com álcool etílico 20% após cada exposição de animais.

- Treinos (dias 4 a 15): Os treinos espaciais começavam efetivamente no quarto dia experimental do protocolo do labirinto em T. Para cada treino, os ratos eram colocados na caixa de início (localizada no braço sul) e podiam atravessar o labirinto e consumir um único pellet localizado no copo de alimentos no final do braço oeste ou leste, dependendo do grupo a que pertencia. Cada animal foi submetido a cinco treinos com recompensa alimentar por dia. Os treinos eram realizados durante 12 dias consecutivos, dessa forma, cada animal passou por 60 treinos espaciais. Todos os treinos foram filmados para posterior análise comportamental. Entradas no braço desprovido de recompensa alimentar foram classificadas como respostas incorretas durante o treinamento dos animais, e as entradas no braço contendo a recompensa alimentar foram classificadas como respostas corretas. Foi adotado um procedimento de correção durante os treinos espaciais; os animais que optassem pelo braço “incorreto” poderiam explorar o labirinto, seguir de volta para o braço “correto” e consumir o pellet de alimento. Caso o animal não consumisse o alimento dentro do intervalo de um minuto, o treino era encerrado. Depois de cada treino, os animais eram colocados em uma caixa localizada fora do labirinto e logo atrás da caixa de início (isto é, braço sul) durante um intervalo de 30 segundos, para depois então, dar início a tentativa subsequente.

Além das 60 sessões de treinamento, os animais passaram por testes espaciais (*probe trials*), os quais foram realizados no 8º, 13º e 15º experimental do labirinto em T. Nesses dias experimentais os animais passaram pelos treinos espaciais previamente descritos e 30 minutos após a finalização da última bateria diárias, eram submetidos ao *probe trial*. Durante esses testes (*probes*), a entrada dos animais no labirinto era alterada. Nos treinos espaciais o braço de início era sempre o sul, ao passo que durante os testes, os animais tinham acesso ao labirinto pelo braço norte enquanto o braço sul permanecia inacessível aos mesmos (Figura 8A). Os animais que optavam pelo braço que continha alimento acessível durante os testes foram denominados “*place learners*” (ou seja, animais que se dirigem ao braço que durante os treinos tinha comida por adotarem estratégia de navegação aloentríca – baseada em pistas espaciais), e os que optavam pelo braço com alimento inacessível foram denominados “*response learners*” (animais que realizam o

mesmo movimento corporal que exibiam durante os treinos por adotarem uma estratégia de navegação egocêntrica – baseada em pistas ou movimentos corpóreos). Foram calculadas médias das escolhas denominadas “incorretas” para cada grupo durante os treinos e feita uma curva de aprendizado ao longo dos treinos, também foi calculada a percentagem de animais classificados como “*place learners*” e “*response learners*” em cada grupo experimental (Figura 8B).

Figura 8. Representações esquemáticas do protocolo adotado no labirinto em T. A imagem 8A apresenta o arranjo do aparato durante os treinos espaciais. A figura 8B indica o arranjo experimental durante os *probe trials*. A organização do teste como um todo está representado na imagem 8C.



Da autora.

2.6. Histologia

Ao final do protocolo comportamental (assim que finalizada a segunda sessão de *probe trial* no 38º dia experimental), os animais foram eutanaziados com uma overdose de anestésico (tiopental sódico – 120mg/kg intraperitoneal). Uma vez constatado que os animais não respondiam mais aos estímulos externos (estimulação mecânica dos membros e cauda) iniciava-se o procedimento de perfusão intra-cardíaca. Uma solução

de PBS foi perfundida pelo ventrículo cardíaco esquerdo dos animais, na sequência a solução de PBS foi substituída por uma solução de paraformaldeído 4% (LabSynth®, Diadema - SP) utilizando uma bomba de perfusão (Bonther, Ribeirão Preto, SP). Após a perfusão de 200ml de paraformaldeído, os animais eram decapitados com auxílio de uma guilhotina para roedores (Insight®, Ribeirão Preto - SP) e seus encéfalos eram removidos e armazenados em na mesma solução de paraformaldeído usada na perfusão e ali permaneciam por 24 horas. Os encéfalos foram então lavados em PBS três vezes e armazenados em uma solução crio-protetora (3g glicose, 3ml de etileno-glicose e 10 ml de PBS – 7,4 pH) em freezer -20°C.

O tecido passou por uma sequência de desidratação em álcoois etílicos (70% - 80% - 90% - absoluto) e foram inclusos em parafina para confecção dos cortes em micrótomo (Leica Byossystems, IL - USA). O tecido foi então corado usando a técnica de violeta cresil (ANEXO 1). Os sítios de injeção foram verificados tendo como referência o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS E WATSON, 2005). Dados de animais com lesão fora do sítio específico para o HPCv foram excluídos da amostra.

2.7. Análise estatística

Todas as análises estatísticas referente a esse experimento foram realizadas por meio do *software Prism* (StatSoft Inc, Tulsa, OK – USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Dados referentes as médias gerais de latência de escape e dos *probe trials* (1 e 2) no LAM foram submetidos a ANOVA *one way* de medidas repetidas e ao procedimento de Benjamini, Krieger e Yekutielle (BKY) quando ANOVA indicava diferenças. As médias diárias de ;latência de escape nesse mesmo protocolo foram submetidas a ANOVA *two ways* (fator 1= tratamento experimental; fator 2 = tempo de treino). Em relação ao teste de reconhecimento de objetos, os dados referentes a etapa de familiarização e ao teste de reconhecimento propriamente dito foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis; enquanto os dados de critério de conclusão da prova (familiarização e teste) foram analisados por meio de ANOVA *one way* de medidas repetidas. Todos os dados de comportamentos locomotores/ exploratórios (frequência de entradas e levantamento e tempo realizando *grooming*) foram analisados por meio de ANOVA *one way*. Por fim, os dados referentes ao labirinto em T forçado foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis (média de porcentagem de acertos nos treinos espaciais e porcentagem média de animais classificados como *place learners* nos

probes trials); enquanto que as médias diárias de porcentagem de acertos foram organizados em formato de curva de aprendizagem e analisados por meio de ANOVA *two ways* (fator 1= tratamento experimental; fator 2 = tempo de treino).

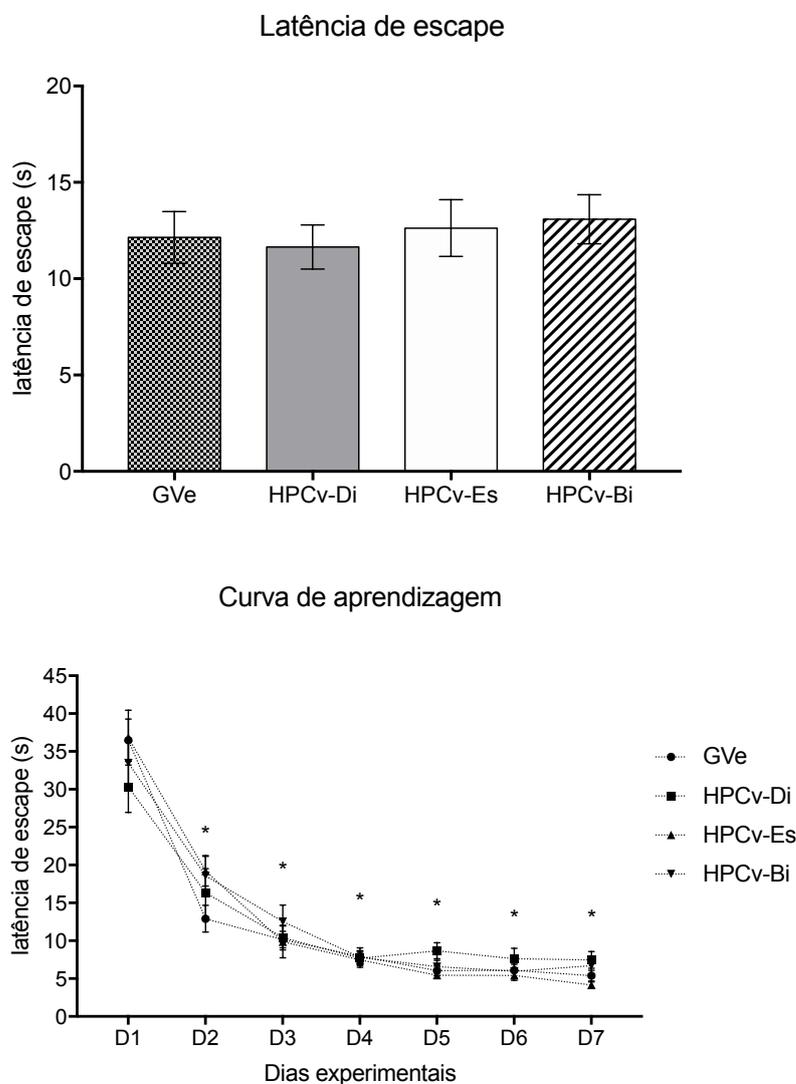
3. RESULTADOS

3.1. Labirinto Aquático de Morris

ANOVA *one way* de medidas repetidas indicou ausência de efeito entre os grupos experimentais quando comparada a média de latência de escape obtida ao longo dos 60 treinos espaciais ($F_{(3,276)}=0,22$; $P=0,59$). Tendo os grupos obtido os seguintes valores médios: GVe= $12,2 \pm 1,3$; HPCv-Di= $11,7 \pm 1,2$; HPCv-Es= $12,6 \pm 1,5$ e HPCv-Bi= $13,1 \pm 1,3$ (Figura 9).

Os mesmos dados de latência de escape foram analisado sob a construção de uma curva de aprendizagem, a qual leva em consideração as médias diárias de latência de escape para cada grupo experimental. Assim, ANOVA *two ways* (sendo o fator 1: tratamento experimental e fator 2: tempo experimental) indicou efeito para o fator tempo ($F_{(6,216)}= 151,4$; $P<0,0001$). Enquanto para o fator tratamento não foi observado efeito solo ($F_{(3,36)}= 0,17$; $P=0,92$), bem como efeito ausente para interação entre os fatores ($F_{(18,216)}=1,34$; $P=0,17$). A partir do segundo dia experimental (D2), todos os grupos apresentaram latências de escape médias diária estatisticamente inferiores às médias do primeiro dia experimental (D1) e assim sustentaram até o último dia de treino espacial no LAM (D7).

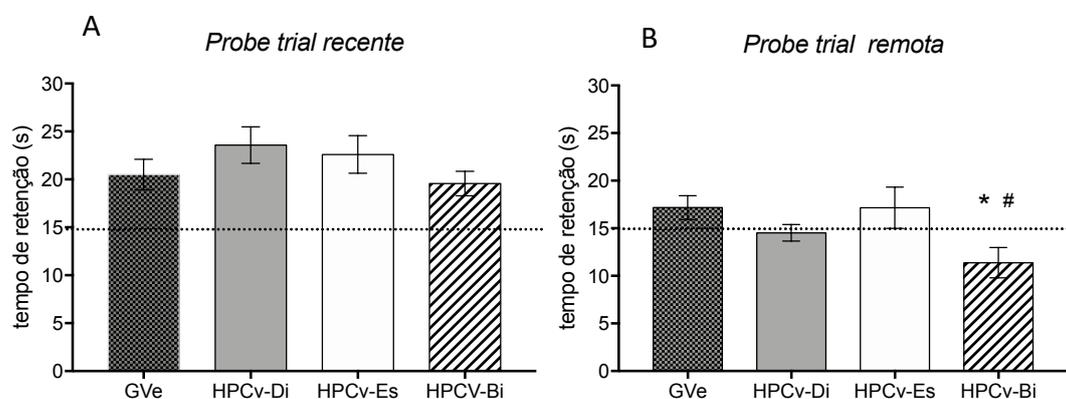
Figura 9. Treinos espaciais. A figura 9A apresenta a média de tempo (s) que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa (latência de escape) durante os 30 treinos espaciais realizados no Labirinto Aquático de Morris. As barras representam a média \pm E.P.M. $N=9$ por grupo experimental. ANOVA *one way* de medidas repetidas. A figura 9B apresenta a média diária de tempo que os animais levaram para localizar a plataforma submersa. Cada ponto representa média diária \pm E.P.M. $N=9$ por grupo experimental. ANOVA *two ways* seguida pelo procedimento de Benjamini, Krieger e Yekutieli (BKY). *representa $P<0,005$ comparado a. média do primeiro dia experimental (D1) para cada grupo.



Os dados de tempo de retenção, obtidos durante as duas sessões de *probe trials* (no 8º e no 38º dia experimental) foram analisados separadamente, gerando dois gráficos (Figura 10A e Figura 10B). Para o *probe trial 1* (8º dia experimental), ANOVA *one way* indicou ausência de efeitos entre os grupos experimentais ($F_{(3,33)}=0,44$; $P=0,73$); sendo que os grupos experimentais apresentaram as seguintes médias de tempo sobrenadando sobre o quadrante que continha a plataforma previamente: GVe= $20,5 \pm 1,6$; HPCv-Di= $22,6 \pm 2$; HPCv-Es= $23,6 \pm 1,9$ e HPCv-Bi= $19,6 \pm 1,3$). Enquanto que para o *probe trial 2*, a mesma análise indicou diferenças entre os grupos experimentais ($F_{(3,33)}= 2,94$; $P= 0,047$);

a qual foi confirmada pelo procedimento de Benjamini, Kierger e Yekitiele (BKY), indicando que HPCv-Bi apresentou média de tempo de retenção ($11,4 \pm 1,6$) significativamente menor do que GVe ($17,2 \pm 1,2$; $P= 0,032$) e HPCv-Es ($17,2 \pm 2,2$; $P=0,32$); enquanto não diferiu de HPCv-Di ($14,5 \pm 0,8$; $P=0,22$).

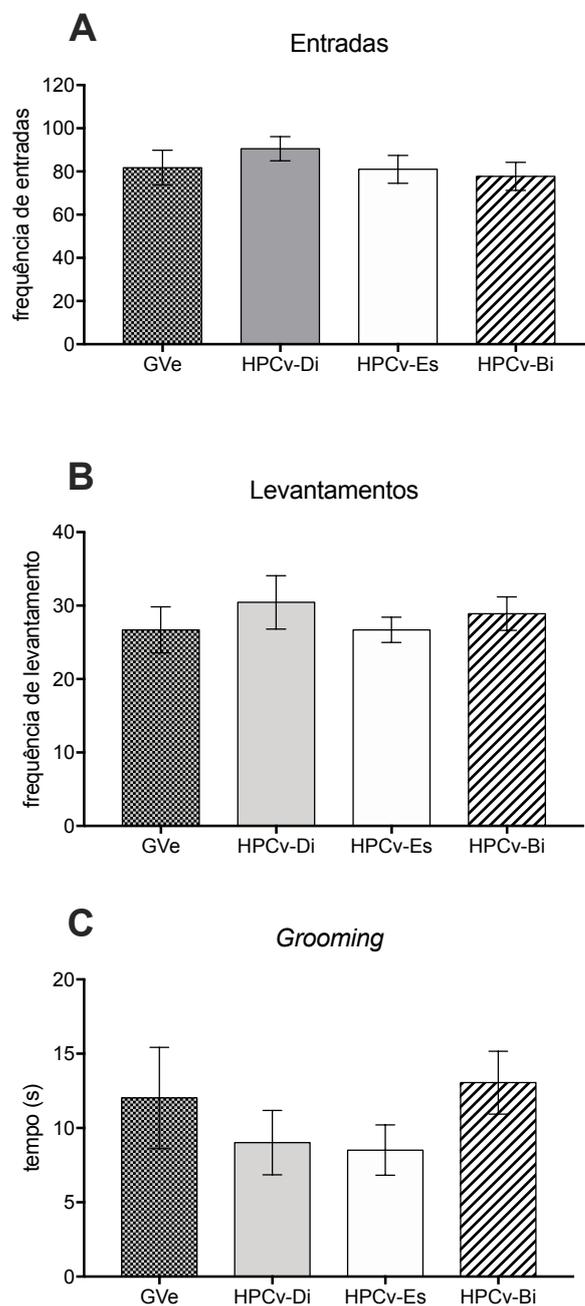
Figura 10. Tempo de retenção nos *probe trials*. Os gráficos apresentam o tempo médio que os animais passaram nadando sobre o quadrante que continha a plataforma submersa durante os treinos espaciais no Labirinto Aquático de Morris. Figura 10A apresenta os dados obtidos no primeiro *probe trial*, realizado no 8º dia experimental. Figura 10B apresenta os dados oriundos do segundo *probe trial* realizado no 38º dia experimental. As barras representam a média de tempo \pm E.P.M. $N=9$ por grupo experimental. * representa $P<0,005$ compara ao GVe e # representa $P<0,005$ comparado a HPCv-Es. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. As linhas pontilhadas indicam o tempo de natação ao acaso (25% ou 15 segundos).



3.2. Teste de Reconhecimento de Objetos

Durante a primeira sessão de habituação ao aparato experimental, os comportamentos exploratórios dos animais foram filmados para posterior análise que produziu os resultados apresentados na figura 11. Todos os parâmetros exploratórios; frequência de entrada (figura 11A), frequência de levantamentos (figura 11B) e tempo realizando *grooming* (figura 11C) foram analisados por meio de ANOVA *one way*, a qual indicou ausência de efeito entre os grupos experimentais para todos os parâmetros ($F_{(3,36)}= 0,62$; $P= 0,61$), ($F_{(3,36)}=0,43$; $P=0,73$) e ($F_{(3,36)}= 0,85$; $P=0,47$); respectivamente.

Figura 11. Parâmetros locomotores e exploratórios. A figura 11A apresenta a frequência total de entradas nos quadrantes do aparato de campo aberto durante a primeira sessão de habituação dos animais. A figura 11B apresenta a frequência média de levantamentos no aparato de campo aberto. A figura 11C apresenta o tempo médio que os animais passaram realizando o comportamento de *grooming* durante a habituação ao campo aberto. As barras representam a média de frequência tempo \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *one way* ordinária.



Em relação aos dados obtidos durante a sessão de familiarização (figura 12A), os mesmos foram analisados por meio de Kruskal-Wallis que indicou ausência de efeito entre os grupos para o tempo explorando ambos objetos idênticos ($H_1=4,3$; $P=0,77$). As médias apresentadas pelos grupos estão sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1. Média de tempo explorando objetos idênticos durante a sessão de familiarização no teste de reconhecimento de objetos.

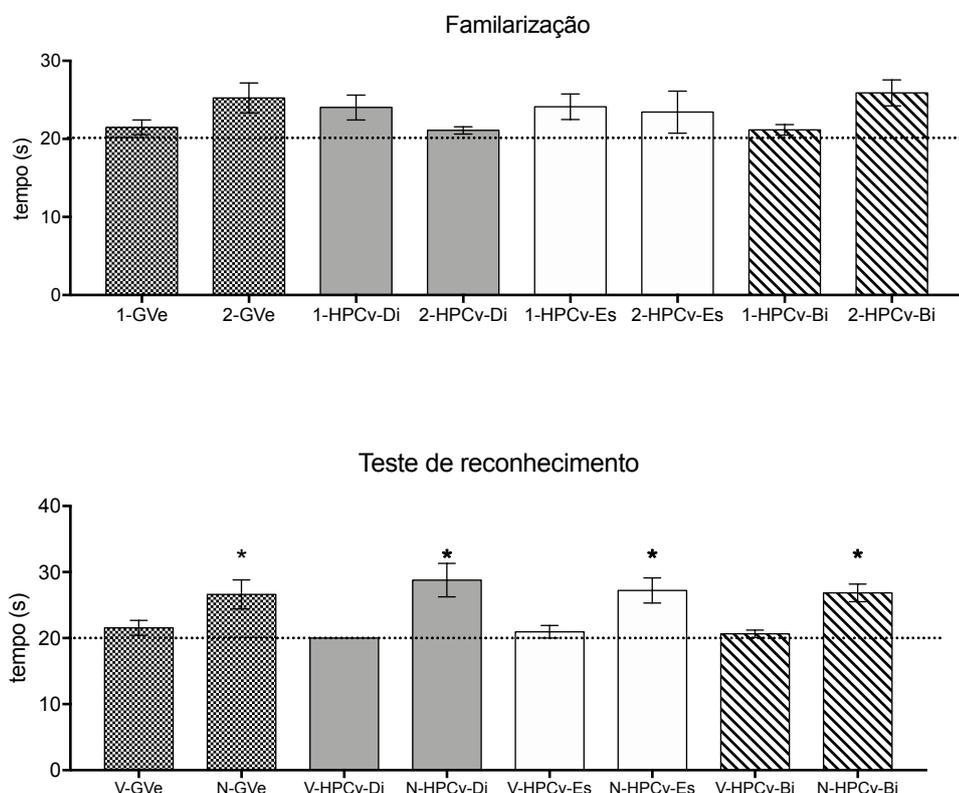
Grupo Experimental	Objeto 1	Objeto 2	Valor de P
GVe	23,0 ± 1,3	23,7 ± 1,9	0,9
Grupo HPCv-Di	24,0 ± 1,6	21,1 ± 0,5	0,2
Grupo HPCv-Es	24,1 ± 1,6	23,4 ± 2,7	0,2
Grupo HPCv-Bi	23,2 ± 1,5	23,8 ± 1,5	0,6

A figura 12B apresenta os dados obtidos no teste de reconhecimento de objetos, analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis, o qual indicou diferenças significativas ($H_1 = 40,5$; $P < 0,0001$). O procedimento de BKY apontou que o tempo explorando o objeto novo e velho foi diferente para todos os grupos experimentais (tabela 2).

Tabela 2. Tempo médio explorando o objeto velho (previamente apresentado na sessão de familiarização) e o objeto novo (apresentado no teste de reconhecimento de objeto).

Grupo Experimental	Objeto Velho	Objeto Novo	Valor de P
GVe	21,5 ± 1,1	26,6 ± 2,2	0,013
Grupo HPCv-Di	20,0 ± 0,0	28,8 ± 2,5	0,001
Grupo HPCv-Es	20,9 ± 0,9	27,2 ± 1,9	0,022
Grupo HPCv-Bi	20,64 ± 0,6	26,9 ± 1,3	0,022

Figura 12. Teste de reconhecimento de objetos. A figura 12A apresenta o tempo em segundos que os animais passaram explorando os objetos idênticos (1 e 2) apresentados durante a etapa de familiarização. A figura 12B apresenta a média de tempo (s) que os animais passaram explorando o objeto com o qual foram familiarizados (velho – V) e o novo objeto (N) apresentado durante o teste de reconhecimento. As barras representam a média de tempo \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P < 0,005$ compara ao tempo explorando o objeto velho de cada grupo. A linha pontilhada representa o tempo mínimo de 20 segundos estipulado para explorar cada objeto.



Em relação ao critério para finalização das sessões de familiarização e reconhecimento, ANOVA *one way* de medidas repetidas indicou ausência de efeito entre os grupos ($F_{(7,72)}=0,67$; $P=0,7$ – Tabela 3).

Tabela 3. Tempo médio (em segundos) que os animais levaram para atingir o critério da tarefa.

Grupo Experimental	Familiarização	Teste de reconhecimento
Grupo Veículo	227 \pm 31,9	424 \pm 32,0
Grupo HPCv-Di	187 \pm 19,2	258 \pm 42,0
Grupo HPCv-Es	196 \pm 17,6	198 \pm 35,8
Grupo HPCv-Bi	219 \pm 28,3	233 \pm 22,7

3.3. Labirinto em T forçado

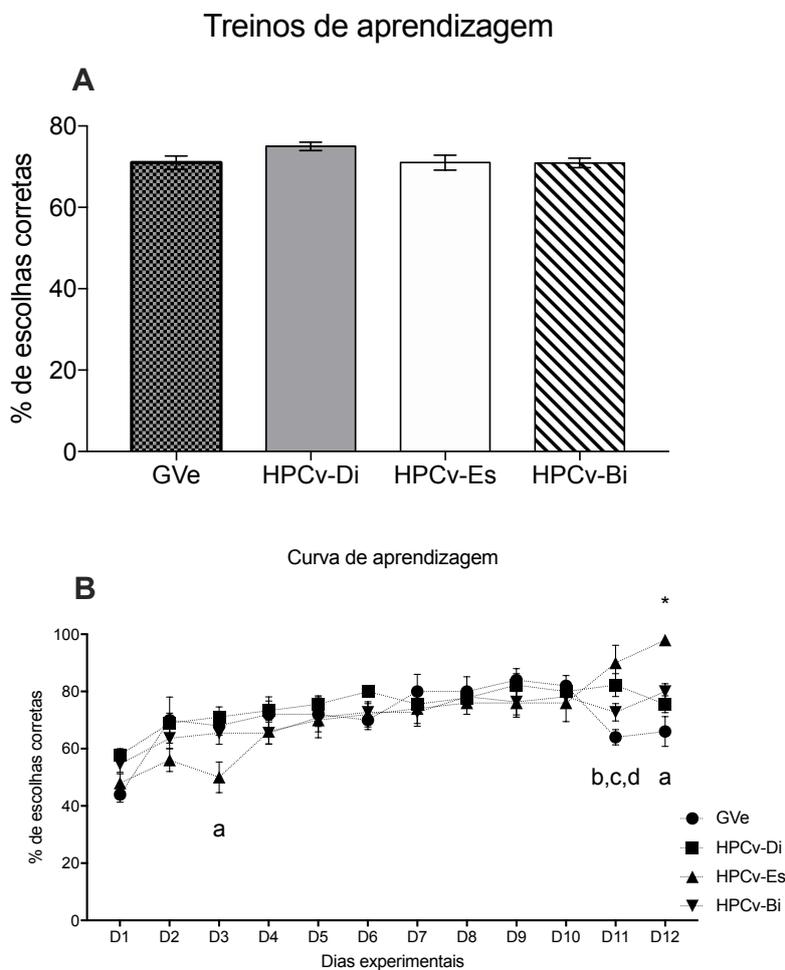
Os dados de treinos espaciais estão apresentados na figura 13. O teste de Kruskal-Wallis indicou ausência de efeito quando comparada a média de porcentagem de acertos ao longo do 60 treinos espaciais ($H_1 = 5,93$; $P = 0,12$ – Figura 13A); sendo que a média de acertos por grupo foram as seguintes: $GVe = 71 \pm 1,7$; $HPCv-Di = 75 \pm 1,0$; $HPCv-Es = 71 \pm 1,9$ e $HPCv-Bi = 71 \pm 1,2$. Os mesmo dados de % de escolhas corretos foram utilizados para construir uma curva de aprendizagem, que leva em consideração a média diária de acertos de cada grupo experimental (figura 13B). ANOVA *two ways* (fator 1 – tratamento experimental e fator 2 – tempo experimental) indicou efeito para o fator tempo ($F_{(11,396)} = 20,6$; $P < 0,0001$) e interação entre os fatores ($F_{(33,396)} = 3,2$; $P < 0,0001$); enquanto que o fator tratamento *per se* não apresentou efeito ($F_{(3,36)} = 0,85$; $P = 0,47$). Em relação ao fator tempo, todos os grupos experimentais apresentaram média de % de acertos significativamente maiores no último dia de treino espacial (D12) comparado ao primeiro (D1 – tabela 4).

Tabela 4. Média de porcentagem de escolhas corretas (entradas nos braços com alimento disponível) durante os 60 treinos espaciais no labirinto em T forçado.

Grupo Experimental	D1	D12	Valor de P
GVe	44%	66%	<0,0001
Grupo HPCv-Di	57,8%	75,6%	0,008
Grupo HPCv-Es	56%	98%	<0,0001
Grupo HPCv-Bi	54,5%	80%	<0,0001

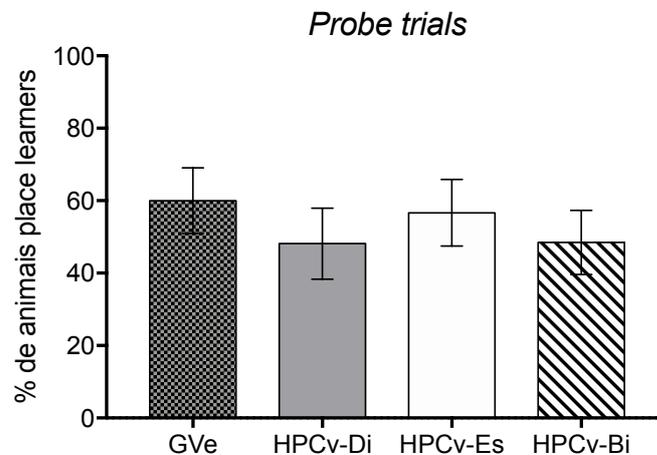
O procedimento de BKY indicou que, em relação a interação apontada entre o fator tempo e tratamento, os efeitos surgem no 3º, 11º e 12º dias experimentais. No D3 o grupo HPCv-Es apresentou média de acertos (50%) significativamente menor do que o GVe (68%), HPCv-Di (71,1%) e HPCv-Bi (65,5%). No D11, o GVe (64%) diferiu de HPCv-Di (82,2%) e HPCv-Es (90%); enquanto HPCv-Es e HPCv-Bi também diferiram entre si (90% e 72,7%, respectivamente. Por fim, no D12 o grupo HPCv-Es (98%) diferiu de todos os demais (GVe – 66%; HPCv-Di – 75,6% e HPCv-Bi – 80%).

Figura 13. Treinos espaciais. A figura 13A apresenta a % média de escolhas corretas (entradas no braço com alimento acessível) realizadas ao longo dos 60 treinos espaciais no labirinto em T forçado. Cada barra representa a % média total de escolhas corretas \pm E.P.M, $n=9$ por grupo. ANOVA *one way* de medidas repetidas. A figura 13B apresenta a média diária de % de escolhas corretas em uma curva de aprendizagem. Cada ponto representa a média de % correta realizada ao longo dos 5 treinos diários \pm E.P.M, $n=9$ por grupo. ANOVA *two ways* seguida pelo procedimento de BKY. (a) representa $P<0,005$ que o grupo HPCv-Es diferiu de todos os demais nesse mesmo dia; (b) representa $p<0,005$ entre GVe e HPCv-Es; (c) representa $P<0,005$ entre GVe e HPCv-Es; (d) representa $P<0,005$ entre HPCv-Di e HPCv-Es; e * representa $P<0,005$ comparada a média do D1 para cada grupo experimental.



Em relação a estratégia de navegação dos animais no labirinto em T forçado, os dados referente ao número de animais classificados como *place learners* está apresentado na figura 14. O teste de Kruskal-Wallis indicou ausência de efeito entre os grupos ($H_1=1,3$; $P=0,74$), sendo a porcentagem média de animais *place learners* para cada grupo: GVe= $60,0 \pm 9,1\%$; HPCv-Di= $48,2 \pm 9,8\%$; HPCv-Es= $56,7 \pm 9,2\%$ e HPCv-Bi= $48,5 \pm 8,8\%$ (Figura 13).

Figura 14. Probe trials no labirinto em T forçado. A imagem apresenta a porcentagem média de animais classificados como *place learners* durante os três *probe trials* realizados ao longo do protocolo. Cada barra representa a porcentagem média de animais *place learners* \pm E.P.M, n=9 por grupo. ANOVA *one way* de medidas repetidas.



4. DISCUSSÃO

Os dados referentes ao LAM indicaram que os grupos experimentais obtiveram média de latência de escape muito similares; assim, independente da lesão no hipocampo ventral, os animais puderam aprender essa tarefa espacial sem prejuízos.

Ainda sobre os dados de latência espacial, foi possível observar que, independente da lesão hipocampal, os animais de fato aprenderam a tarefa espacial, uma vez que a média de tempo para encontrar a plataforma no último o dia experimental (D7) foi significativamente menor para todos os grupos quando comparada a seu desempenho no primeiro dia experimental (D1).

Testes comportamentais de navegação espacial são ferramentas muito esclarecedoras sobre o papel e envolvimento do hipocampo nesse contexto; como é o caso do LAM (Morris 1981), tarefa que claramente demanda do HPCd durante a aprendizagem e modulação da memória espaciais (MOSER et al., 1995; FANSELOW E DONG, 2010). Lesões abrangendo até 25% dessa região prejudicou a aquisição da tarefa, enquanto que lesões adicionais envolvendo o HPCv não exacerbaram esse prejuízo (MOSER et al., 1995). Somando-se a essas evidências, Jung e colaboradores (1994) descreveram que o HPCd possui uma densidade consideravelmente maior de *place cells* do que no HPCv.

De fato, muitos estudos comportamentais corroboram essas preditivas; Pothuizen e colaboradores (2004) observaram que lesões no HPCd prejudicavam o desempenhos dos

animais em tarefas espaciais, enquanto animais com lesão no HPCv tinham desempenho similar ao dos grupos controle. Dados similares foram encontrados por Olsen e colaboradores (1994), observaram que perda neuronal por isquemia induzida prejudicava a aquisição e evocação de informações espaciais quando essa lesão estava localizada no HPCd. Bannerman e colaboradores (1999), observaram que lesões excitotóxicas no eixo hipocampal como um todo (abrangendo porção ventral e dorsal) causava prejuízo em duas tarefas espaciais (LAM e labirinto em T); o mesmo perfil de prejuízo foi observado quando a lesão era restrita ao HPCd, entretanto nenhum prejuízo foi observado quando a lesão abrangia apenas a porção ventral da estrutura em questão.

Já os estudos que avaliam respostas ao estresse ao invés de cognição, como o de Henke (1990) comumente descrevem que lesões no HPCv, mas não no HPCd reduzem o número de ulcerações induzidas por estresse térmico ou de restrição. Kjelstrup e colaboradores (2002) observaram que lesões na porção ventral do hipocampo aumentou o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e reduziu o número de bolos fecais na câmara clara no teste de preferéncia claro/escuro, acompanhado ainda de uma redução dos níveis plasmáticos de corticosterona. Em relação aos processos mnemônicos, Hobin e colaboradores (2006) destacaram a importância do HPCv na evocação de memórias aversivas condicionadas a um contexto aversivo, uma vez que inativação transiente dessa região por meio da administração de muscimol aboliu a evocação de memórias aversivas quando o animal era re-exposto ao contexto onde o condicionamento ocorreu.

Anatomicamente, o HPCv possui conexões extensas e recíprocas com a amígdala (PITKÄNEN et al., 1997; PITKANEN et al., 2000;) e a maior parte das projeções originadas no hipocampo para o núcleo amigdalóide derivam majoritariamente da porção ventral do HPC ao invés da dorsal (PITKANEN et al., 2000). Considerando a vasta quantidade de trabalhos que evidenciam que a amígdala é uma estrutura essencialmente envolvida nos efeitos do estresse na memória (MCGAUGH E ROOZENDAAL, 2002; ROOZENDAAL et al., 2009), somando-se aos estudos previamente apresentados, é possível constatar o grande envolvimento do HPCv em aspectos mais emocionais da memória e nas respostas ao estresse; possivelmente justificando a ausência de efeito na latência de escape observada em nosso estudo.

Não obstante, a ideia de que o HPCv não desempenha papel na memória espacial não é ubíqua. Ferbinteanu e colaboradores (2003) demonstraram que lesões restritas tanto a porção ventral quanto dorsal tornaram o processo de aquisição de informações espaciais

mais lento no LAM; sugerindo que todo o eixo hipocampal esteja envolvido na aquisição de informações espaciais. Entretanto, o protocolo empregado trata-se de uma variação do protocolo original, chamado “*match to position*” no qual a posição da plataforma é variável ao longo dos dias; e o déficit observado foi superado após treinos sucessivos. Resultados similares foram encontrados por de Hoz e colaboradores (2003). Lesões excitotóxicas no HPCv normalmente tendem a invadir regiões do HPC dorsal, especialmente a CA3 que é um sítio crítico para retenção das memórias espaciais (HANDELMANN E OLTON, 1981; BRUN et al., 2002; STEFFENACH et al., 2002; LEE E KESNER, 2004; WANG et al., 2012), de fato Broadman e seus colaboradores (2004) relataram que houve invasão de cerca de 20% do tecido hipocampal dorsal na maioria de seus animais; enviando assim as afirmações a respeito do real envolvimento HPCv e memória espacial.

A respeito dos *probe trials*; no primeiro deles, realizado no oitavo dia experimental (D8), foi possível observar que todos os animais apresentaram média de tempo de retenção superior a 15 segundos, ou seja apresentaram preferência pelo quadrante que previamente continha a plataforma submersa, indicando que os animais de fato, lembravam da localização da plataforma aprendida durante os treinos espaciais. Ademais, não foi observada diferença entre os grupos experimentais, sugerindo que o hipocampo ventral parece não ser um sítio essencial para a evocação de memórias espaciais. Curiosamente, quando observamos os dados obtidos no segundo *probe trial* (realizado 30 dias após o primeiro *probe trial*), os grupos tratados com veículo (GVe) e com lesão no hipocampo ventral esquerdo (HPCv-Es) ainda apresentaram média de tempo de retenção superior a quinze segundos de exploração ao acaso; enquanto os grupos com lesão no HPCv direito e com lesão bilateral do mesmo não apresentaram preferência pelo quadrante em questão. E quando comparada o tempo de retenção médio de cada grupo, observou-se que o grupo HPCv-Bi apresentou média inferior aos grupos GVe e HPCv-Es, o que sugere um possível papel seletivo dessa região na evocação de memórias espaciais remotamente adquiridas. Entretanto, tal efeito parece surgir apenas quando ambos os hemis-laterais estão lesionados.

Além das aferências com o núcleo amigdalóide previamente descritas, o HPCv (especificamente as regiões CA1 e subiculum) estabelecem aferências recíprocas com sub-regiões do córtex pré-frontal medial (CPFm), possibilitando que essas regiões formem um *loop* funcional que viabiliza a comunicação entre áreas corticais e subcorticais (VERTES, 2004; CENQUIZCA E SWANSON, 2007; PRESTON E

EICHENBAUM, 2013;). A essa via de conexões dá-se o nome de circuito hipocampo-córtex pré-frontal, no qual ambos HPC e CPFm estão envolvidos com o processamento de memórias declarativas e a comunicação entre essas duas estruturas se faz essencial (JIN; MAREN, 2015). Uma vez comprometida a comunicação entre HPC e CPFm por meio de lesões assimétricas, relatou-se o prejuízo de desempenho de animais em tarefas de memória de trabalho espacial (FLORESCO et al., 1997; CHURCHWELL E KESNER, 2011).

Segundo Marr (1970, 1971), o HPC armazena rapidamente os eventos diários antes de a informação ser transferida para o CPFm para sofrer uma reorganização e reclassificação subsequente. De acordo com seu modelo, as experiências são inicialmente codificadas em paralelo em redes hipocampais e corticais. A reativação subsequente de redes hipocampais leva ao reestabelecimento de atividade em diferentes redes corticais. Essa reativação coordenada por redes hipocampo-corticais leva a um fortalecimento gradual de conexões cortico-corticais, as quais eventualmente permitem que novas memórias se tornem independentes do HPC e que gradualmente se integrem às memórias corticais pré-existentes. Segundo esse modelo, assume-se que as memórias hipocampais tendem a se perder mais rapidamente do que memórias corticais (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). As evidências experimentais apontam para dois possíveis papéis das aferências hipocampais para o CPFm; (i) permitir uma aprendizagem rápida; e/ou (ii) fornecer informações contextuais (EUSTON et al., 2012).

O HPC de fato é reconhecido pela sua capacidade de codificar aspectos espaciais de um contexto via *place cells* (WILSON E MCNAUGHTON, 1993), entretanto a densidade das mesmas é muito menor na porção ventral comparada a dorsal do HPC (JUNG et al., 1994). Dado sua intensa conectividade com estruturas límbicas, é possível que o HPCv seja um sítio responsável por codificar informações não espaciais tais como odor, estado corporais e emoções (PENNARTZ et al., 2011). Apesar de, segundo o modelo previamente descrito do circuito HPC-CPFm, a memória se tornar gradualmente mais independente do HPC e dependente do CPFm; alguns estudos apontam a presença de atividade neurofisiológica sincrônica entre HPC e CPFm tanto durante a aquisição quanto a evocação de memórias. A sincronidade de ondas teta entre o CPFm e HPC aumenta à medida que o animal se aproxima de um ponto de escolha guiado pela memória (JONES E WILSON, 2005; BENCHENANE et al., 2010; FUJISAWA E BUZSÁKI, 2011).

Assim, apesar do conhecido papel do HPC na evocação de memórias recém adquiridas, é possível que não observamos prejuízos no desempenhos dos animais com

lesões uni ou bilaterais do HPCv; pois ainda possuíam seus HPCd intactos e que sabidamente são mais relevantes para o processamento de memórias espaciais do que o HPCv. Entretanto, a evocação prejudicada da memória remota apresentada pelo grupo com lesão bilateral do HPCv pode se dar ao fato de que o HPC ainda se faz um sítio necessário durante a evocação, para que ocorra atividade neuronal sincrônica entre essas regiões.

Os dados sobre comportamentos locomotores e exploratórios, indicaram que não houve diferenças significativas entre os grupo experimentais tanto para frequência de entradas e de levantamento, quanto para tempo realizando *grooming*. Assim é possível inferir que lesões uni ou bilaterais do HPCv não comprometeram a capacidade de locomoção e exploração do animais, eliminando um possível viés metodológico.

Em relação ao teste de reconhecimento de objetos, durante a etapa de familiarização aos objetos idênticos, não foi observada nenhum diferença em relação ao tempo médio de exploração dos objetos para nenhum dos grupos, ou seja, nenhum grupo experimental apresentou preferência por algum dos objetos apresentados, eliminando assim um possível viés metodológico para a sessão de reconhecimento de objetos.

Nenhum efeito do tratamento experimental foi observado durante o teste de reconhecimento propriamente dito. Todos os grupos exploraram o novo objeto apresentado por tempo significativamente maior do que o objeto que já conheciam; assim, o HPCv parece não ser uma porção hipocampal muito relevante para o processamento de memória de reconhecimento. Enquanto o papel do córtex perirrinal parece estar bem consolidado na literatura, indicando que lesões nessa região comprometem severamente a memória de reconhecimento (MUMBY E PINEL, 1994; ENNACEUR et al., 1996; BUSSEY et al., 1999; EACOTT E NORMAN, 2004); o papel do hipocampo na memória de reconhecimento ainda é controverso.

Diversos estudos apontam que lesões hipocampais seletivas prejudicam o processamento de memórias espaciais em humanos (SQUIRE, 1992), macacos (BEASON-HELD et al., 1999;; ZOLA et al., 2000; NEMANIC; ALVARADO et al., 2004) e roedores (CLARK et al., 2000; CLARK et al., 2001; GOULD et al., 2002; PRUSKY et al., 2004); enquanto outros evidenciam que lesões hipocampais não afetam o desempenho dos animais em tarefas que envolvam memória de reconhecimento (MURRAY et al, 1998; HOLDSTOCK et al., 2002; MUMBY et al., 2002). Os estudos envolvendo lesões no hipocampo e sua relação com a memória de reconhecimento são particularmente polarizados; enquanto alguns evidenciam a importância dessa região na

modulação desse tipo de memória (CLARK et al., 2001; GOULD et al., 2002; MOSES et al., 2002), outros ressaltam que lesões nessa região não afetam o desempenho dos animais em tarefas de reconhecimento de objetos (MUMBY et al., 2002; GASKIN et al., 2003; BROADBENT et al., 2004; WINTERS et al., 2004).

Vale ressaltar que em todos esses trabalhos citados, tanto a porção dorsal quanto a ventral do hipocampo eram lesionadas em algum nível. Exceto o trabalho de Broadbent e colaboradores (BROADBENT et al., 2004) em que as porções dorsal e ventral foram lesionadas separadamente e assim evidenciaram que quando a porção ventral do hipocampo era lesionada em 50% de seu volume, nenhum prejuízo era observado na tarefa de reconhecimento de objeto. Corroborando assim, a hipótese aqui levantada de que esse tipo de memória parece ser dependente de outras regiões encefálicas que não o HPCv.

Em relação ao tempo que os animais levaram para atingir o critério de finalização das etapas (familiarização e teste), nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais, tanto durante etapa de familiarização quanto no teste; evidenciando que independente do tratamento experimental, todos os grupos realizaram a tarefa de forma similar; reforçando assim a possibilidade de que o HPCv não seja uma região essencial para a memória de reconhecimento.

Para o labirinto em T forçado, os dados obtidos ao longo dos treinos espaciais foram apresentados sob a forma de porcentagem de acertos, ou seja, porcentagem de entradas no braço que continha alimento disponível. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, de forma que todos adquiriram e desempenharam essa tarefa espacial de maneira muito similar, evidenciando que o HPCv possivelmente não é uma região determinante para aquisição dessa tarefa.

Os mesmos dados foram analisados sob uma curva de aprendizagem, construída a partir das médias diárias de escolhas corretas. Por meio dessa análise constatou-se que todos os grupos experimentais apresentaram médias de acertos maiores no último dia experimental (D12) comparada ao desempenho do primeiro dia (D1). Dessa forma, é possível constatar que independente da lesão hipocampal realizada, todos os grupos puderam adquirir essa tarefa espacial, melhorando seu desempenho ao longo do protocolo. Exceto pelos dias experimentais D3, D11 e D12; o desempenho dos grupos foram equivalentes. No D3, o grupo HPCv-Es apresentou média de acertos significativamente menor do que dos demais grupos experimentais, o que poderia ser interpretado como um possível prejuízo na aquisição dessa tarefa, entretanto no décimo segundo dia experimental (D12) esse mesmo

grupo difere dos demais por apresentar média de acertos superior. Considerando essa evolução de desempenho desse grupo, somado ao fato de que não apresentou desempenho inferior aos demais grupos em nenhum outro dia experimental, é mais parcimonioso assumirmos que o baixo desempenho observado no D3 reflita alguma condição pontual do grupo naquele dia. No décimo primeiro dia experimental (D11), estranhamente, o grupo tratado com veículo (GVe) apresentou média de acertos inferior aos demais grupos experimentais; entretanto tal fato não se repetiu nos demais dias experimentais.

Quanto a estratégia de navegação dos animais no paradigma do labirinto em T forçado, não houve diferença significativa entre os grupos, sendo que todos aprenderam a navegar no paradigma de forma similar. Diante dos dados obtido, é incerto tentar determinar uma estratégia adotada pelos animais (alocêntrica ou egocêntrica), uma vez que os grupos HPCv-Di e HPCv-Bi não chegaram a atingir 50% de animais classificados como *place learners* (48,2% e 48,5%, respectivamente); enquanto GVe e HPCv-Es apresentaram pouco mais da metade de seus animais como *place learners* (60% e 56%, respectivamente).

Diversos outros trabalhos, muito deles avaliando o papel especificamente do HPCd e HPCv em paradigmas espaciais, encontraram o mesmo perfil de dados que o presente trabalho (HUGHES, 1965; STEVENS E COWEY, 1973; SINNAMON, 1978; MOSER et al., 1993; MOSER et al., 1995; HOCK E BUNSEY, 1998). De um modo geral, lesões hipocampais totais ou envolvendo o HPCd prejudicam o desempenho dos animais nas mais diversas variações do labirinto em T; enquanto que lesões envolvendo exclusivamente o HPCv não alteram o comportamento dos animais. O trabalho que serviu como base para estabelecimento de nosso protocolo experimental, que utilizou inativações transientes com lidocaína do HPCd apenas, indicou que os animais tiveram aprendizagem espacial comprometida, bem como a estratégia de aprendizagem e memorização adotada era preferencialmente egocêntrica ao contrario da aloocêntrica esperada (PACKARD E MCGAUGH, 1996); enquanto que lesões ventrais parecem não atrapalhar a aquisição e execução dessa tarefa, como também observado por Bannerman e colaboradores (BANNERMAN et al., 1999).

O estudo de Ferbinteanu e McDonald (FERBINTEANU E MCDONALD, 2001) chama atenção a esse ponto, pois os autores relataram que lesões dorsais no HPC prejudicaram o desempenho do animais, enquanto lesões no HPCv melhorou o desempenho dos mesmos, facilitando a aquisição/aprendizagem da tarefa observado pelo número aumentado de visitas no braço com alimento disponível. Segundo os autores, essa

fato deve-se a uma possível memória alterada para o aspecto afetivo do alimento, dado as afinidades neuroatômica do HPCv e estruturas límbicas.

Nossos dados somam-se às crescentes evidências que sugerem um papel preferencial do HPCd sobre o HPCv na modulação da memória espacial. Dados eletrofisiológicos e anatômicos fornecem evidências convergentes para essa afirmação, *place cells* são mais numerosas e espacialmente mais seletivas no HPCd do que no HPCv (POUCET et al., 1884; JUNG et al., 1994); bem como informações espaciais (isto é, informações visuais e outras informações sensoriais) parecem ser direcionadas predominantemente para o HPCd do que para o HPCv em ratos (DEACON et al., 1983).

Quanto a lateralização funcional do HPCv investigada nesse trabalho, nenhuma evidência de lateralização foi observada. A lateralização trata-se de uma assimetria, em grau ou em presença, de substratos neurais, estruturas ou processos específicos entre os hemisférios encefálicos (CONCHA et al., 2012). Em humanos, sabe-se que o HPC é estrutura altamente lateralizada para modulação de funções cognitivas (MAGUIRE et al., 1998; O'KEEFE et al., 1998; SPIERS et al., 2001; BURGESS et al., 2002; HOWARD et al., 2014). Estudos apontam ambos hipocampi esquerdo e direito estão ativos durante navegações espaciais orientadas a um destino específico, mas estes podem desempenhar funções distintas em tais tarefas (MAGUIRE et al., 1998; O'KEEFE et al., 1998; SPIERS et al., 2001; BURGESS et al., 2002; HOWARD et al., 2014). Pacientes com lesões no lobo temporal medial direito tiveram a navegação espacial prejudicada compara a pacientes com lesões na poção esquerda ou controles. Assim, o HPC esquerdo parece ser especializado no processamento de memórias episódicas, contextuais e memórias autobiográficas remotas (SPIERS et al., 2001; MAGUIRE E FRITH, 2003). Enquanto o HPC direito é especializado na navegação espacial (MAGUIRE et al., 1998; SPIERS et al., 2001; HOWARD et al., 2014).

A lateralização hipocampal em roedores tem sido ignorada historicamente pelos pesquisadores, devido ao fato de existirem muitas projeções entre as sub-regiões hipocampais, conhecida como comissura hipocampal, a qual acredita-se que esteja ausente ou consideravelmente menos presente em primatas (WILSON et al., 1987; AMARAL E LAVENEX, 2007). Assim, a falta de comunicação inter-hemisférica entre hipocampi direito e esquerdo em humanos, teria viabilizado o desenvolvimento da lateralização funcional na espécie, como é hipotetizado (ZAIDEL, 1995). Embasando essa ideia, estudos apontam que o sucesso de navegação de roedores no LAM depende da integridade de ambos hipocampi (FENTON E BURES, 1993). E assim, o pensamento

de que o HPC de roedores não é funcionalmente lateralizado disseminou-se entre a comunidade científica. Entretanto, diversos estudos evidenciam que o encéfalo humano possui projeções diretas entre os hemisférios do HPC (GLOOR et al., 1993; ROSENZWEIG et al., 2011; LACUEY et al., 2015). Outros muitos trabalhos descrevem a presença de lateralização funcional do HPC em roedores (KLUR et al., 2009; SHINOHARA et al., 2012, SHIPTON et al., 2014; EL-GABY et al., 2016), lateralização anatômica (KAWAKAMI et al., 2003; SHINOHARA et al., 2008; SHINOHARA E HIRASE, 2009), química (LOUILOT & LE MOAL, 1994; WOLFF et al., 2008) e até mesmo na plasticidade sináptica dos neurônios hipocampais (KOHL et al., 2011; SHIPTON et al., 2014). Juntos, tais evidências apontam para a importância de compreendermos o HPC como uma estrutura bilateral e passar a considerar suas particularidades entre os hemisférios como variáveis importantes em estudos experimentais.

5. CONCLUSÕES

Diante dos presentes dados, é possível concluir que lesões uni ou bilaterais no HPCv (envolvendo especificamente as sub-regiões CA1 e subiculum) não comprometeram os comportamentos exploratórios dos animais. O HPCv, de fato, parece não ser uma região fundamental para a aquisição de informações espaciais e evocação das mesmas quando recém adquiridas; entretanto parece ser um sítio importante para a evocação de memórias espaciais remotamente adquiridas (4 semanas de aquisição). O HPCv também não se mostrou uma estrutura essencial para desenvolvimento da memória de reconhecimento. Por fim, nenhuma evidência de lateralização funcional para essa estrutura foi observada, nem mesmo para os paradigmas espaciais (LAM e labirinto em T) quanto para a memória de reconhecimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D.; LAVENEX, P. Hippocampal Neuroanatomy. In: ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T.; O'KEEFE, J. (Eds). **The Hippocampus Book**. Primeira edição. Oxford: Editora Oxford University Press. 2007. p. 37 - 114.

ARANTIUS, G. **De humano foetu liber tertio editus, ac recognitus**. Ejusdem anatomicarum observationum liber. Venetiis, 1587.

BANNERMAN, D. M.; YEE, B. K.; GOOD, M. A.; HEUPEL, M. J.; IVERSEN, S. D.; RAWLINS, J. N. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. **Behav Neurosci**, v. 113, p. 1170–1188, 1999.

BARTSCH, T. **The Clinical Neurobiology of the Hippocampus: An integrative View**. Oxford: Editora Oxford University Press, 2012. p. 111 - 134.

BEASON-HELD, L. L.; ROSENE, D. L.; KILLIANY, R. J.; MOSS, M. B. Hippocampal formation lesions produce memory impairment in the rhesus monkey. **Hippocampus**, v. 9, p. 562–574, 1999.

BENCHENANE, K.; PEYRACHE, A.; KHAMASSI, M.; TIERNEY, P. L.; GIOANNI, Y.; BATTAGLIA, F. P.; WIENER, S. I. Coherent Theta Oscillations and Reorganization of Spike Timing in the Hippocampal- Prefrontal Network upon Learning. **Neuron**, v. 66, p. 921–936, 2010.

BIR, S. C.; KUKREJA, S.; NANDA, A. Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530-1589) and the hippocampus of the human brain: History behind the discovery. **Journal of Neurosurgery**, v. 122, p. 971–975, 2015.

BLISS, T. V. P.; LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, p. 331–356, 1973.

BRAMBILLA, G. A. Storia delle scoperte fisico medico anatomico chirurgiche fatte dagli uomini illustri italiani. Nel Imperial Monistero di s. Ambrogio Maggiore, p. 188–198, 1781.

BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 14515–20, 2004.

BROMLEY-BRITS, K.; DENG, Y.; SONG, W. Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer ' s Disease Model Mice. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 53, p. 1–5, 2011.

BRUN, V. H.; OTNAESS, M. K.; MOLDEN, S.; STEFFENACH, H. A.; WITTER, M. P.; MOSER, M B.; MOSER, E. I. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. **Science**, v. 296, p. 2243–2246, 2002.

- BURGESS, N.; JEFFERY, K. J.; O'KEEFE, J. Intergrating hippocampal and parietal functions: a spatial point of view. In: BURGESS, N.; JEFFERY, K. J.; O'KEEFE, J. (Eds). **The hippocampal and parietal foundations of spatial cognition**. Oxford: Editora Oxford University Press, 1999. p. 3 – 29.
- BURGESS, N.; MAGUIRE, E. A.; O'KEEFE, J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. **Neuron**, v. 35, p. 625 - 641, 2000.
- BURWELL, R. D. The parahippocampal Region: Corticocortical Connectivity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 911, p. 25–42, 2006.
- BUSSEY, T. J.; MUIR, J. L.; AGGLETON, J. P. Functionally dissociating aspects of event memory: The effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 495–502, 1999.
- CASTELL, S. DE; JENSON, J.; LARIOS, H. Gaming Experience and Spatial Learning in a Virtual Morris Water Maze. **Journal of Virtual Worlds Research**, v. 8, p. 1–18, 2015.
- CENQUIZCA, L. A.; SWANSON, L. W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v. 56, p. 1–26, 2007.
- CHOI, J. H.; WON, M. H. Microglia in the normally aged hippocampus. **Laboratory animal research**, v. 27, p. 181–7, 2011.
- CHURCHWELL, J.; KESNER, R. Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: Interactions and independent parallel processing. **Behav Brain Res**, v. 225, p. 389–395, 2011.
- CLARK, R. E. et al. Rats with lesions of the hippocampus are impaired on the delayed nonmatching-to-sample task. **Hippocampus**, v. 11, p. 176–186, 2001.
- CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **The Journal of neuroscience**, v. 20, p. 8853–60, 2000.
- CONCHA, M. L.; BIANCO, I. H.; WILSON, S. W. Encoding asymmetry within neural circuits. **Nature Rev Neurosci**, v. 13, p. 832 – 843, 2012.
- D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Res Rev**, v. 36, p. 60 – 90, 2001.
- DEACON, T. W.; EICHENBAUM, H.; ROSENBERG, P.; ECKMANN, K. W. Afferent connections of the perirhinal cortex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 220, p. 168–190, 1983.

- DUVERNOY, H.; CATTIN, F.; RISOLD, P. Y. **The Human Hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI**. Quarta edição. Nova York: Editora Springer Science & Business, 2013. p. 28 – 32.
- EACOTT, M. J.; NORMAN, G. Integrated Memory for Object, Place, and Context in Rats: A Possible Model of Episodic-Like Memory? **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 1948–1953, 2004.
- EL-GABY, M.; ZHANG, Y.; WOLF, K.; SCHWIENING, C. J.; PAULSEN, O.; SHIPTON, O. A. Archærhodopsin selectively and reversibly silences synaptic transmission though altered pH. **Cell Reports**, v. 16, p. 2259 - 2268, 2016.
- ENGELHARDT, E. Hippocampus discovery. **Dement Neuropsychol**, v. 10, p. 58–62, 2016.
- ENNACEUR, A.; NEAVE, N.; AGGLETON, J. P. Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 80, p. 9 – 25, 1996.
- EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. **Neuron**, v. 76, p. 1057 – 1070, 2012.
- FANSELOW, M.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, p. 1 – 25, 2010.
- FENTON, A. A.; BURES, J. Place navigation in rats with unilateral tetrodotoxin inactivation of the dorsal hippocampus: Place but not procedural learning can be lateralized to one hippocampus. **Behav Neurosci**, v. 107, p. 552 – 564, 1993.
- FERBINTEANU, J.; MCDONALD, R. J. Dorsal / Ventral Hippocampus , Fornix , and Conditioned Place Preference. **Hippocampus**, v. 200, p. 187 – 200, 2001.
- FERBINTEANU, J.; RAY, C.; MCDONALD, R. J. Both dorsal and ventral hippocampus contribute to spatial learning in Long – Evans rats. **Neuroscience Letters**, v. 345, p. 131 – 135, 2003.
- FLORESCO, S. B.; SEAMANS, J. K.; PHILLIPS, A G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 17, n. 5, p. 1880–1890, 1997.
- FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature reviews Neuroscience**, v. 6, p. 119 – 30, 2005.
- FUJISAWA, S.; BUZSÁKI, G. A 4 Hz Oscillation Adaptively Synchronizes Prefrontal, VTA, and Hippocampal Activities. **Neuron**, v. 72, p. 153 – 165, 2011.

GALLAGHER, M.; BIZON, J. L.; HOYT, E. C.; HELM, K. A.; LUND, P. K. Effects of aging on the hippocampal formation in a naturally occurring animal model of mild cognitive impairment. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 71 – 77, 2003.

GASKIN, S.; TREMBLAY, A.; MUMBY, D. G. Retrograde and Anterograde Object Recognition in Rats With Hippocampal Lesions. **Hippocampus**, v. 969, p. 962 – 969, 2003.

GLOOR, P.; SALANOVA, V.; OLIVIER, A.; QUESNEY, L. F. The human dorsal hippocampal commissure: An anatomically identifiable and functional pathway. **Brain**, v. 116, p. 1249 - 1273, 1993.

GOTO, K.; KURASHIMA, R.; GOKAN, H.; INOUE, N.; ITO, I.; WATANABE, S. Lef-right asymmetry defect in the hippocampal circuitry impairs spatial learning and working memory in IV mice. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1 – 7, 2010.

GOULD, T. J.; ROWE, W. B.; HEMAN, K. L.; MESCHES, M. H.; YOUNG, D. A.; ROSE, G. M.; BICKFORD, P. C. Effects of hippocampal lesions on patterned motor learning in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 58, p. 581 – 586, 2002.

HANDELMANN, G. E.; OLTON, D. S. Spatial memory following damage to hippocampal CA3 pyramidal cells with kainic acid: impairment and recovery with preoperative training. **Brain Research**, v. 217, p. 41–58, 1981.

HENKE, P. G. Hippocampal Pathway to the Amygdala and Stress Ulcer Development. **Brain Research Bulletin**, v. 25, p. 691–695, 1990.

HERMIT, M. B.; GREENWOOD, J. R.; NIELSEN, B.; BUNCH, L.; JORGENSEN, C. G.; VESTERGAARD, H. T.; STENS BOL, T. B.; SANCHEZ, C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; MADSEN, U.; BRAUNER-OSBORNE, H. Ibotenic acid and thioibotenic acid: A remarkable difference in activity at group III metabotropic glutamate receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 486, n. 3, p. 241–250, 2004.

HOBIN, J. A.; JI, J.; MAREN, S. Ventral Hippocampal Muscimol Disrupts Context-Specific Fear Memory Retrieval After Extinction in Rats. **Hippocampus**, v. 16, p. 174–182, 2006.

HOCK, B. J.; BUNSEY, M. D. Differential Effects of Dorsal and Ventral Hippocampal Lesions. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 7027 – 7032, 1998.

HOLDSTOCK, J. S.; MAYES, A. R.; ROBERTS, N.; CEZAYIRLI, E.; ISAAC, C. L.; O'REILLY, R. C.; NORMAN, K. A. Under what conditions is recognition spared relative to recall after selective hippocampal damage in humans? **Hippocampus**, v. 12, p. 341 – 351, 2002.

HOZ, L. DE; KNOX, J.; MORRIS, R. G. M. Longitudinal Axis of the Hippocampus : Both Septal and Temporal Poles of the Hippocampus Support Water Maze Spatial Learning Depending on the Training Protocol. **Hippocampus**, v. 13, p. 587 – 603, 2003.

HOWARD, L. R.; JAVADI, H. R.; YU, Y.; MILL, R. D.; MORRISON, L. C.; KNIGHT, R.; LOFTUS, M. M.; STASKUTE, L.; SPIERS, H. J. The hippocampus and entorhinal cortex encode path and Euclidean distances to goals during navigation. **Curr Biol**, v. 24, p. 1331 - 1330, 2014.

HUGHES, K. R. Dorsal and Ventral Hippocampus Lesions and Maze Learning: Influence of Preoperative Environment. **Can J Psychol**, v. 19, p. 325 – 332, 1965.

INSAUSTI, R.; HERRERO, M. T.; WITTER, M. P. Entorhinal cortex of the rat: Cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. **Hippocampus**, v. 7, p. 146 – 183, 1997.

JARRARD, L. E. On the use of ibotenic acid to selectively lesion different components of the hippocampal formation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 29, p. 251 – 259, 1989.

JIN, J.; MAREN, S. Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 9, p. 1 - 8, 2015.

JONES, M. W.; WILSON, M. A. Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. **PLoS Biology**, v. 3, p. 1 – 13, 2005.

JUDAŠ, M.; PLETIKOS, M. A note on the sea-horse in the human brain. **Translational Neuroscience**, v. 1, p. 335 – 337, 2010.

JUNG, M. W.; WIENER, S. I.; MCNAUGHTON, B. L. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 7347 – 7356, 1994.

KAWAKAMI, R.; SHINOHARA, Y.; KATO, Y.; SUGIYAMA, H.; SHIGEMOTO, R.; ITO, I. Asymmetric allocation of NMDA receptor $\epsilon 2$ subunits in hippocampal circuitry. **Science**, v. 300, p. 990 - 994, 2003.

KIRBY, E. D.; JENSEN, K.; GOOSENS, K. A.; KAUFER, D. Stereotaxic Surgery for Excitotoxic Lesion of Specific Brain Areas in the Adult Rat. **Journal of Visualized Experiments**, n. 65, p. 1 – 6, 2012.

KJELSTRUP, K. G.; TUVNES, F. A.; STEFFENACH, H. A.; MURISON, R.; MOSER, E. I.; MOSER, M. B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **PNAS**, v. 99, p. 10825 – 10830, 2002.

KLOOSTERMAN, F.; VAN HAEFTEN, T.; WITTER, M. P.; LOPES-DA-SILVA, F. H. Electrophysiological characterization of interlaminar entorhinal connections: An essential link for re-entrance in the hippocampal-entorhinal system. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 3037 – 3052, 2003.

KLUR, S.; KLUR, S.; MULLER, C.; PEREIRA DE VASCONCELOS, A.; BALLARD, T.; LOPEZ, J.; GALANI, R.; CERTA, U.; CASSEL, J. C. Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach

combining gene expression profiling and reversible inactivation. **Hippocampus**, v. 19, p. 800 – 816, 2009.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Current Biology**, v. 25, p. R1116 – R1121, 2015.

KOHL, M.; SHIPTON, O. A.; DEACON, R. M.; RAWLINS, J. N. P.; DEISSEROTH, K.; PAULSEN, O. Hemisphere specific optogenetic stimulation reveals left-right asymmetry of hippocampal plasticity. **Nat Neurosci**, v. 14, p. 1413 - 1415, 2011.

KOHLER, C.; SCHWARCZ, R. Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: A histological study. **Neuroscience**, v. 8, p. 819 – 835, 1983.

LACUEY, N.; ZONJY, B.; KAHRIMAN, E. S.; KAFFASHI, F.; MILLER, J.; LÜDERS, H. O. Functional connectivity between right and left mesial temporal structures. **Brain Struct Funct**, v. 220, p. 2617 - 2623, 2015.

LEE, I.; KESNER, R. P. Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. **Hippocampus**, v. 14, p. 66 – 76, 2004.

LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; HAELEWYN, B.; BOULOUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P.; FRERET, T. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, p. 2531 – 2537, 2013.

LIBERZON, I.; PHAN, K. L. Brain-Imaging Studies of Posttraumatic Stress Disorder. **CNS Spectrums**, v. 8, p. 641 – 650, 2003.

LIPSKA, B. K.; JASKIW, G. E.; CHRAPUSTA, S.; KAROUM, F.; WEINBERGER, D. R. Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. **Brain research**, v. 585, p. 1 – 6, 1992.

LOUILOT, A.; LE MOAL, M. Lateralized interdependence between limbocortical and ventrostriatal dopaminergic transmission. **Neuroscience**, v. 59, p. 495 - 500, 1994.

MAGUIRE, E. A. Hippocampal involvement in human topographical memory: Evidence from functional imaging. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 352, p. 1475 – 1480, 1997.

MAGUIRE, E. A.; BURGESS, N.; DONNETT, J. G.; FRACKOWIACK, R. S. J.; FRITH, C. D.; O'KEEFE, J. Knowing where and getting there: A human navigational framework. **Science**, v. 280, p. 921 - 924, 1998.

Maguire, E. A.; Frith, C. D. Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. **J Neurosci**, v. 23, p. 5302 – 5307, 2003.

MARR, D. A Theory for Cerebral Neocortex. **Proc. Roy. Soc. Lond. B.**, v. 176, p. 161 – 234, 1970.

MARR, D. Simple memory: a theory for archicortex. **Philos Trans R Soc Lond Bio Sci**, n. 262, p. 23 – 81, 1971.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain James L McGaugh and Benno Roozendaal. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, p. 205 – 210, 2002.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47 – 60, 1984.

MORRIS, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, v. 12, n. 2, p. 239–260, 1981.

MORRIS, R. G. M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N. P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesion. **Science**, v. 297, p. 681–683, 1982.

MOSER, E.; MOSER, M. B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 3916 – 3925, 1993.

MOSER, M. B.; MOSER, E. I.; FORREST, E.; ANDERSEN, P.; MORRIS, R. G. Spatial learning with minislab in the dorsal hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, p. 9697 – 9701, 1995.

MOSES, S. N.; SUTHERLAND, R. J.; MCDONALD, R. J. Differential involvement of amygdala and hippocampus in responding to novel objects and contexts. **Brain Research Bulletin**, v. 58, p. 517 – 527, 2002.

MUMBY, D. G.; GASKIN, S.; GLENN, M. J.; SCHRAMEK, T. E.; LEHMANN, H. Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats : Memory for Objects, Places, and Contexts. **Learning & Memory**, v. 9, p. 49 – 57, 2002.

MUMBY, D. G.; PINEL, J. P. J. Rhinal cortex lesions and object recognition in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, p. 11 – 18, 1994.

MURRAY, E. A.; BAXTER, M. G.; GAFFAN, D. Monkeys with rhinal cortex damage or neurotoxic hippocampal lesions are impaired on spatial scene learning and object reversals. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, p. 1291 – 1303, 1998.

NABER, P. A.; LOPES DA SILVA, F. H.; WITTER, M. P. Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. **Hippocampus**, v. 11, p. 99 – 104, 2001.

NEMANIC, S.; ALVARADO, M. C.; BACHEVALIER, J. The Hippocampal/Parahippocampal Regions and Recognition Memory: Insights from Visual Paired Comparison versus Object-Delayed Nonmatching in Monkeys. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 2013 – 2026, 2004.

- O'KEEFE, J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. **Experimental Neurology**, v. 51, p. 78 – 109, 1976.
- O'KEEFE, J.; BURGESS, N.; DONNETT, J. G.; JEFFREY, K. J.; MAGUIRE, E. A. Place cells, navigational accuracy and the human hippocampus. **Phil Trans R Soc Lond B**, v. 353, p. 1333 - 1340, 1998.
- O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. Short Communications The hippocampus as a spatial map . Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, v. 34, p. 171 – 175, 1971.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Primeira edição. Oxford: Editora Oxford University Press, 1978. p. 22 – 35.
- OLSEN, G. M.; SCHEEL-KRUGER, J.; JENSEN, L. H. Relation of Spatial Learning of Rats in the Morris Water Maze Task to the Number of Viable CA1 Neurons Following Four-Vessel Occlusion. **Behav Neurosci**, v. 108, p. 681 – 690, 1994.
- PACKARD, M. G. Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 12881 – 12886, 1999.
- PACKARD, M. G.; MCGAUGH, J. L. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. **Neurobiology of learning and memory**, v. 65, p. 65 – 72, 1996.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Sexta edição. New York: Editora Academic Press, 2005.
- PENNARTZ, C. M. A.; ITO, R.; VERSCHURE, P. F. M. J.; BATTAGLIA, F. P.; ROBBINS, T. W. The hippocampal-striatal axis in learning, prediction and goal-directed behavior. **Trends in Neurosciences**, v. 34, p. 548 – 559, 2011.
- PITKANEN, A.; PIKKARAINEN, M.; NURMINEN, N.; YLINEN, A. Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation , Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 369 – 391, 2000.
- PITKÄNEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J. E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 517 – 523, 1997.
- POTHUIZEN, H. H. J.; ZHANG, W. N.; JONGEN-RÊLO, A. L.; FELSON, J.; YEE, B. K. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat : a within-subject , within-task comparison of reference and working spatial memory. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 705 – 712, 2004.

- POUCET, B.; THINUS-BLANC, C.; MULLER, R. U. Place cells in the ventral hippocampus of rats. **Learning & Memory**, v. 5, p. 2045 – 2048, 1884.
- PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. **Current Biology**, v. 23, p. R764 – R773, 2013.
- PRUSKY, G. T.; DOUGLAS, R. M.; NELSON, L.; SHABANPOOR, A.; SUTHERLAND, R. J. Visual memory task for rats reveals an essential role for hippocampus and perirhinal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 5064 – 5068, 2004.
- ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 423 – 433, 2009.
- ROSENZWEIG, I.; BENICZKY, S.; BRUNNHUBER, F.; ALARCON, G.; VALENTIN, A. The dorsal hippocampal commissure: when functionality matters. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 23, p. 45 - 48, 2011.
- SCHWARCZ, R.; HOKFELT, T.; FUXE, K.; JONSSON, G.; GOLSTEIN, M.; TERENIUS, L. Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: A morphological and neurochemical study. **Experimental Brain Research**, v. 37, p. 199 – 216, 1979.
- SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 20, p. 11 – 21, 1957.
- SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life sciences**, v. 87, p. 521 – 36, 2010.
- SHINOHARA, Y.; HIRASE, H. Size and receptor density of glutamatergic synapses: a viewpoint from left-right asymmetry of CA3-CA1 connections. **Front Neuroanat**, v. 3, p.1 - 10, 2009.
- SHINOHARA, Y.; HOSOYA, A.; YAMASAKI, N.; AHMED, H.; HATTORI, S.; EGUCHI, M.; YAMAGUCHI, S.; MIYAKAWA, T.; HIRASE, H.; SHIGEMOTO, R. Right hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice. **Hippocampus**, v. 22, p. 117 – 121, 2012.
- SHIPTON, O. A.; EL-GABY, M.; APERGIS-SCHOUTE, J.; DEISSEROTH, K.; BANNERMAN, D. M.; PAULSEN, O.; KOHL, M. M. Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, p. 15238 - 15243, 2014.
- SINNAMON, H. M.; FRENIERE, S.; KOOTZ, J. Rat hippocampus and memory for places of changing significance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 92, p. 142 – 155, 1978.
- SMITH, M. E. Bilateral hippocampal volume reduction in adults with post-traumatic stress disorder: A meta-analysis of structural MRI studies. **Hippocampus**, v. 15, p. 798 – 807, 2005.

SPIERS, H. J.; BURGESS, N.; MAGUIRE, E. A.; BAXENDALE, S. A.; HARTLEY, T.; THOMPSON, P. J.; O'KEEFE, J. Unilateral temporal lobectomy patients show lateralized topographical and episodic memory deficits in a virtual town. **Brain**, v. 124, p. 2476 – 2489, 2001.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological review**, v. 99, p. 195 – 231, 1992.

STEFFENACH, H. A.; SLOVITER, R. S.; MOSER, E. I.; MOSER, M. B. Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 3194 – 3198, 2002.

STEVENS, R.; COWEY, A. Effects of dorsal and ventral hippocampal lesions on spontaneous alternation, learned alternation and probability learning in rats. **Brain Research**, v. 52, p. 203 – 224, 1973.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. **The Journal of neuroscience**, v. 19, p. 2834 – 2840, 1999.

TAMAMAKI, N.; NOJYO, Y. Preservation of topography in the connections between the subiculum, field CA1, and the entorhinal cortex in rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 353, p. 379 – 390, 1995.

TILNEY, F. The hippocampus and its relations to the corpus callosum. **The journal of nervous and mental disease**, v. 89, p. 433 – 513, 1939.

VERTES, R. P. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. **Synapse**, v. 51, p. 32 – 58, 2004.

WANG, M.; GAMO, N. J.; YANG, Y.; JIN, L. E.; WANG, X. J.; LAUBACH, M.; MAZER, J. A.; LEE, D.; ARNSTEN, A. F. T. Neuronal Basis of Age-related working memory decline. **Nature**, v. 476, p. 210 – 213, 2012.

WILSON, C. L.; ISOKAWA-AKESSON, M.; BABB, T. L.; CRANDALL, P. H. A comparative view of local and interhemispheric limbic pathways in humans: an evoked potential analysis. In: ENGEL, J. J.; OJEMANN, G. A.; LÜDERS, H. O. (Eds). **Fundamental Mechanisms of Human Brain Function: Opportunities for Direct Investigation in Association With the Surgical Treatment of Epilepsy**. Primeira edição. Stuttgart: Editora Raven, 1987. p. 27 – 38.

WILSON, M. A.; MCNAUGHTON, B. L. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. **Science**, v. 261, p. 1055 – 1058, 1993.

WINTERS, B. D.; FORWOOD, S. E.; COWELL, R. A.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J. Double Dissociation between the Effects of Peri - Postrhinal Cortex and Hippocampal Lesions on Tests of Object Recognition and Spatial Memory:

Heterogeneity of Function within the Temporal Lobe. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 5901 – 5908, 2004.

WOLFF, S. C.; HRUSKA, Z.; NGUYEN, L.; DOHANICH, G.P. Asymmetric distributions of muscarinic receptor binding in the hippocampus of female rats. **Eur J Pharm**, v. 588, p. 248 – 250, 2008.

WOON, F. L.; SOOD, S.; HEDGES, D. W. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: A meta-analysis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, p. 1181 – 1188, 2010.

WU, Y.; KAWAKAMI, R.; SHINOHARA, Y.; FUKAYA, S.; SAKIMURA, K.; MISHINA, M.; WATANABE, M.; ITO, I.; SHIGEMOTO, R. Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in Schaffer collateral synapses in $\epsilon 1$ /NR2A knock-out mice. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 9213 – 9226, 2005.

ZAIDEL, D. W. The case for a relationship between human memory, hippocampus, and corpus callosum. **Biol Res**, v. 28, p. 51 - 57, 1995.

ZINKAND, W. C.; MOORE, W. C.; THOMPSON, C.; SALAMA, A. I.; PATEL, J. Ibotenic acid mediates neurotoxicity and phosphoinositide hydrolysis by independent receptor mechanisms. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v. 16, p. 1 – 10, 1992.

ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R.; TENG, E.; STEFANACCI, L.; BUFFALO, E. A.; CLARK, R. E. Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 451 – 463, 2000.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1 – Protocolo de coloração dos cortes histológicos

A- Preparação do corante:

- 2,5 g de acetato de cresil violeta
- 500 ml de água destilada
- 10 ml de ácido acético 25%

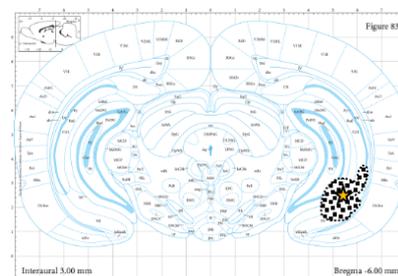
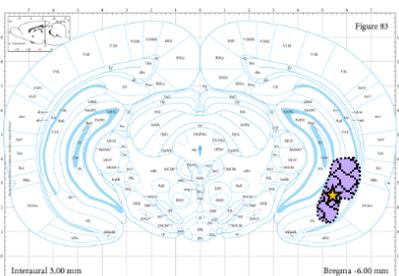
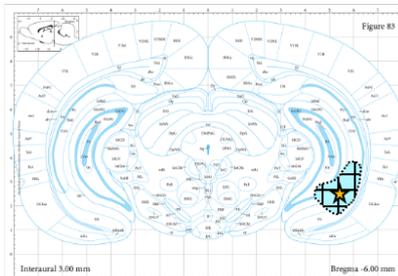
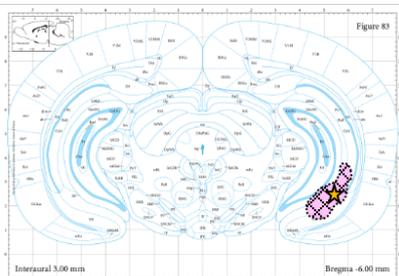
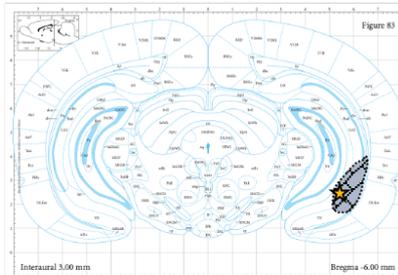
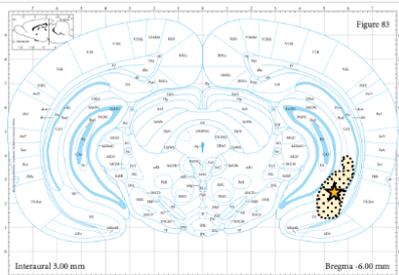
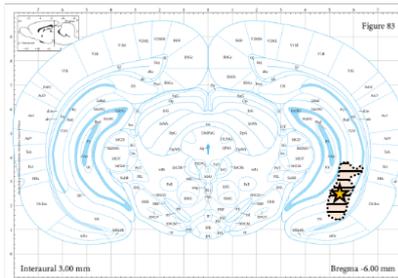
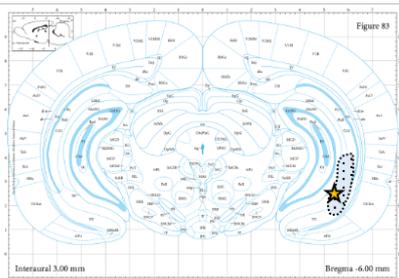
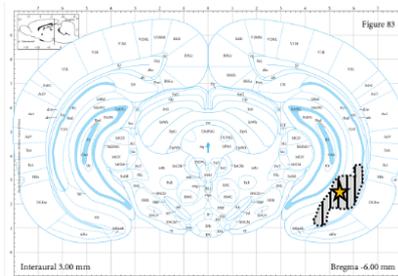
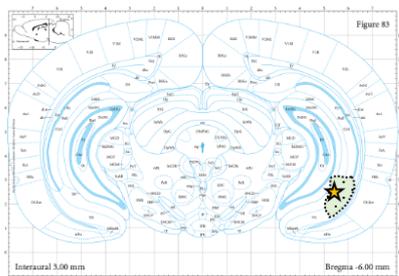
B- Procedimentos:

- Aquecer a mistura de violeta cresil com água até 40°C, agitando-a por 5 minutos;
- Filtrar a solução final em papel filtro;
- Acrescentar o ácido acético até que o pH da solução esteja entre 3 e 3,5.

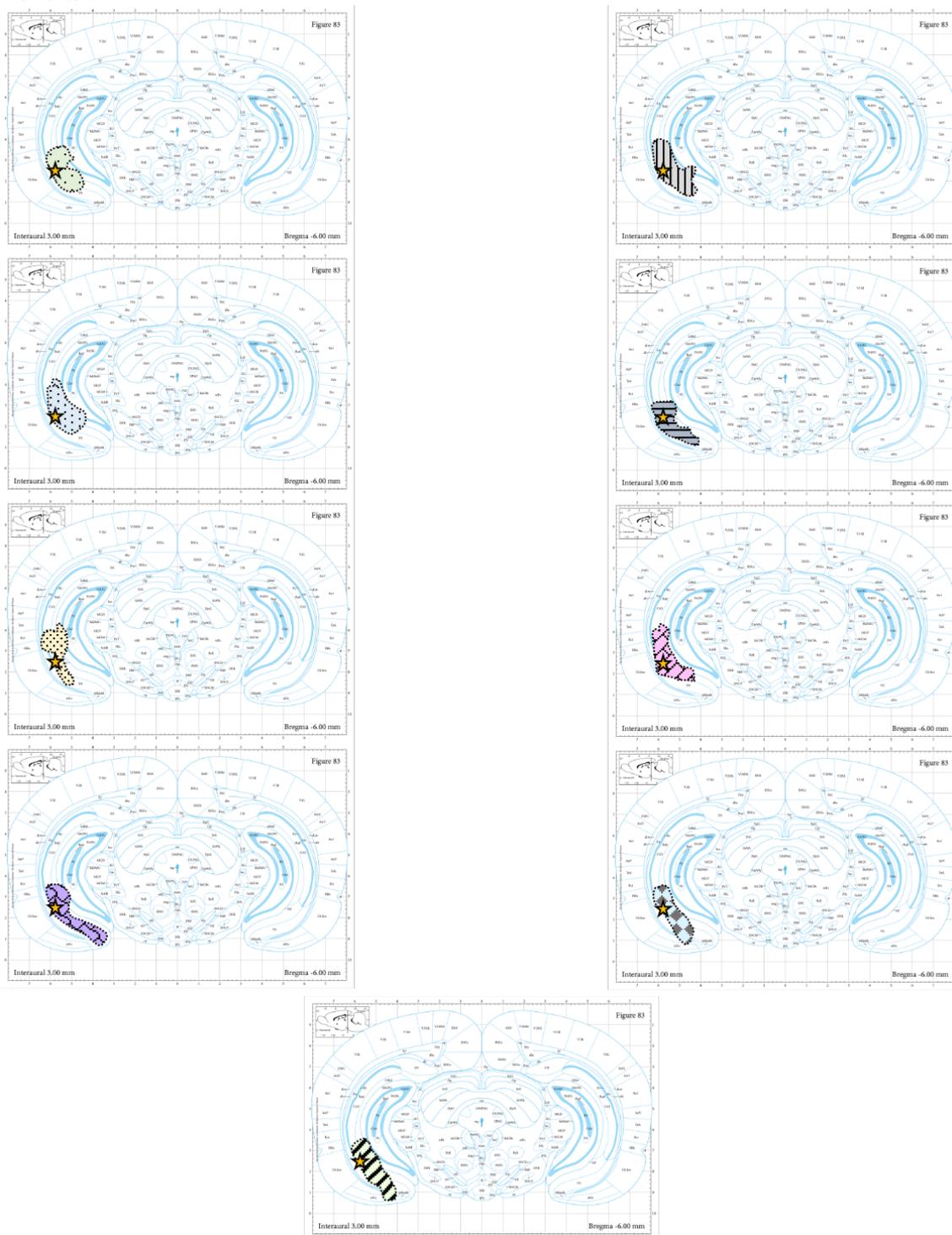
Os cortes devem ser mergulhadas nas seguintes soluções; nesta ordem.

Solução	Tempo de imersão
Álcool 100%	5 minutos
Álcool 100% + clorofórmio (1:1)	10 minutos
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 75%	3 minutos
Água destilada para lavar	-----
Cresil violeta – aquecida a 60°	15 minutos
Água destilada para lavar	-----
Álcool 80%	3 minutos
Álcool 90%	10 minutos
Álcool 100% + clorofórmio (1:1)	3 minutos
Álcool 95% + ácido acético (15 gotas/100ml)	3 minutos
Álcool 95%	6 minutos
Álcool 100% + ácido butírico (1:1)	3 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

7.2. ANEXO 2 - Prancha com imagens representativas da região lesionada nos animais pertencentes ao grupo com lesão no hemisfério esquerdo do hipocampo ventral.



7.3. ANEXO 3 - Prancha com imagens representativas da região lesionada nos animais pertencentes ao grupo com lesão no hemisfério direito do hipocampo ventral.



CAPÍTULO 3

O papel do córtex pré-frontal medial na modulação de memórias episódicas recentes e remotas e avaliação de lateralização funcional

RESUMO

O córtex pré-frontal medial (CPFm) possui conexões recíprocas com o hipocampo (HPC). Diversos estudos destacam sua importância para o processamento de memórias episódicas; enquanto alguns autores defendem seu envolvimento exclusivo no armazenamento e evocação de memórias remotas, outros defendem sua participação desde a aquisição, operando em conjunto com o HPC. Ainda, tem crescido o número de estudos que destacam a lateralização funcional desse sítio para comportamentos que envolvam tomada de decisão, avaliação de risco e estados ansiogênicos/ansiolíticos. Diante das interrogações que permeiam o CPFm, o presente estudo (por meio do experimento II) dedicou-se a investigar a contribuição do CPFm no processamento de memórias episódicas (de reconhecimento e espacial – recente e remota) e a possível lateralização funcional deste durante as tarefas de memória episódica (Labirinto Aquático de Morris – LAM; Labirinto em T e Teste de reconhecimento de objetos – TRO). Para tanto, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: (i) grupo veículo, em que receberam injeções bilaterais do veículo farmacológico (tampão salina fosfato – PBS) em ambos CPFm; (ii) grupo CPFm esquerdo, em que os animais receberam uma injeção de PBS no CPFm direito e uma injeção do lesionador ácido ibotênico (IBO - 10µg/µl) no CPFm esquerdo; (iii) grupo CPFm direito, em que os animais receberam uma injeção de PBS no CPFm esquerdo e uma injeção de IBO no CPFm direito; (iv) e grupo CPFm bilateral, em que os animais receberam injeção bilateral de IBO em ambos CPFm. Animais lesionados tiveram evocação de memórias espaciais remotas comprometidas no LAM, enquanto a aquisição de novas memórias espaciais e evocação das mesmas recentemente adquiridas, mostraram-se preservadas independente da lesão (esquerda, direita ou bilateral). Quaisquer lesões no CPFm não causaram déficit locomotor ou exploratório nos animais; assim como a capacidade de reconhecimento do objeto previamente explorado mostrou-se intacta em todos os grupos lesionados. De modo interessante, animais com lesão no CPFm (esquerda, direita ou bilateral) apresentaram prejuízos para evocar, ainda na etapa de aquisição, informações espaciais no labirinto em T forçado; tarefa essa que depende de comportamento motivado e tomada de decisão. Nenhuma evidência de lateralização funcional do CPFm na modulação de memórias episódicas foi observada. Isto posto, o CPFm parece ser uma região relevante para evocação de memória episódicas remotas, enquanto a aquisição de novas memórias espaciais e evocação recente das mesmas parecem não dependem essencialmente desse sítio. Assim como se mostrou fundamental para a aquisição de tarefas espaciais em que o comportamento motivado e tomada de decisão são fatores centrais para aprendizagem do paradigma (labirinto em T). Apesar das evidências crescentes de lateralização dessa estrutura na modulação de comportamentos complexos, o CPFm parece depender de ambos hemisférios atuando em conjunto para o processamento de memórias episódicas.

Palavras-chave: CPFm, lateralização funcional, consolidação, evocação, memória recente e remota.

ABSTRACT

The medial prefrontal cortex (mPFC) has reciprocal connections with the hippocampus (HPC). Several studies point its importance for processing episodic memories; whereas some authors defend its exclusive involvement in the storage and recall of remote memories, others defend its participation since acquisition phase, operating with HPC. Still, the number of studies that highlight the functional lateralization of this site in decision making, risk assessment and anxiogenic/anxiolytic states has grown. Given the current scenario, the present study (through experiment II) dedicated to investigate the contribution of the mPFC in the processing of episodic memories (recognition and spatial memory - recent and remote) and its possible functional lateralization during execution of episodic memory tasks (Morris Water Maze - MWM; forced T maze and Object Recognition Test - ORT). For this purpose, animals were divided into four experimental groups: (i) vehicle group, in which they received bilateral injections of the pharmacological vehicle (saline phosphate buffer - PBS) in both mPFC; (ii) left mPFC group, in which the animals received an injection of PBS in the right mPFC and an injection of the injector ibotenic acid (IBO -10 μ g / μ l) in the left mPFC; (iii) right mPFC group, in which the animals received an injection of PBS in the left mPFC and an injection of IBO in the right mPFC; (iv) and bilateral mPFC group, in which the animals received bilateral injection of IBO in both mPFC. Lesioned animals had impaired recall of remote spatial in MWM, whereas the acquisition of new spatial memories and recall of recently acquired ones, were preserved regardless of the lesion site (left, right or bilateral). None mPFC manipulation cause locomotor or exploratory deficit in the animals; as well as the ability to recognize the previously explored object was intact in all lesioned groups. Interestingly, animals with mPFC lesions (left, right or bilateral) showed impairment already in the acquisition phase in the forced T maze; a task that depends on motivated behavior and decision making. No evidence of functional lateralization of the mPFC during modulation of episodic memories was observed. Hereupon, mPFC seems to be a relevant region for the recall of remotely acquired episodic memories, whereas the acquisition of new spatial memories and recall of recent ones seem not to depend essentially on this region. As well as, the region seems to be fundamental for the acquisition of spatial tasks in which motivated behavior and decision making are central factors for learning the paradigm (forced T maze). Despite the growing evidence of lateralization of this structure in the modulation of complex behaviors, mPFC seems to depend on both hemispheres acting together to process episodic memories.

Keywords: mPFC, episodic memory, consolidation, recent memory, and remote memory.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Possíveis anatomias encefálicas encontradas em *Drosophila melanogaster*.** A imagem de microscopia confocal mostrando o corpo assimétrico (seta) em padrão encontrado em animais selvagens, marcado com anticorpo anti-Fasil. B imagem do encéfalo de algumas moscas que naturalmente apresentam padrão simétrico (presença de corpo assimétrico em ambos os hemisférios). Linha pontilhada na imagem A e B indicam a linha media encefálica. Escala de 20 μm 90
- Figura 2. Sítios de injeção.** A imagem é uma representação esquemática dos sítios de injeção considerados corretos no procedimento de lesão do córtex pré-frontal medial. Utilizando-se das coordenadas estereotáxicas (AP: +3,1; ML: $\pm 0,7$ e DV: -4,0), foram considerados acertos cirúrgicos quando a droga foi infundida nas regiões do córtices pré-límbico e infra-límbico. A figura 2A representa o sítio de injeção no hemisfério esquerdo do córtex pré-frontal medial. A figura 2B representa o sítio de injeção no hemisfério direito do córtex pré-frontal medial. E a figura 2C representa os sítios de injeções bilaterais no córtex pré-frontal medial 91
- Figura 3. Desempenho nos treinos espaciais.** Imagem 3A apresenta ao tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa ao longo dos 35 treinos espaciais no LAM. As barras representam a média \pm E.P.M. N=9 por grupo, ANOVA *one way*. A imagem 3B apresenta o tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma em cada dia do protocolo experimental do LAM. Cada ponto representa a média diária de latência de escape \pm E.P.M. N=9 por grupo. * $p < 0,005$ vs. D1 de cada grupo experimental. ANOVA *two ways* (fator 1: tratamento e fator 2: tempo) seguida do procedimento de BKY 94
- Figura 4. Tempo de retenção nos *probe trials*.** Os gráficos mostram o tempo médio nadando sobre o quadrante que continha previamente a plataforma submersa durante o *probe trial* 1 (3A) e *probe trail* 2 (3B). As barras representam a média \pm E.P.M. n=9 por grupo, ANOVA *one way*. * $p < 0,005$ comparado ao GVe. As linhas pontilhadas indicam o tempo de natação ao acaso (25%). ANOVA *one way* seguida do procedimento de BKY 94
- Figura 5. Parâmetros locomotores e exploratórios.** A figura 5A apresenta a frequência total de entradas nos quadrantes do aparato de campo aberto durante a primeira sessão de habituação dos animais. A figura 5B apresenta a frequência média de levantamentos no aparato de campo aberto. A figura 5C apresenta o tempo médio que os animais passaram realizando o comportamento de *grooming* durante a habituação ao campo aberto. As barras representam a média de frequência tempo \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *one way* ordinária 95
- Figura 6. Teste de reconhecimento de objetos.** A figura 6A apresenta o tempo em segundos que os animais passaram explorando os objetos idênticos (1 e 2) apresentados durante a etapa de familiarização. A figura 6B apresenta a média de tempo (s) que os animais passaram explorando o objeto com o qual foram familiarizados (velho – V) e o novo objeto (N) apresentado durante o teste de reconhecimento. As barras representam a média de tempo \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P < 0,005$ compara ao tempo explorando o objeto velho de cada grupo. A linha pontilhada representa o tempo mínimo de 20 segundos estipulado para explorar cada objeto 97
- Figura 7. Desempenho durante os treinos espaciais.** As imagens a seguir apresentam a média de porcentagem de escolhas corretas (entradas no braço com reforço alimentar acessível) como média total dos 60 treinos espaciais (7A) ou como médias diárias (7B). Para a imagem 7A, as barras representam a média de tempo \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P < 0,005$ compara ao GVe. Na imagem 7B, os pontos representam médias diárias de escolhas corretas \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *two ways* (fator 1: tratamento e fator 2: tempo) seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P < 0,005$ entre GVe e CPFm-Bi .. 99

Figura 8. Porcentagem de animais *place learners*. O gráfico apresenta a porcentagem média de animais classificados como *place learners* durante as três sessões de *probe trials*. As barras representam a média \pm E.P.M. N=9 por grupo. Teste de Friedman

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média de tempo explorando objetos idênticos durante a sessão de familiarização no teste de reconhecimento de objetos	96
Tabela 2. Tempo médio explorando o objeto velho (previamente apresentado na sessão de familiarização) e o objeto novo (apresentado no teste de reconhecimento de objeto)	96
Tabela 3. Tempo médio (em segundos) que os animais levaram para atingir o critério da tarefa ..	97

1. INTRODUÇÃO

A nossa intrigante capacidade de registrar experiências cotidianas e recupera-las muito mais tarde em diversos tipos de situações depende, basicamente, de dois tipos de processamento de informações. Primeiro, durante o aprendizado, o cérebro deve formar rapidamente uma representação neural inicial da nova experiência. Em seguida, o cérebro deve consolidar a nova representação em uma organização neural que é otimizada para recuperação quando diante de um estímulo que muitas vezes pode estar apenas distantemente associado a uma característica dessa experiência inicial (PRESTON E EICHENBAUM, 2013).

Eric Kandel postulou que memória e aprendizado são etapas de um processo contínuo; “aprendizado é o processo pelo qual adquirimos conhecimento acerca do mundo e memória é o processo pelo qual esse conhecimento do mundo é codificado, armazenado e posteriormente recuperado” (KANDEL et al., 2014). Assim, a consolidação trata-se de um processo essencial que “transforma” experiências em memórias. Ao longo das últimas décadas produziu-se muito conhecimento acerca desse processo biológico e atualmente compreende-se que a consolidação é um evento extremamente complexo e envolve reorganizações em ambos os níveis sináptico e sistêmico (DUDAI, 2004). A consolidação sináptica ocorre dentro de minutos a horas e induz a estabilização de novas conexões sinápticas (SQUIRE E KANDEL, 1999; LEDOUX, 2001; DUDAI, 2004). A consolidação sistêmica, por sua vez, trata-se de um processo mais complexo e prolongado que depende da reorganização de determinadas regiões encefálicas para que possam armazenar e dar suporte às memórias remotamente adquiridas (SQUIRE E KANDEL, 1999; DUDAI, 2004). Durante a consolidação sistêmica, memórias que inicialmente eram dependentes do hipocampo (HPC) podem passar a ser armazenadas em outras regiões encefálicas, tais como regiões corticais, tornando-se assim, independentes do HPC (DUDAI, 2004). O HPC e o córtex pré-frontal medial (CPFm) parecem estar envolvidos em diversos aspectos dos processos cognitivos e mnemônicos, incluindo o processo de consolidação de memórias (SQUIRE, 1992; GOLDMAN-RAKIC, 1994, 1995; FUSTER, 1997), constituindo o que atualmente é referido como via de processamento mnemônico hipocampo - córtex pré-frontal. Essa via neural parece se originar nas áreas CA1 e subiculum do HPC e projeta-se para as áreas orbital média e pré-límbica do córtex pré-frontal (CPF), sendo essas projeções recíprocas entre esses sítios (ROSENE E VAN

HOESEN, 1977; IRLE E MARKOWITSCH, 1982; CAVADA. et al., 1983; GOLDMAN-RAKIC et al., 1984; HELEN, 1995). A consolidação sistêmica é um processo re-organizacional que depende de tempo (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005), uma vez que diversas evidências experimentais apontam que o HPC desempenha um papel temporário no armazenamento de novas informações e que a retenção permanente de memórias parece depender de circuitos corticais, tais como os do CPFm (MCCLELLAND et al., 1995). Apesar de termos gerado muito conhecimento a respeito do papel do HPC na codificação de novas memórias ,o envolvimento do CPFm na modulação das memórias continua sendo objeto de debate.

O CPF trata-se de uma estrutura encefálica que foi definida e assim ganhou notoriedade após o trabalho pioneiro de Broadman em que classificou todo o tecido cortical (CERQUEIRA et al., 2008). Nesta região encluem-se todas as áreas do lobo frontal que possuem a camada granular IV interna e que posicionem-se rostralmente a região (pré) motora agranular. Tais regiões, que são particularmente desenvolvidas em humanos, são compostas por diversas outras sub-regiões distintas que podem ser concisamente divididas em três principais porções: dorso-lateral, medial (ou cíngulo anterior) e orbital (FUSTER, 1997). Além das distinções estruturais entre as sub-regiões do CPF, Goldman-Rakic (1995) observou o processamento distinto de funções cognitivas e emocionais entre as sub-regiões do CPF ao estudar primatas. Damasio (2000) ao estudar o CPF de pacientes com lesões observou que esta região parece estar envolvida com o planejamento e flexibilização comportamental, tomada de decisão, memória de trabalho e processamento emocional.

Inicialmente, acreditava-se que, devido ao tamanho aumentado dos lobos frontais em primatas (especialmente nos humanos), o CPF fosse uma região encefálica exclusiva dos primatas (CERQUEIRA et al., 2008). Entretanto, graças a estudos comparativos a cerca dos padrões de conectividade encefálica entre os mamíferos, hoje é amplamente aceito que a porção frontal do encéfalo de roedores seja equivalente ao CPF de primatas (UYLINGS et al., 2003). As porções que compõem o CPF em roedores podem ser simplificarmente divididos em duas principais porções: uma porção medial (córtex pré-frontal medial – CPFm, abrangendo a área frontal 2 e áreas cínguladas anteriores ventral e dorsal, área pré-límbica, infra-límbica e a área orbital medial), e a outra porção lateral e ventral (compreendendo a área insular agranular dorsal, área insular anterior ventral, áreas orbitais lateral e ventral (DALLEY et al., 2004).

Apesar de ter sido considerada uma estrutura homogênea por muito tempo, estudos histoquímicos e de conectividade revelam que o CPF, na verdade, representa um grupo de regiões estruturalmente e funcionalmente distintas; lesões envolvendo o CPFm levam a prejuízos comportamentais em tarefas que demandam de memória de trabalho espacial (KOLB et al., 1974; RAGOZZINO et al., 1998), atenção (MUIR et al., 1996; CHUDASAMA E ROBBINS, 2003), tomada de decisão (HADDON E KILLCROSS, 2006), habituação (KOLB et al., 1974), entre outras. Ao passo que lesões envolvendo a porção ventral/lateral do CPF leva a prejuízos em comportamentos de alimentação (KOLB E NONNEMAN, 1975), impulsividade (MOBINI et al., 2002; WINSTANLEY et al., 2004), memória de trabalho associada ao odor e sabor (OTTO E EICHENBAUM, 1992; SCHOENBAUM E SETLOW, 2001), entre outros comportamentos.

Diversos estudos apontam para um papel seletivo do CPFm na consolidação e evocação de memórias remotas (memórias adquiridas em um passado distante – ao menos algumas semanas) (BONTEMPI et al., 1999; FRANKLAND et al., 2004; MAVIEL, 2004; TAKASHIMA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006). Entretanto, outros trabalhos apresentam evidências de que o CPFm possa, também, desempenhar papel importante no processamento de memórias recentes (informações adquiridas há 1 ou 2 dias) (SEAMANS et al., 1995; NARAYANAN E LAUBACH, 2006; CORCORAN E QUIRK, 2007). Enquanto outros autores defendem que o CPFm trata-se de um sítio encefálico que desempenha papel essencial em ambas as memórias; recentes e remotas (BLUM et al., 2006; QUINN et al., 2008).

Mais recentemente, diversos estudos tem evidenciado que essa região apresenta lateralização anatômica e funcional; Costa e colaboradores (2016) demonstraram que o CPFm apresenta lateralização funcional na modulação de estados ansiogênicos em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE); a estimulação do do CPFm direito induziu comportamentos ansiogênicos, enquanto que a estimulação do hemilateral esquerdo não alterou o comportamento dos animais. Ademais, os autores notaram que o a inativação transitória do CPFm direito produz um efeito ansiolítico nos animais expostos ao LCE, ao passo que inativação do contralateral induziu estados ansiogênicos. Tais resultados sugerem que o hemisfério direito e esquerdo do CPFm desempenham papéis oponíveis na expressão de comportamentos ansiogênicos/ansiolíticos em roedores. Sullivan e Gratton (2002) encontraram resultados muito similares, em que animais com lesão no CPFm direito passaram mais tempo explorando os braços abertos no LCE comparado aos animais controle ou com lesão no CPFm esquerdo. Em consonância com

tais resultados, outros estudos apontam que o hemisfério esquerdo do CPFm é mais susceptível aos níveis plasmáticos de corticosterona, e por consequência também ao estresse (CERQUEIRA et al., 2008).

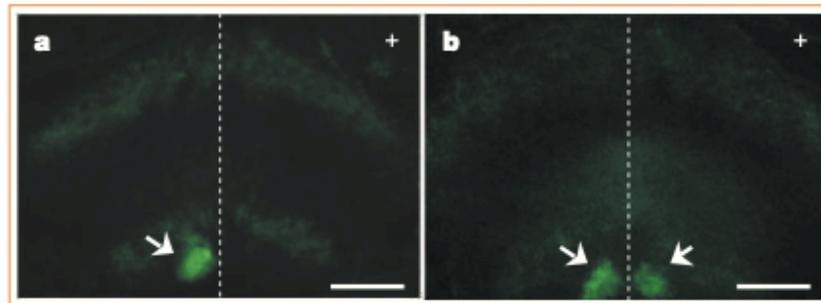
Atualmente é um consenso que a lateralização funcional está presente em todo subfilo dos vertebrados (WARD E HOPKINNS, 1993; ANDREW, 1991; RODGERS, 2002; FRASNELLI, 2013). Possuir um encéfalo lateralizado pode conferir diversas vantagens, tais como: (i) poupar tecido nervoso evitando assim duplicação de funções em ambos hemisférios (LEVY, 1977), (ii) evitar processamento paralelo de informações (RODGERS, 2002), (iii) prevenir a evocação de respostas simultâneas conflitantes (um hemisfério controlando todas as ações de seu contralateral – condição especialmente presente em animais com órgãos sensoriais posicionados lateralmente) (ANDREW, 1991; VALLORTIGARA, 2000).

No que tange a memória, alguns estudos aponta evidências de que essa função encefálica também é passível de lateralização funcional (PASCUAL et al., 2004; GOTO et al., 2010; SHIPTON et al., 2014) . Pascual e colaboradores (2004) estudando moscas da fruta *Drosophila melanogaster* observaram que esses animais, naturalmente possuem um encéfalo assimétrico e essa condição anatômica parece ser essencial para aquisição e evocação de memória remotas. Moscas com encéfalo assimétrico (presença da estrutura denominada “corpo assimétrico” em apenas um hemisfério) eram capazes de adquirir e evocar tanto memórias recém adquiridas, quanto as remotamente produzidas sem prejuízos. Enquanto que moscas com simetria encefálica (presença do corpo assimétrica em ambos hemisférios) eram incapazes de evocar memórias remotamente adquiridas, ao passo que memórias recentes mostravam-se intactas (Figura 1).

Especificamente em roedores, Shipton e colaboradores (2014) observaram que a memória pode ser modulada de maneira diferente pelos hemisférios hipocampais. Nesse estudo, os autores silenciaram a região CA3 do hipocampo dorsal usando de técnicas optogenéticas e observaram que o ao silenciar o hemisfério direito ou esquerdo a evocação de memórias recentemente adquiridas era prejudicadas, sem distinção entre os hemilaterais. Interessantemente, quando avaliaram a capacidade dos animais evocarem memórias remotamente adquiridas, apenas os animais com hemisfério esquerdo silenciado tiveram um desempenho comprometido, enquanto animais com o hemisfério direito silenciado evocavam as memórias tão bem quanto grupo controle. Tais dados sugerem que a memória pode não ser apenas uma função cognitiva lateralizada, como também possuir um processamento assimétrico dependente de tempo, uma vez que

memórias recém adquiridas parecem não serem lateralizadas, enquanto as remotamente adquiridas sim.

Figura 1. Possíveis anatomias encefálicas encontradas em *Drosophila melanogaster*. A imagem de microscopia confocal mostrando o corpo assimétrico (seta) em padrão encontrado em animais selvagens, marcado com anticorpo anti-Fasil. B imagem do encéfalo de algumas moscas que naturalmente apresentam padrão simétrico (presença de corpo assimétrico em ambos os hemisférios). Linha pontilhada na imagem A e B indicam a linha média encefálica. Escala de 20 μm .



Adaptado de (PASCUAL et al., 2004).

Considerando que o CPFm é uma estrutura chave para o processamento de memórias episódicas e que trata-se de um sítio passível de lateralização funcional; somando-se as evidências de que a memória pode apresentar processamento lateralizado dependente de tempo, o presente experimento teve como objetivo avaliar a contribuição do CPFm no processamento de memórias episódicas recém e remotamente adquiridas. Pela primeira vez, um estudo teve como objetivo investigar se o CPFm também desempenha uma função lateralizada no processamento (aquisição, consolidação e recuperação) de memórias episódicas adquiridas recente ou remotamente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Os animais empregados nesse experimento foram submetidos às mesmas condições descritas no item 2.1. do Capítulo 2.

2.2. Drogas

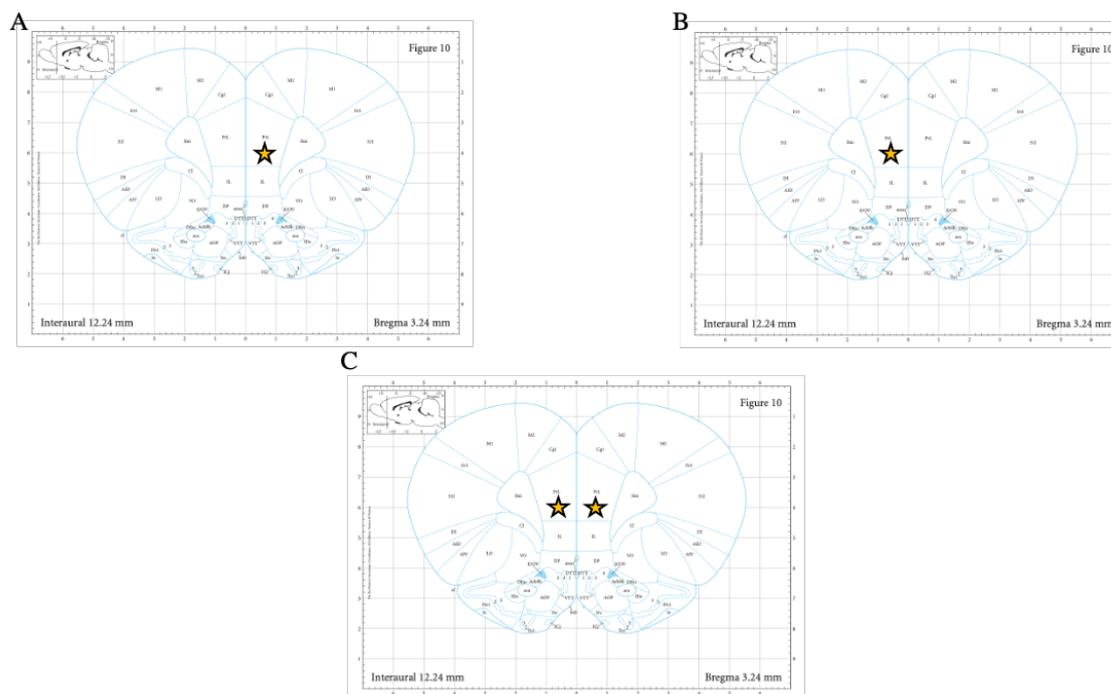
As drogas empregadas nesse experimento foram exatamente as mesmas conforme descrito no item 2.2. do Capítulo 2.

2.3. Procedimentos cirúrgicos

O procedimento cirúrgico adotado nesse experimento foi exatamente o mesmo descrito previamente no item 2.3. do Capítulo 2. Exceto pelas coordenadas estereotáxicas específicas para lesão do CPFm, agora utilizando as seguintes medidas: AP: - 6,00 mm (a partir do bregma), ML: $\pm 5,5$ mm (a partir da linha média) e DV: -7,5 mm (a partir da superfície do crânio).

Foram considerados como “acerto” cirúrgico, animais nos quais a lesão cortical envolveu a região de córtices pré-límbico e infralímbico (Figura 2). Animais que receberam injeções em outras regiões encefálicas foram removidos da amostra experimental. Ao final desse capítulo, na seção 8. Anexos, é possível observar o perfil de lesões neuronais produzidas (Itens 8.1.; 8.2. e 8.3.).

Figura 2. Sítios de injeção. A imagem é uma representação esquemática dos sítios de injeção considerados corretos no procedimento de lesão do córtex pré-frontal medial. Utilizando-se das coordenadas estereotáxicas (AP: +3,1; ML: $\pm 0,7$ e DV: -4,0), foram considerados acertos cirúrgicos quando a droga foi infundida nas regiões do córtices pré-límbico e infralímbico. A figura 2A representa o sítio de injeção no hemisfério esquerdo do córtex pré-frontal medial. A figura 2B representa o sítio de injeção no hemisfério direito do córtex pré-frontal medial. E a figura 2C representa os sítios de injeções bilaterais no córtex pré-frontal medial.



A figura foi criada pela autora utilizando-se de imagens retiradas do livro *The rat brain atlas in stereotaxic coordinates* dos autores George Paxinos e Charles Watson, 6ª ed, 2005.

2.4. Delineamento experimental

Para esse experimento, foram utilizados 36 indivíduos divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

Grupo veículo (G_{Ve}, n=9): Os animais foram utilizados como controle cirúrgico. Dessa forma, apesar de passarem pela cirurgia, receberam apenas uma injeção de tampão fosfato - salino (PBS) em ambos os córtices pré-frontal mediais (CPF_m);

Grupo CPF_m-Di (n=9): Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico com uma injeção de ácido ibotênico (IBO) no CPF_m direito, lesionando-o permanentemente e uma injeção de PBS no CPF_m esquerdo, como controle cirúrgico;

Grupo CPF_m-Es (n=9): Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico com uma injeção de IBO no CPF_m esquerdo, lesionando-o permanentemente e uma injeção de PBS no CPF_m direito, como controle cirúrgico;

Grupo CPF_m-Bi (n=9): Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico com injeção bilateral de IBO em ambos os córtices pré-frontal mediais lesionando-os permanentemente.

2.5. Paradigmas comportamentais

Os protocolos comportamentais foram exatamente os mesmos para todos os experimentos realizados nesse estudo. Assim, a descrição contida no item 2.5. do Capítulo 2 também descreve todos os procedimentos realizados para esse experimento.

2.6. Histologia

Os procedimentos histológicos empregados nesse experimento foram exatamente os mesmos descritos no item 2.6. do Capítulo 2.

2.7. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *software Prism* (StatSoft Inc., Tulsa, OK – EUA). Os dados obtidos por meio do LAM (latência de escape e tempo de retenção em ambos os *probe trials* 1 e 2) foram submetidos a análise de variância

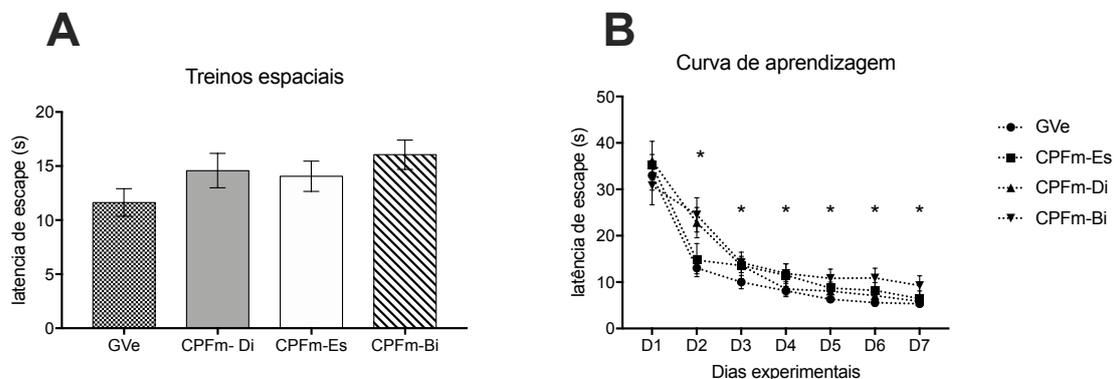
(ANOVA – *one way*) para medidas repetidas (fator principal: tratamento experimental – GVe, CPFm-Di, CPFm-Es e CPFm-Bi) seguido pelo procedimento de Benjamini, Krieger e Yekutielle (BKY) quando uma diferença estatisticamente significante era apontada. Enquanto que os dados referentes à curva de aprendizagem foram submetidos a ANOVA – *two ways* (fator 1: tratamento experimental e fator 2: tempo) seguido do procedimento de BKY. Os dados de porcentagem de escolhas corretas no labirinto em T forçado foram analisados por meio de ANOVA - *one way* de medidas repetidas (sendo o tratamento experimental o principal fator – GVe, CPFm-Di, CPFm-Es e CPFm-Bi) seguido pelo procedimento de BKY; enquanto os dados dos *probe trials* foram submetidos ao teste de Friedman. A curva de aprendizagem referente aos treinos espaciais do labirinto em T forçado foi analisada por meio de ANOVA – *two ways* (fator 1: tratamento experimental e fator 2: tempo) seguida pelo procedimento de BKY. Todos os dados obtidos no teste de reconhecimento de objetos foram submetidos a ANOVA – *one way* de medidas repetida, sendo o tratamento experimental o principal fator.

3. RESULTADOS

3.1. Labirinto aquático de Morris

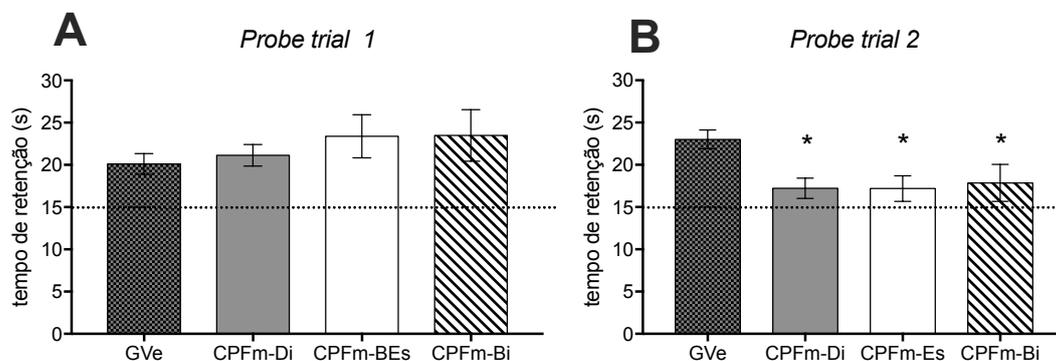
ANOVA *one way* de medidas repetidas indicou ausência de efeito entre os grupos experimentais quando comparou-se a latência de escape ($F_{(3,248)}= 1,7$ e $P=0,17$ – Figura 3A). Os mesmos dados de latência de escape foram organizados em uma curva de aprendizagem, baseada nas médias diárias de cada grupos experimental. ANOVA *two ways* (fator 1: tratamento experimental e fator 2: dias experimentais) detectou efeito para o fator tempo ($F_{(6,192)}=94,3$ e $P<0,0001$), entretanto nenhum efeito foi observado para o fator tratamento ($F_{(3,32)}=1,92$ e $P=0,15$ – Figura 3B). A análise apontou ausência de interação entre os fatores ($F_{(18,192)}=1,5$ e $P=0,11$). Análise de comparação múltipla (procedimento BKY) indicou um diferença estatisticamente significativa entre o primeiro dia experimental (D1) e todos os demais dias experimentais (D2 ao D7) para todos os grupos.

Figura 3. Desempenho nos treinos espaciais. Imagem 3A apresenta ao tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa ao longo dos 35 treinos espaciais no LAM. As barras representam a média \pm E.P.M. N=9 por grupo, ANOVA *one way*. A imagem 3B apresenta o tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma em cada dia do protocolo experimental do LAM. Cada ponto representa a média diária de latência de escape \pm E.P.M. N=9 por grupo. * $p < 0,005$ vs. D1 de cada grupo experimental. ANOVA *two ways* (fator 1: tratamento e fator 2: tempo) seguida do procedimento de BKY.



Em relação aos *probe trials*, ANOVA *one way* revelou que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais durante o primeiro *probe trial* (GVe= 20,1 \pm 1,2; CPFm-Di= 21,1 \pm 1,3; CPFm-Es= 23,4 \pm 2,5; CPFm-Bi= 23,5 \pm 3; $F_{(3,32)} = 0,6$ e $P = 0,62$ – Figura 4A). Ao passo que para o *probe trial 2* (realizado no 38º dia experimental) ANOVA *one way* revelou a presença de efeito quando comparou o tempo de retenção entre os grupos (GVe= 23 \pm 1,1; CPFm-Di= 17,2 \pm 1,5; CPFm-Es= 17,2 \pm 1,1; CPFm-Bi= 17,9 \pm 2,2; $F_{(3,32)} = 3,23$ e $P = 0,035$ – Figura 4B). O procedimento de BKY indicou que todos os grupos experimentais diferiram significativamente do GVe.

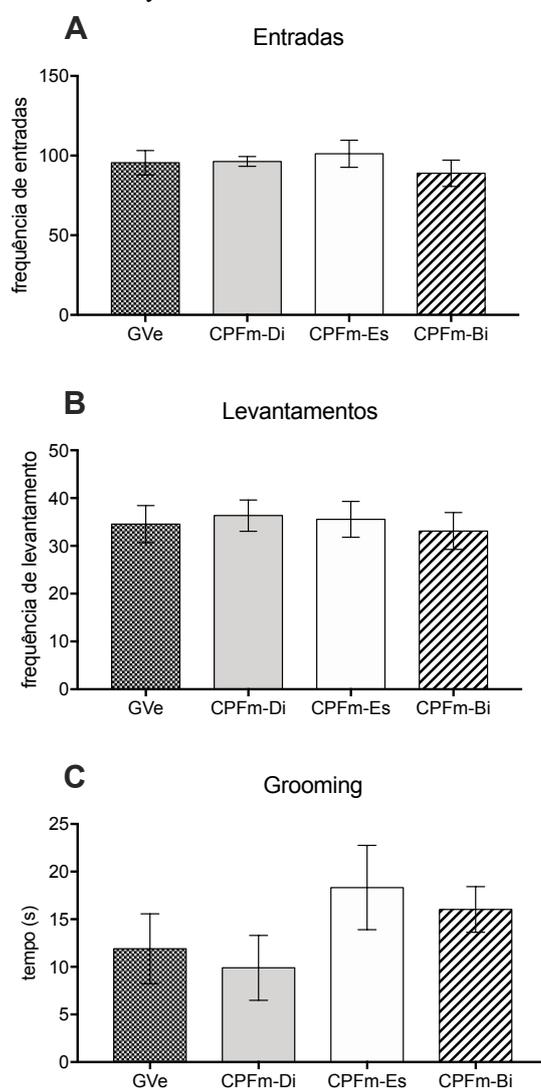
Figura 4. Tempo de retenção nos *probe trials*. Os gráficos mostram o tempo médio nadando sobre o quadrante que continha previamente a plataforma submersa durante o *probe trial 1* (3A) e *probe trial 2* (3B). As barras representam a média \pm E.P.M. n=9 por grupo, ANOVA *one way*. * $p < 0,005$ comparado ao GVe. As linhas pontilhadas indicam o tempo de natação ao acaso (25%). ANOVA *one way* seguida do procedimento de BKY.



3.2. Teste de reconhecimento de objetos

Os dados de exploração e locomoção obtidos durante a primeira sessão de habituação ao aparato experimental do teste de reconhecimento de objetos estão apresentados na figura 5.

Figura 5. Parâmetros locomotores e exploratórios. A figura 5A apresenta a frequência total de entradas nos quadrantes do aparato de campo aberto durante a primeira sessão de habituação dos animais. A figura 5B apresenta a frequência média de levantamentos no aparato de campo aberto. A figura 5C apresenta o tempo médio que os animais passaram realizando o comportamento de *grooming* durante a habituação ao campo aberto. As barras representam a média de frequência tempo \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *one way* ordinária.



ANOVA *one way* indicou ausência de efeito entre os grupos experimentais durante a sessão de familiarização ($F_{(7,64)} = 0,49$ e $P = 0,84$ – Figura 6A). O tempo médio explorando cada um dos objetos idênticos está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Média de tempo explorando objetos idênticos durante a sessão de familiarização no teste de reconhecimento de objetos.

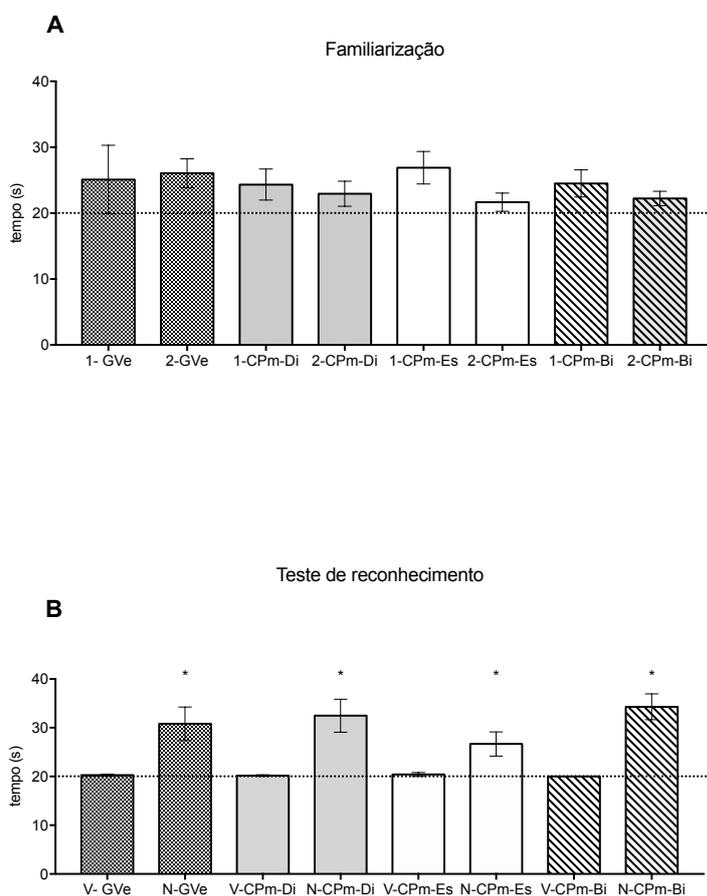
Grupo Experimental	Objeto 1	Objeto 2	Valor de P
Grupo Veículo	25,1 ± 5,2 (s)	26,1 ± 2,2 (s)	0,8
Grupo CPFm-Di	24,3 ± 2,4 (s)	22,9 ± 1,9 (s)	0,7
Grupo CPFm -Es	26,9 ± 2,5 (s)	21,7 ± 1,4 (s)	0,2
Grupo CPFm -Bi	24,5 ± 2,1 (s)	22,2 ± 1,1 (s)	0,5

Para a sessão de teste de reconhecimento propriamente dita, ANOVA *one way* indicou efeito significativo quando comparou o tempo que os animais passaram explorando o objeto desconhecido contra o tempo explorando o objeto ao qual foram familiarizados previamente ($F_{(7,56)} = 8,0$ e $P = 0,0023$ – Figura 6B). O procedimento de BKY indicou que tal efeito foi observado para todos grupos experimentais, sendo que o tempo de exploração do objeto novo superou o tempo de exploração do familiarizado (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo médio explorando o objeto velho (previamente apresentado na sessão de familiarização) e o objeto novo (apresentado no teste de reconhecimento de objeto).

Grupo Experimental	Objeto Velho	Objeto Novo	Valor de P
Grupo Veículo	20,3 ± 0,2 (s)	30,8 ± 3,4 (s)	0,019
Grupo CPFm-Di	20,2 ± 0,2 (s)	32,5 ± 3,4 (s)	0,008
Grupo CPFm-Es	20,4 ± 0,4 (s)	26,7 ± 2,5 (s)	0,045
Grupo CPFm-Bi	20,0 ± 0,0 (s)	34,3 ± 2,7 (s)	0,001

Figura 6. Teste de reconhecimento de objetos. A figura 6A apresenta o tempo em segundos que os animais passaram explorando os objetos idênticos (1 e 2) apresentados durante a etapa de familiarização. A figura 6B apresenta a média de tempo (s) que os animais passaram explorando o objeto com o qual foram familiarizados (velho – V) e o novo objeto (N) apresentado durante o teste de reconhecimento. As barras representam a média de tempo \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P < 0,005$ compara ao tempo explorando o objeto velho de cada grupo. A linha pontilhada representa o tempo mínimo de 20 segundos estipulado para explorar cada objeto.



Quanto ao tempo que os animais levaram para atingir o critério de finalização da tarefa (explorar cada objeto por ao menos 20 segundos cada), ANOVA *one way* de medidas repetidas indicou ausência de efeito entre os grupos experimentais ($F_{(7,64)}=0,78$ e $P=0,6$ – Tabela 3).

Tabela 3. Tempo médio (em segundos) que os animais levaram para atingir o critério da tarefa.

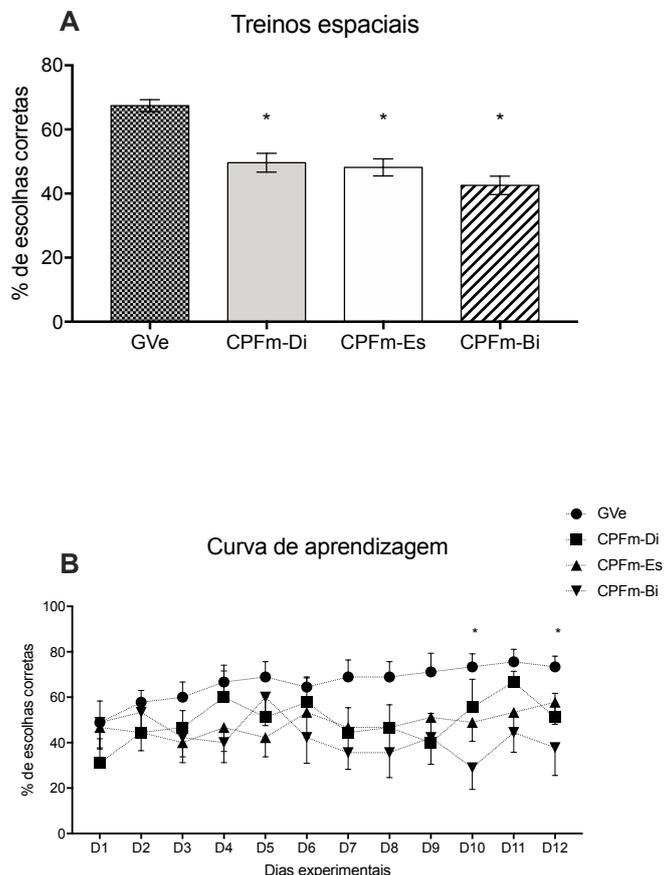
Grupo Experimental	Familiarização	Teste de reconhecimento	Valor de P
Grupo Veículo	235,1 \pm 37,0 (s)	207,2 \pm 23,6 (s)	0,45 (s)
Grupo CPFm-Di	160,8 \pm 14,4 (s)	196,4 \pm 27,5 (s)	0,33 (s)
Grupo CPFm -Es	224,8 \pm 31,2 (s)	180,8 \pm 18,0 (s)	0,23 (s)
Grupo CPFm -Bi	211,6 \pm 34,2 (s)	195,2 \pm 20,6 (s)	0,67 (s)

3.3. Labirinto em T forçado

Referente aos dados obtidos durante os treinos espaciais, ANOVA *one way* de medidas repetidas indicou efeito quando comparou a porcentagem média de escolhas corretas ($F_{(3,428)}=16,8$ e $P<0,0001$ – Figura 7A). O procedimento de BKY indicou que os grupos CPFm-Di, CPFm-Es e CPFm-Bi apresentarem porcentagem média de acertos significativamente menor do que o grupo veículo (GVe= $67,4 \pm 1,8\%$; CPFm-Di= $49,6 \pm 2,6\%$; CPFm-Es= $49,6 \pm 2,9\%$; CPFm-Bi= $42,6 \pm 2,9\%$; $P<0,0001$).

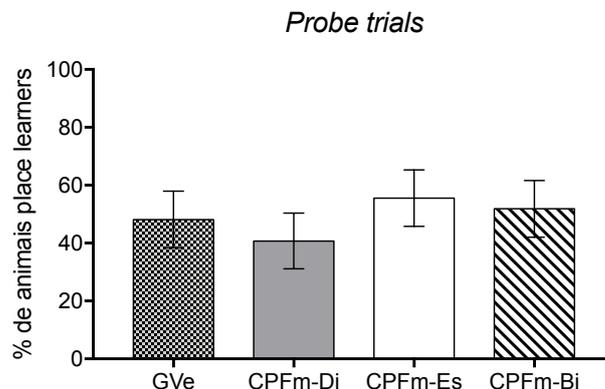
Os dados de porcentagem de escolhas corretas também foram usados para a construção de uma curva de aprendizagem (Figura 7B) com as médias diárias de acertos. ANOVA *two ways* (fator 1: tratamento e fator 2: dias experimentais) apontou presença de efeito para o fator tratamento ($F_{(3,32)}=7,6$ e $P<0,0001$), o procedimento de BKY revelou que o efeito deu-se principalmente nos dias 10 e 12 do protocolo, em que o grupo CPFm-Bi diferiu do GVe. Entretanto, nenhum efeito foi observado para o fator tempo ($F_{(11,352)}=1,33$ e $P=0,21$), assim como não houve evidências de interação entre os fatores ($F_{(33,352)}=1,05$ e $P=0,4$).

Figura 7. Desempenho durante os treinos espaciais. As imagens a seguir apresentam a média de porcentagem de escolhas corretas (entradas no braço com reforço alimentar acessível) como média total dos 60 treinos espaciais (7A) ou como médias diárias (7B). Para a imagem 7A, as barras representam a média de tempo \pm E.P.M.. N=9 por grupo experimental. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P < 0,005$ compara ao GVe. Na imagem 7B, os pontos representam médias diárias de escolhas corretas \pm E.P.M. N=9 por grupo experimental. ANOVA *two ways* (fator 1: tratamento e fator 2: tempo) seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P < 0,005$ entre GVe e CPFm-Bi.



Os resultados oriundos das três sessões de *probe trials* no labirinto em T estão sintetizados na figura 8. O teste de Friedman apontou ausência de efeito entre os grupos experimentais ($H_1 = 1,18$ e $P = 0,76$). Apenas $48,2 \pm 9,8\%$ dos animais do GVe foram classificados como *place learners*, enquanto CPFm-Di, CPFm-Es e CPFm-Bi apresentaram $40,7 \pm 9,6\%$; $55,6 \pm 9,7\%$ e $51,9 \pm 9,8\%$, respectivamente.

Figura 8. Porcentagem de animais *place learners*. O gráfico apresenta a porcentagem média de animais classificados como *place learners* durante as três sessões de *probe trials*. As barras representam a média \pm E.P.M. N=9 por grupo. Teste de Friedman.



4. DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizamos ácido ibotênico como indutor de lesões excitotóxicas permanentes no córtex pré-frontal medial (CPFm – córtices pré-límbico e infralímbico). Os resultados não apresentaram nenhuma evidência de lateralização funcional do CPFm, ainda que ambos CPFm pareçam desempenhar papéis importantes na aprendizagem e processamento de memórias. No labirinto em T, animais com algum tipo de lesão: unilateral (direita ou esquerda) ou bilateral apresentaram porcentagem de escolhas corretas inferior ao grupo veículo durante os treinos espaciais, indicando que esses animais apresentaram desempenho comprometido durante a aquisição da tarefa. No labirinto aquático de Morris (LAM), os animais não apresentaram prejuízos durante os treinos espaciais (dias 1 ao 7), nem durante a avaliação da memória recentemente adquirida (*probe trial* - dia experimental 8); entretanto, animais com lesão no CPFm (direita, esquerda ou bilateral) apresentaram tempo de retenção menor durante o segundo *probe trial* comparado ao grupo veículo (*probe trial* 2 – 38º dia experimental); indicando que essa região pode desempenhar papel importante na evocação de memória remotamente adquiridas.

Por muito anos acreditou-se que as assimetrias anatômicas e funcionais do encéfalo fossem uma exclusividade humana. Atualmente, existem evidências suficientes para de que tais assimetrias estão presentes em todo subfilo dos vertebrados e em muitos invertebrados, sugerindo uma possível conservação dessa característica que pode conferir algumas vantagens (MCGREW E MARCHANT, 1999; GÜNTÜRKÜN et al., 2000;

RODGERS, 2002). Acredita-se que a lateralização funcional possa “poupar o uso desnecessário de tecido nervoso”, evitando a duplicação de funções em ambos hemisférios. Isso poderia prevenir o processamento paralelo de informações, o que reduziria a probabilidade do animal emitir respostas incompatíveis diante do mesmo estímulo (ANDREW, 1991; ROGERS, 1996; VALLORTIGARA et al., 1999; ROGERS et al., 2004). Outrossim, possuir um encéfalo lateralizado permite ao animal ser mais eficiente no processamento de informações com origens distintas o que é essencial para a resolução de tarefas como a navegação espacial, aprendizagem e memorização.

Ainda que alguns estudos recentes reforcem a ideia de que o CPFm trata-se de uma estrutura com lateralização funcional para o processamento de estados ansiolíticos e ansiogênicos (CLARK E MANES, 2004; COSTA et al., 2016), nossos dados não indicaram qualquer evidência de lateralização funcional dessa estrutura no processamento de memórias episódicas (aquisição, consolidação e evocação) de memórias recentes ou remotas. Poucos estudos se propuseram a investigar a lateralização no processamento de memórias episódicas; entretanto Stevenson (2011), estudando medo condicionado em ratos, observou que o córtex pré-límbico é uma estrutura essencial para que o condicionamento ocorra, mas nenhuma evidência de lateralização funcional dessa estrutura foi observada.

Considerando que memórias episódicas são eventos biológicos altamente complexos envolvendo diversos componentes (YONELINAS, 2001), tais como informações contextuais, espaciais, objetos e odores, é possível que a compartimentalização (lateralização) dessa função seja biologicamente incompatível com seu processamento. Sabe-se que o CPFm age como um filtro, controlando aspectos cognitivos e selecionando a evocação de conteúdos de informações armazenadas em regiões distintas do neocórtex, de acordo com a natureza do conteúdo armazenado (PRESTON E EICHENBAUM, 2013). Assim, é parcimonioso conjecturar que a lateralização da evocação de memórias episódicas, compostas por diversos fatores difusamente distribuídos pelo neocórtex, seja biologicamente inviável, dado a diversidade de conteúdos envolvidos em uma única memória episódica. Possivelmente, o processamento de aspectos cognitivos tais como tomada de decisão e a expressão de estados ansiolíticos/ansio-gênicos sejam passíveis de lateralização funcional, uma vez que possuem menos componentes envolvidos e conseqüentemente menor quantidade de regiões encefálicas associadas, o que permite sua compartimentalização e por conseguinte sua otimização (CLARK E MANES, 2004; CERQUEIRA et al., 2008; COSTA et al., 2016).

Os dados obtidos no LAM demonstraram que os grupos experimentais apresentaram latência de escape similar durante os treinos espaciais. O que indica que animais com lesões uni ou bilaterais no CPFm aprenderam a localizar a plataforma submersa sem prejuízos, evidenciando que essa região possivelmente não desempenha papel medular na aprendizagem de informações espaciais. De Bruin e colaboradores (1994) e Sullivan & Gratton (2002a) encontraram resultados similares a esses; lesões bilaterais do CPFm não alterou a capacidade do animal localizar a plataforma submersa no LAM. Ademais, a inativação dessa região não afetou a habilidade dos animais aprenderem uma tarefa espacial no labirinto em cruz e na versão seca do LAM (labirinto de Barnes), como foi descrito por Ragozzino e colaboradores (RAGOZZINO et al., 1999). Entretanto, não são todos os estudos que encontraram evidências consoantes com os supracitados; no trabalho publicado por Wang & Cai (WANG E CAI, 2008), os autores observaram que inativações – usando muscimol – de ambos os córtices pré-límbicos aumentou a latência de escape sem comprometer a capacidade de locomoção dos animais. Ainda, Stevenson (2011), estudando a contribuição da amígdala basolateral e do córtex pré-límbico em paradigmas de condicionamento ao medo, observaram que a inativação bilateral do córtex pré-límbico prejudicou a expressão do medo condicionado, mas não se observou efeitos quando a inativação era unilateral (direito ou esquerdo).

Em relação aos dados do *probe trial* do LAM, todos os grupos apresentaram desempenho similar no *probe trial 1*; sobrenadaram o quadrante “correto” por mais de 15 segundos, evidenciando a persistência do animal em sobrenadar o quadrante que continha a plataforma submersa previamente. Surpreendentemente, quando testados 30 dias após o primeiro *probe trial* (*probe trial 2*), todos os grupos com alguma lesão no CPFm (direito, esquerdo ou bilateral) apresentaram tempo de retenção inferior ao do grupo veículo. Tais dados faz levantar a hipótese de que o CPFm é uma estrutura chave para a evocação de memórias remotamente adquiridas (adquiridas há 30 dias), enquanto não parece ser crucial para evocação de memórias recém adquiridas, ainda que nenhuma evidência de lateralização funcional tenha sido observada.

No labirinto em T forçado, observamos que os animais com lesões no CPFm, unilateral ou bilateral, apresentaram porcentagem de escolhas corretas inferior ao grupo tratado com veículo. Novamente, nenhuma evidência de lateralização funcional foi observada, ainda que essa região parece ser determinante para a aquisição apropriada dessa tarefa. Alguns autores relatam que, em paradigmas baseados na localização de reforço alimentar, há uma intensa ativação de neurônios localizados no CPFm, evidenciando a participação dessa

região no processo de aquisição de tarefas dessa natureza (TSE et al., 2011; WANG; TSE; MORRIS, 2012). Assim, nossos dados corroboram tais estudos, uma vez que lesões no CPFm prejudicaram a capacidade dos animais de localizar o reforço alimentar. Ademais, os mesmos autores relatam prejuízos na capacidade dos animais evocarem memórias recentes e remotas nesse paradigma, quando o CPFm foi inativado farmacologicamente.

Os dados referentes aos *probe trials* no labirinto em T forçado foram inconclusivos, uma vez que a maior parte dos animais do grupo tratado com veículo (GVe) adotaram uma estratégia egocêntrica de navegação e a heterogeneidade dentro do grupo foi muito elevada.

O teste de reconhecimento de objetos trata-se de um paradigma importante para avaliação da memória em roedores (DERE et al., 2005; BEVINS E BESHEER, 2006; ENNACEUR, 2010). E fundamenta-se na tendência natural que os roedores possuem de procurarem e explorarem novas informações contextuais (BERLYNE et al., 1966; BARNETT E COWAN, 1976; ENNACEUR E MELIANI, 1988). O procedimento padrão desse teste é empregado para avaliar a memória de reconhecimento em uma escala de tempo relativamente curta (dentro de minutos ou horas – BLASER E HEYSER, 2015). Diante disso, adotamos um protocolo padronizado publicado por Leger e colaboradores (2013).

Nessa tarefa, espera-se que animais sem prejuízos aproximem-se com mais frequência e por mais tempo dos objetos desconhecidos comparado aos objetos aos quais já foram apresentados previamente durante a sessão de habituação. A preferência pelo objeto novo implica na existência de uma representação do objeto familiarizado na memória do animal (ENNACEUR, 2010). Nossos dados mostraram que, usando um intervalo de 24 horas entre sessão de familiarização e teste de reconhecimento, lesões no CPFm (uni ou bilaterais) não afetaram a capacidade dos animais reconhecerem o objeto familiarizado; uma vez que todos os grupos experimentais lesionados (CPFm-Di, CPFm-Es e CPFm-Bi) apresentaram desempenho similar ao grupo tratado com veículo (GVe); explorando o objeto novo por mais tempo comparado ao objeto familiarizado.

O substrato neuroanatômico que sustenta a ocorrência apropriada da memória de reconhecimento parece depender tanto de regiões hipocâmpicas quanto corticais (CLARK et al., 2000; BUCKMASTER, 2004). Diversos estudos têm destacado a importância do córtex perirrinal (AGGLETON et al., 2010) e do lobo temporal medial que parecem ser estruturas essenciais para que a memória de reconhecimento ocorra apropriadamente (HAMMOND et al., 2004; ALBASSER et al., 2009), além das áreas adjacentes a

formação hipocampal, tais como córtices entorrinal e para-hipocampal (HAMMOND et al., 2004). Tais estruturas (córtices perrinal e para-hipocampal) são altamente integradas entre si, no entanto, o córtex perrinal parece desempenhar papel mais determinante na memória de reconhecimento recém adquirida, ao passo que o hipocampo parece ser responsável pela memória de reconhecimento remota (REGER et al., 2009).

Ennaceur e colaboradores (ENNACEUR et al., 1997) avaliaram a papel do CPFm na memória de reconhecimento. Usando um composto neurotóxico (não especificado no trabalho) os autores induziram lesões bilaterais no CPFm dos animais e observaram que a memória de reconhecimento dos mesmos estava comprometida. Apesar de os autores terem lesionado as mesmas regiões encefálicas que foram objeto de estudo nesse trabalho, existem diferenças importante entre os protocolos experimentais adotados: (i) a sessão de familiarização realizada pelos autores durava três minutos padronizados, independente do critério por nós adotados de explorarem os objetos por ao menos 20 segundos cada; (ii) a sessão de teste ocorria 1 ou 15 minutos após a sessão de familiarização.

Gámiz e Gallo apontaram a importância da duração do intervalo entre sessões de familiarização e de teste; uma vez que observaram que ratos idosos apresentavam memória de reconhecimento comprometida quando o intervalo entre as sessões de familiarização e teste foi de 24 horas; ao passo que nenhum prejuízo foi observado quando o intervalo adotado foi menor do que 24 horas (GÁMIZ E GALLO, 2012). Outros pesquisadores encontraram resultados similares (BARTOLINI et al., 1996; ENNACEUR et al., 1997; DE LIMA et al., 2005; DIAS et al., 2007; BURKE et al., 2010). Isto posto, é possível que os resultados destoantes entre nosso trabalho e o de Ennaceur e colaboradores (ENNACEUR et al., 1997) seja por conta dessas divergências entre os protocolos experimentais. Considerando o papel importante que o córtex peririnal e áreas associadas desempenham na memória de reconhecimento, é possível que nossos animais, ainda que com lesões no CPFm, não apresentaram prejuízos nessa tarefa devido ao fato de ainda possuírem essas regiões supracitadas preservadas.

Já é bem sedimentado na comunidade acadêmica que o CPFm desempenha papel importante nos processos cognitivos tais como tomada de decisão, aprendizagem baseada em recompensa e detecção de erro (HOLROYD et al., 2002; BOTVINICK et al., 2004; BECHARA E DAMASIO, 2005; RUSHWORTH et al., 2011). No que tange à memória, alguns autores destacam a relação entre o CPFm e o processamento de memória de trabalho (NARAYANAN E LAUBACH, 2006); outros em relação a memória recém adquirida (adquirida há 1 ou 2 dias - 2007), entretanto a maioria dos estudos apontam para

a relação entre o CPFm e a modulação de memórias remotamente adquiridas (BONTEMPI et al., 1999; FRANKLAND et al., 2004; TAKASHIMA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006). Tais evidências contrastantes pode ser devido ao fato de que sempre há demanda do CPFm quando o contexto é um componente chave que orienta comportamentos essenciais para a tarefa em questão, o que pode correr tanto durante a aquisição dessa e/ou durante evocação de memórias recém ou remotamente adquiridas (EUSTON et al., 2012).

A consolidação é um processo pós-experiência que estabiliza traços mnemônicos (EUSTON et al., 2012) e envolve a reorganização em dois níveis: sináptico (ocorrendo dentro de horas após o treino) e sistêmico (DUDAI, 2004). A consolidação sistêmica trata-se de um processo longo, baseado na reestruturação de estruturas encefálicas para oportunizar a retenção de memórias (SQUIRE E KANDEL, 1999; LEDOUX, 2001; DUDAI, 2004). Perspectivas mais contemporâneas da consolidação sistêmica de memórias sugerem que o hipocampo atua como um sitio temporário de armazenamento de experiências recém adquiridas; enquanto a consolidação permanente dessas depende de redes neurais amplamente distribuídas pelo córtex encefálico (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005). Assim, memórias recém adquiridas seria dependentes do hipocampo e, ao longo de seu processo de consolidação, tornar-se-iam cortico-dependentes; ao passo que regiões corticais, tais como o CPFm, seriam o sítio de acomodação das redes neurais responsáveis pelo armazenamento a longo prazo dessas memórias episódicas (FRANKLAND E BONTEMPI, 2005; EUSTON et al., 2012). Segundo essa proposta, a consolidação mnemônica é um processo reorganizacional dependente de tempo, como postulado pela Lei de Ribot (RIBOT, 1882).

Diversos trabalhos apresentam evidências que reforçam essa hipótese de reorganização de memórias dependente de tempo. Maviel e colaboradores (2004), assim como Frankland e colaboradores (2004), observaram que a inativação do CPFm prejudicou a evocação de memórias espaciais remotas, ao passo que medo recém condicionado ao contexto foi evocado sem prejuízos. Outro estudo interessante, investigando a atividade neuronal por meio da expressão da proteína c-fos, demonstrou que o córtex cingulado anterior (CCA - outra sub-região do CPFm) apresentou expressão elevada de proteína c-fos logo após a evocação de memórias remotamente adquiridas (há um mês), enquanto esse padrão não foi observada quando uma memória recentemente adquirida (há um dia) foi evocada no LAM (TEIXEIRA et al., 2006). Também, no mesmo estudo, os autores mostraram que a inativação do CCA com lidocaína prejudicou a

expressão apenas de memórias remotamente adquiridas, enquanto memórias recentes foram evocadas sem prejuízos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Takeraha e colaboradores (2003) em uma tarefa de condicionamento denominada “*trace eye blink conditioning*”; e por Frankland e colaboradores (2004) usando paradigmas de medo condicionado. Bontempi e colaboradores (1999), usando o labirinto radial com 8 braços, mediram a atividade neuronal em zonas corticais (especialmente córtices frontal, cíngulo anterior e temporal) em dois momentos: cinco dias após a aquisição da memória ou 25 dias após; os autores observaram uma maior atividade neuronal durante a evocação das memórias remotamente adquiridas (há 25 dias) comparado às memórias recentes (adquiridas há 5 dias). Somando-se a essas evidências, Restivo e colaboradores (2009) observaram que a densidade de espinhas dendríticas no CPFm produzidas pelo condicionamento ao medo foi consideravelmente maior quando o tecido foi analisado 36 dias após o condicionamento comparado a apenas 24 horas após o condicionamento.

Esses dados realçam que o CPFm desempenha papel essencial na organização de memórias distribuídas ao longo do neocórtex durante a evocação de memória remotas, como proposto por Frankland e Bontempi (2004). Opostos a essa teoria, Preston e Eichenbaum (2013) defendem que a aquisição de novas memórias dependem do CPFm desde os momentos iniciais.

5. CONCLUSÕES

Nossos dados mostram que o CPFm desempenha papel crucial no processamento de memórias episódicas, especialmente na aquisição de tarefas espaciais envolvendo reforço alimentar (como observado no labirinto em T forçado) e durante a evocação de memórias remotas, sem influenciar a evocação de memórias espaciais recentes. Em relação a memória de reconhecimento, nossos dados mostraram que lesões uni ou bilaterais do CPFm não prejudicam o processamento dessa categoria mnemônica quando adotado um intervalo de 24 horas entre as sessões de familiarização e de teste. Ademais, nossos dados não indicaram quaisquer evidências de lateralização funcional no processamento (aquisição, consolidação ou evocação) de informações em tarefas para avaliação de memórias episódicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGLETON, J. P.; ALBASSER, M. M.; AGGLETON, D. J.; POIRIER, G. L.; PEARCE, J. M. Lesions of the Rat Perirhinal Cortex Spare the Acquisition of a Complex Configural Visual Discrimination Yet Impair Object Recognition. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, p. 55 – 68, 2010.

ALBASSER, M. M.; DAVIES, M.; AGGLETON, J. P. Magnitude of the Object Recognition Deficit Associated With Perirhinal Cortex Damage in Rats: Effects of Varying the Lesion Extent and the Duration of the Sample Period. **Behavioral Neuroscience**, v. 123, p. 115 – 124, 2009.

ANDREW, R. J. The development of behavior lateralization in the chick. In: ANDREW, R. (Ed.). **Neural and behavior plasticity. The use of the chick as a model**. Primeira edição. Oxford: Editora Oxford University Press, 1991. p. 536 – 554.

BARNETT, S. A.; COWAN, P. E. Activity, Exploration, Curiosity and Fear: An Ethological Study. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. 1, p. 43 – 62, 1976.

BARTOLINI, L.; CASAMENTI, F.; PEPEU, G. Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, p. 277 – 283, 1996.

BECHARA, A.; DAMASIO, A. R. The somatic marker hypothesis: A neural theory of economic decision. **Games and Economic Behavior**, v. 52, p. 336 – 372, 2005.

BERLYNE, D. E.; KOENIG, I. D.; HIROTA, T. Novelty, arousal, and the reinforcement of diversive exploration in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 62, p. 222 – 226, 1966.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1306 – 1311, 2006.

BLASER, R.; HEYSER, C. Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, p. 1 – 12, 2015.

BLUM, S.; HEBERT, A. E.; DASH, P. K. A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. **NeuroReport**, v. 17, p. 341 – 344, 2006.

BONTEMPI, B.; LAURENT-DEMIR, C.; DESTRADE, C.; JAFFERD, R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. **Nature**, v. 400, p. 671 – 675, 1999.

BOTVINICK, M. M.; COHEN, J. D.; CARTER, C. S. Conflict monitoring and anterior cingulate cortex: An update. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 8, p. 539 – 546, 2004.

BUCKMASTER, C. A. Entorhinal Cortex Lesions Disrupt the Relational Organization of Memory in Monkeys. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 9811 – 9825, 2004.

- BURKE, S. N.; WALLACE, J. L.; NEMATOLLAHI, S.; UPRETY, A. R. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. **Behav Neurosci**, v. 124, p. 559 – 573, 2010.
- CAVADA, C.; LLAMAS, A.; REINOSO-SUÁREZ, F. Allocortical afferent connections of the prefrontal cortex of the cat. **Brain Research**, v. 260, p. 117 – 120, 1983.
- CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X.; SOUSA, N. The stressed prefrontal cortex. Left? Right! **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, p. 630 – 638, 2008.
- CHUDASAMA, Y.; ROBBINS, T. W. Dissociable contributions of the orbitofrontal and infralimbic cortex to pavlovian autoshaping and discrimination reversal learning: Further evidence for the functional heterogeneity of the rodent frontal cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 8771 – 8780, 2003.
- CLARK, L.; MANES, F. Social and emotional decision-making following frontal lobe injury. **Neurocase**, v. 10, p. 398 – 403, 2004.
- CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **The Journal of neuroscience**, v. 20, p. 8853 – 8860, 2000.
- CORCORAN, K. A.; QUIRK, G. J. Activity in Prelimbic Cortex Is Necessary for the Expression of Learned, But Not Innate, Fears. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 840 – 844, 2007.
- COSTA, N. S.; VICENTE, M. A.; CIPRIANO, A. C.; MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice : Left or right ? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82 – 90, 2016.
- DALLEY, J. W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 771 – 784, 2004.
- DAMASIO, A. R. The fabric of the mind: A neurobiological perspective. **Progress in Brain Research**, v. 126, p. 457 – 467, 2000.
- DE BRUIN, J. P. C.; SANCHEZ-SANTED, F.; HEINSBROEK, R. P.; DONKER, A.; POSTMES, P. A behavioural analysis of rats with damage to the medial prefrontal cortex using the morris water maze: evidence for behavioural flexibility, but not for impaired spatial navigation. **Brain Research**, v. 652, p. 323 – 333, 1994.
- DE LIMA, M. N. M.; LARANJA, D. C.; CALDANA, F.; BROMBERG, E.; ROESLER, R.; SCHODER, N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with L-deprenyl. **Experimental Gerontology**, v. 40, p. 506 – 511, 2005.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; SILVA, M. A. D. S. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. **Neurobiology of learning and memory**, v. 84, p. 214 – 221, 2005.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? **Annual Review of Psychology**, v. 55, p. 51 – 86, 2004.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, p. 244 – 254, 2010.

ENNACEUR, A.; MELIANI, K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. **Behavioural Brain Research**, v. 31, p. 47 – 59, 1988.

ENNACEUR, A.; NEAVE, N.; AGGLETON, J. P. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: The effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. **Experimental Brain Research**, v. 113, p. 509 – 519, 1997.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. **Neuron**, v. 76, p. 1057 – 1070, 2012.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B.; TALTON, L. E.; KACZMAREK, L.; SILVA, A. J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science**, v. 304, p. 881 – 883, 2004.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. Nature reviews. **Neuroscience**, v. 6, p. 119 – 130, 2005.

FRASNELLI, E. Brain and behavioral lateralization in invertebrates. **Frontiers in Psychology**, v. 4, p. 1 – 10, 2013.

FUSTER, J. M. **The Prefrontal Cortex: Anatomy, Physiology, and Neuropsychology of the Frontal Lobe**. Primeira edição. Philadelphia: Editora Lippincott Williams & Wilkins, 1997. p. 1 – 28.

GÁMIZ, F.; GALLO, M. Spontaneous object recognition memory in aged rats: Complexity versus similarity. **Learning and Memory**, v. 19, p. 444 – 448, 2012.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Dysfunction Schizophrenia. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 6, p. 348 – 357, 1994.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, p. 477 – 485, 1995.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; SELEMON, L. D.; SCHWARTZ, M. L. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. **Neuroscience**, v. 12, p. 719 – 743, 1984.

GOTO, K.; KURASHIMA, R.; GOKAN, H.; INOUE, N.; ITO, I.; WATANABE, S. Lef-right asymmetry defect in the hippocampal circuitry impairs spatial learning and working memory in IV mice. **PLoS One**, v. 5, p. 1 – 7, 2010.

GÜNTÜRKÜN, O.; DIEKAMP, B.; MANNS, M.; NOTTELMANN, F.; PRIOR, H.; SCHWARZ, A.; SKIBA, M. Asymmetry pays: Visual lateralization improves discrimination success in pigeons. **Current Biology**, v. 10, p. 1079 – 1081, 2000.

HADDON, J. E.; KILLCROSS, S. Prefrontal cortex lesions disrupt the contextual control of response conflict. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 2933 – 2940, 2006.

HAMMOND, R. S.; TULL, L. E.; STACKMAN, R. W. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, p. 26 – 34, 2004.

HELEN, B.; J., B. G. Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. **Hippocampus**, v. 5, p. 511 – 533, 1995.

HOLROYD, C.; COLES, M.; NIUWENHUIS, S. Medial prefrontal cortex and error potentials. **Science**, v. 296, p. 1610 – 1611, 2002.

IRLE, E.; MARKOWITSCH, H. J. Widespread cortical projections of the hippocampal formation in the cat. **Neuroscience**, v. 7, p. 2637 – 2647, 1982.

KOLB, B.; NONNEMAN, A. J. Prefrontal cortex and the regulation of food intake in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 88, p. 806 – 815, 1975.

KOLB, B.; NONNEMAN, A. J.; SINGH, R. K. Double dissociation of spatial impairments and perseveration following selective prefrontal lesions in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 87, p. 772 – 780, 1974.

LEDOUX, J. **Synaptic Self: How Our Brains Become Who We Are**. Primeira edição. New York: Editora Viking, 2001. p. 13 -37.

LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; HAELEWYN, B.; BOULOUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P.; FRERET, T. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, p. 2531 – 2537, 2013.

LEVY, J. The mammalian brain and the adaptive advantage of cerebral asymmetry. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 299, p. 264 – 272, 1977.

MAVIEL, T. Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. **Science**, v. 305, p. 96 – 99, 2004.

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

MCGREW, W. C.; MARCHANT, L. F. Laterality of hand use pays off in foraging success for wild chimpanzees. **Primates**, v. 40, p. 509 – 513, 1999.

MOBINI, S.; BODY, S.; HO, M. Y.; BRADSHAW, C. M.; SZABADI, E.; DEAKIN, J. F. W.; ANDERSON, I. M. Effects of lesions of the orbitofrontal cortex on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. **Psychopharmacology**, v. 160, p. 290 – 298, 2002.

MUIR, J. L.; EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: Dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task. **Cerebral Cortex**, v. 6, p. 470 – 481, 1996.

NARAYANAN, N. S.; LAUBACH, M. Top-down control of motor cortex ensembles by dorsomedial prefrontal cortex. **Neuron**, v. 52, p. 921 – 931, 2006.

OTTO, T.; EICHENBAUM, H. Complementary Roles of the Orbital Prefrontal Cortex and the Perirhinal-Entorhinal Cortices in an Odor-Guided Delayed-Nonmatching-to-Sample Task. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, p. 762 – 775, 1992.

PASCUAL, A.; HUANG, K. L.; NEVEU, J.; PRÉAT, T. Bain asymmetry and long term memory. **Nature**, v. 427, p. 604–605, 2004.

DIAS, P. C.; DE LIMA, M. N. M.; PRESTI-TORRES, J.; DORNELLES, A.; GARCIA, V. A.; SCALCO, F. S.; GUIMARÃES, M. R.; COSNTANTINO, L.; BUDNI, P.; DAL-PIZZOL, F.; SCHODER, N. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. **Neuroscience**, v. 146, p. 1719 – 1725, 2007.

PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. **Current Biology**, v. 23, p. R764 – R773, 2013.

QUINN, J. J.; MA, Q. D.; TINSLEY, M. R. KOCH, C.; FANSELOW, M. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learning and Memory**, v. 15, p. 368 – 372, 2008.

RAGOZZINO, M. E.; WILCOX, C.; RASO, M.; KESNER, R. P. Involvement of Rodent Prefrontal Cortex Subregions in Strategy Switching. **American Psychological Association**, v. 113, p. 32 – 41, 1999.

RAGOZZINO, M. E.; ADAMS, S.; KESNER, R. P. Differential involvement of the dorsal anterior cingulate and prelimbic- infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, p. 293 – 303, 1998.

RAGOZZINO, M. E.; DETRICK, S.; KESNER, R. P. Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. **The Journal of neuroscience**, v. 19, p. 4585 – 4594, 1999.

REGER, M. L.; HOVDA, D. A.; GIZA, C. C. Ontogeny of rat recognition memory measured by novel object recognition task. **Dev Psychobiol**, v. 51, p. 672 – 678, 2009.

RESTIVO, L.; VETERE, G.; BONTEMPI, B.; AMMASSARI-TEULE, M. The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 8206–8214, 2009.

RIBOT, T. **Diseases of memory**. Primeira edição. New York: Editora Appleton-Century-Crofts, 1882. p. 2 – 34.

RODGERS, L. Advantages and disadvantages of lateralization. In: RODGERS, L.; ANDREW, R. J. (Eds.). **Comparative vertebrate lateralization**. Primeira edição. Cambridge: Editora Cambridge University Press, 2002. p. 126–153.

ROGERS, L. Behavioral, structural and neurochemical asymmetries in the avian brain: A model system for studying visual development and processing. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, p. 487 – 503, 1996.

ROGERS, L. J.; ZUCCA, P.; VALLORTIGARA, G. Advantages of having a lateralized brain. Proceedings. **Biological sciences/The Royal Society**, v. 271, p. S420 – S422, 2004.

ROSENE, D. L.; VAN HOESEN, G. W. Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. **Science**, v. 198, p. 315 – 317, 1977.

RUSHWORTH, M. F. S.; NOONAN, M. P.; BOORMAN, E. D.; WALTON, M. E.; BEHRENS, T. E. Frontal Cortex and Reward-Guided Learning and Decision-Making. **Neuron**, v. 70, p. 1054 – 1069, 2011.

SCHOENBAUM, G.; SETLOW, B. Integrating orbitofrontal cortex into prefrontal theory: Common processing themes across species and subdivisions. **Learning and Memory**, v. 8, p. 134 – 147, 2001.

SEAMANS, J. K.; FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, A. G. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. **Behavioral neuroscience**, v. 109, p. 1063 – 1073, 1995.

SHIPTON, O. A.; EL-GABY, M.; APERGIS-SCHOUTE, J.; DEISSEROTH, K.; BANNERMAN, D. M.; PAULSEN, O.; KOHL, M. M. Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, p. 15238 – 15243, 2014.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological review**, v. 99, p. 195 – 231, 1992.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memory: From Mind to Molecules**. Primeira edição. New York: Editora W. H. Freedman & Co., 1999. p. 167 – 187.

STEVENSON, C. W. Role of amygdala-prefrontal cortex circuitry in regulating the expression of contextual fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 315 – 323, 2011.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. **Brain research**, v. 927, p. 69 – 79, 2002.

TAKASHIMA, A.; PETERSSON, K. M.; RUTTERS, F.; TENDOLKAR, I.; JENSEN, O.; ZWARTS, M. J.; MCNAUGHT. Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 756 – 761, 2006.

TAKEHARA, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y. Time-Dependent Reorganization of the Brain Components Underlying Memory Retention in Trace Eyeblink Conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 9897 – 9905, 2003.

TEIXEIRA, C. M.; POMEDII, S. R.; MAEI, H. R.; KEE, N.; FRANKLAND, P. W. Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. **The Journal of neuroscience**, v. 26, p. 7555 – 7564, 2006.

TSE, D.; TAKEUCHI, T.; KAKEYAMA, M.; KAJII, Y.; OKUNO, H.; TOHYAMA, C.; BITO, H.; MORRIS, G. M. Schema-Dependent Gene Activation. **Science**, v. 333, p. 891 – 895, 2011.

UYLINGS, H. B. M.; GROENEWEGEN, H. J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioural Brain Research**, v. 146, p. 3 – 17, 2003.

VALLORTIGARA, G. Comparative neuropsychology of the dual brain: a stroll through animals' left and right perceptual worlds. **Brain and language**, v. 73, p. 189 – 219, 2000.

VALLORTIGARA, G.; ROGERS, L. J.; BISAZZA, A. Possible evolutionary origins of cognitive brain lateralization. **Brain Research Reviews**, v. 30, p. 164 – 175, 1999.

WANG, G. W.; CAI, J. X. Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic cortical circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, p. 365 – 373, 2008.

WANG, S. H.; TSE, D.; MORRIS, R. G. M. Anterior cingulate cortex in schema assimilation and expression. **Learning and Memory**, v. 19, p. 315 – 318, 2012.

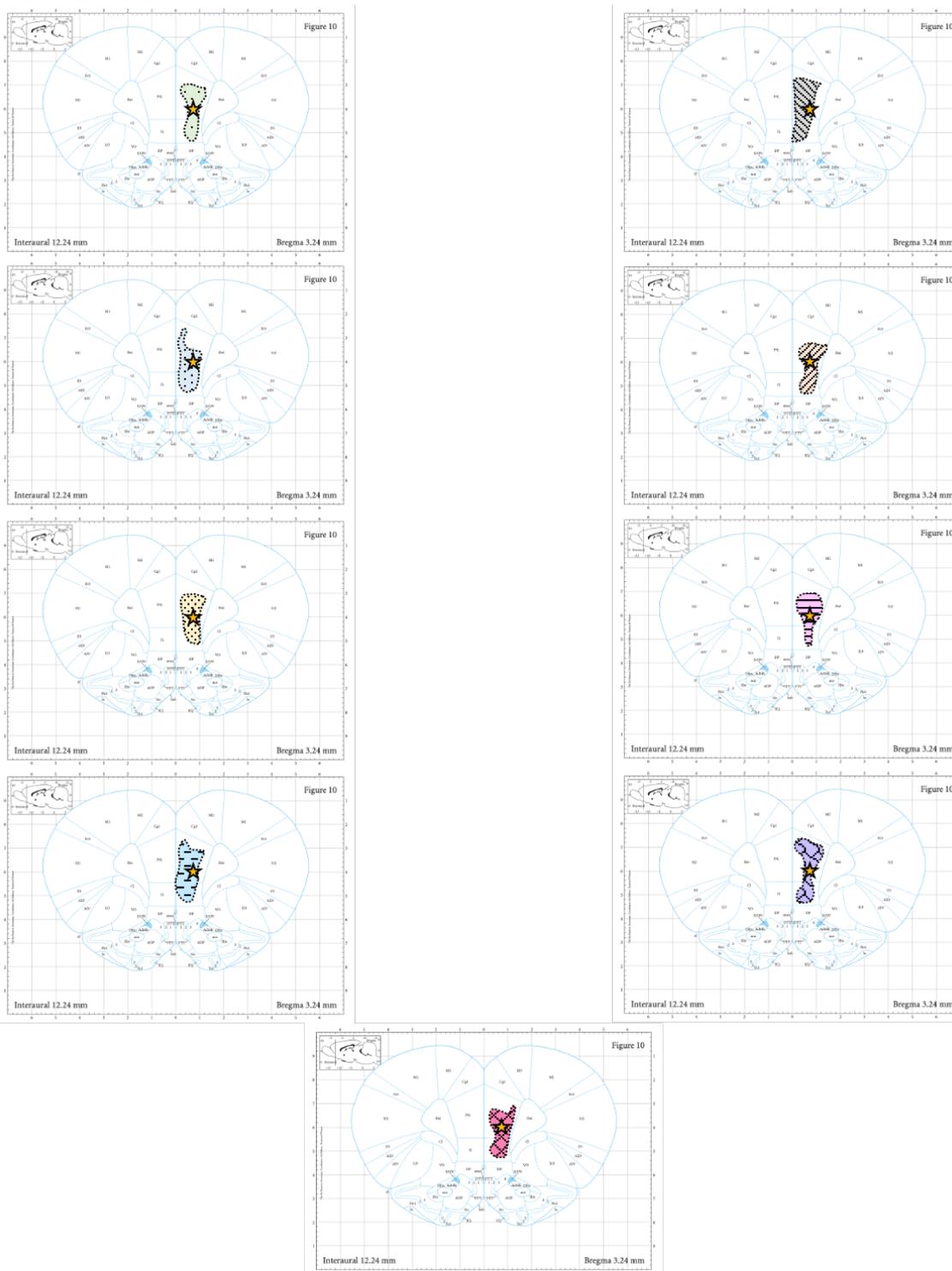
WARD, J.; HOPKINNS, W. Primate laterality: Current behavioural evidence of primate asymmetries. Primeira edição. New York: Editora Springer, 1993. p. 56 – 64.

WINSTANLEY, C. A.; THEOBALD, D. E. H.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Contrasting roles of basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in impulsive choice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 4718 – 4722, 2004.

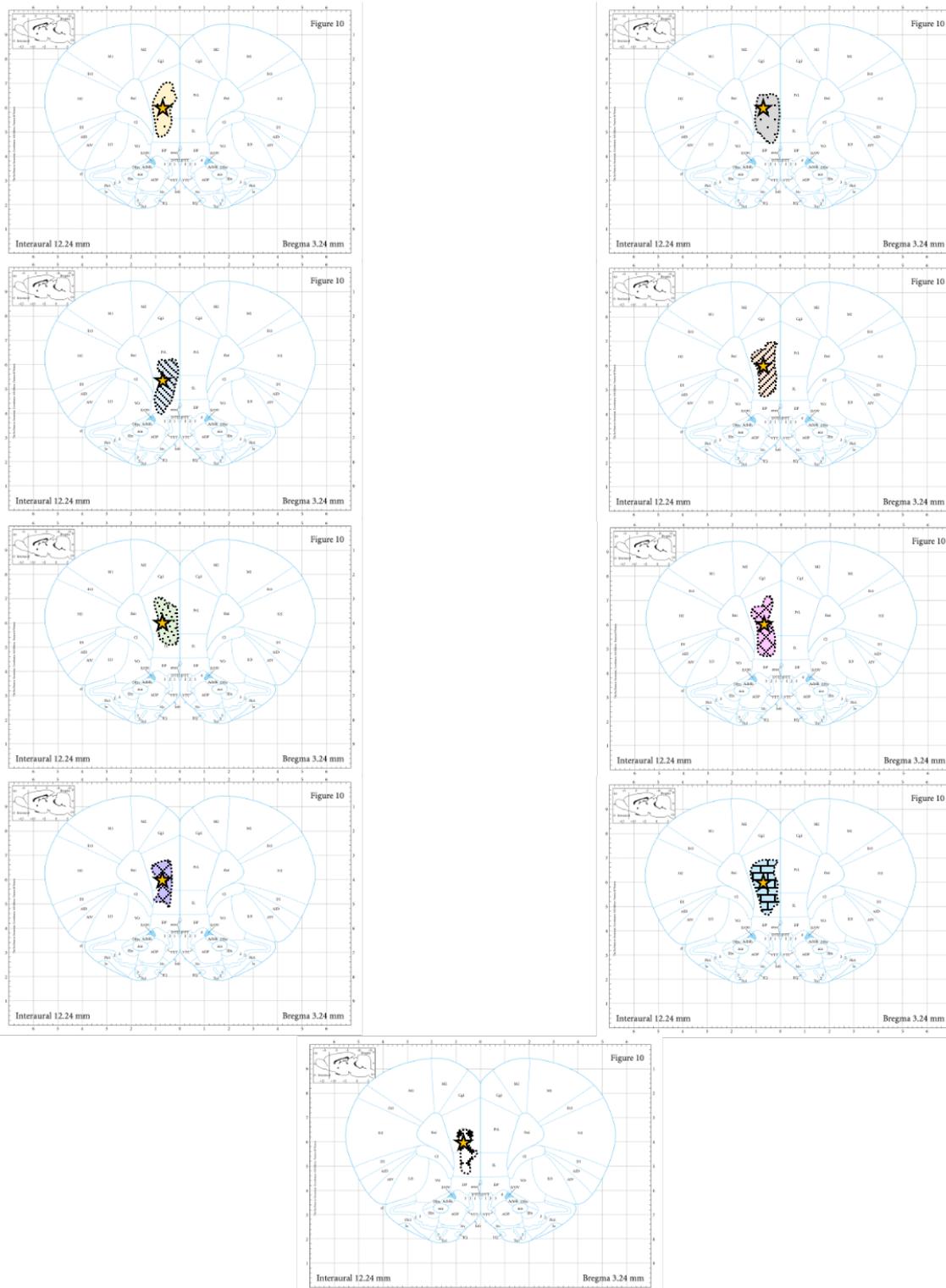
YONELINAS, A. P. Components of episodic memory: The contribution of recollection and familiarity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 356, p. 1363 – 1374, 2001.

7. ANEXOS

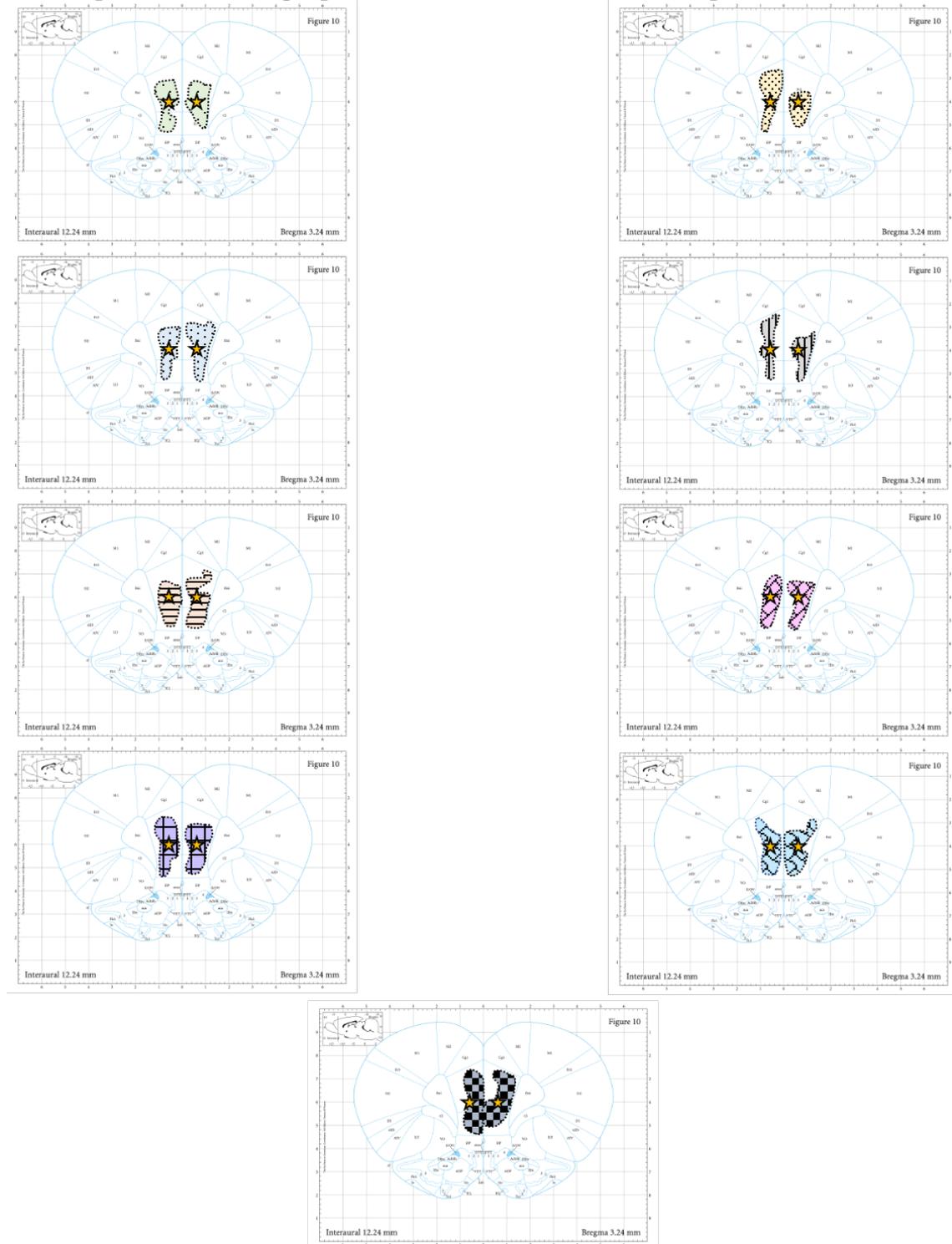
7.1. ANEXO 1 - Prancha com imagens representativas da região lesionada nos animais pertencentes ao grupo com lesão no hemisfério esquerdo do córtex pré-frontal medial.



7.2. ANEXO 2 - Prancha com imagens representativas da região lesionada nos animais pertencentes ao grupo com lesão no hemisfério direito do córtex pré-frontal medial.



7.3. ANEXO 3 - Prancha com imagens representativas das regiões lesionadas nos animais pertencentes ao grupo com lesões bilaterais do córtex pré-frontal medial.



CAPÍTULO 4

O envolvimento do circuito hipocampo - córtex pré-frontal medial na modulação de memórias episódicas recentes e remotas e avaliação de lateralização funcional

RESUMO

A ideia de que memórias podem ser gradualmente reorganizadas ao longo de uma escala temporal surgiu ainda no século XIV com psicólogo francês Ribot. Quase dois séculos após a neurociência ainda dedica-se para compreender os processos biológicos que modulam tais aspectos da memória. Sabe-se que memórias episódicas podem ser classificadas e distinguidas quanto ao seu tempo de aquisição, sendo as memórias recentes mais lábeis e as remotas mais persistentes e resistentes a perdas e manipulações. Dentre os principais sítios de modulação de memórias episódicas, destacam-se o hipocampo (HPC) e o córtex-pré-frontal medial (CPFm) que estabelecem aferências e eferências entre si, articulando-se em um circuito conhecido como hipocampo-córtex pré-frontal medial que inquestionavelmente trata-se de um substrato neural chave para o processamento de memórias. Entretanto, o número de estudos que dedicam-se ao estudo desse circuito e suas contribuições no processamento de memoriais episódicas ainda é exíguo. Ademais, a lateralização de diversas estruturas encefálicas na modulação de comportamentos complexos tem chamado atenção dos pesquisadores, no entanto, pouquíssimos estudos buscam averiguar a possível lateralização funcional desse circuito; sendo esse o primeiro trabalho que se dedica a investigação desse circuito na consolidação temporal de memórias episódicas e sua possível lateralização funcional. Assim, este estudo (experimento III), utilizando lesões excitotóxicas ipsilaterais (esquerda e direita) com ácido ibotênico (IBO) avaliou a contribuição do circuito para a execução de tarefas como o labirinto aquático de Morris (LAM), teste de reconhecimento de objetos (TRO) e labirinto em T forçado. Para tanto, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: (i) grupo veículo, em que receberam injeções bilaterais do veículo farmacológico (tampão salina fosfato – PBS) em ambos CPFm e ambas porções ventrais do HPC (HPCv); (ii) grupo circuito HPC-CPFm esquerdo, em que os animais receberam injeções de PBS nos CPFm e HPCv direitos e injeções do lesionador ácido ibotênico (IBO -10µg/µl) nos CPFm e HPCv esquerdos; (iii) grupo circuito HPC-CPFm direito, em que os animais receberam injeções de PBS no CPFm e HPCv esquerdos e injeções de IBO nos CPFm e HPCv direitos. Os dados do LAM revelam que lesões no circuito HPC-CPFm (tanto esquerda quanto direita) prejudicou o desempenho dos animais em todas as etapas: aquisição da tarefa e evocação de memórias recentes e remotas. Apesar disso, nenhum prejuízo locomotor e exploratório foi observado nos grupos lesionados, bem como a memória de reconhecimento parece não ter sido afetada pelas manipulações farmacológicas. Quanto ao labirinto em T, animais com lesões do circuito apresentaram prejuízo na execução da tarefa. Assim, o articulação do circuito HPC-CPFm parece ser essencial para o processamento de memórias espaciais, bem como de tarefas espaciais que envolvam comportamento motivado e tomada de decisão. Entretanto, nenhum evidência de lateralização funcional foi observada nesse estudo.

Palavras-chave: circuito HPC-CPFm, consolidação temporal, memória recente, memória remota, memória episódica.

ABSTRACT

The idea that memories can be gradually reorganized in a time scale emerged in the 19th century with french psychologist Ribot. Almost two centuries went by and neuroscience is still dedicated to understand the biological processes that modulate aspects of memory. Currently, it is known that episodic memories can be classified and distinguished according to their acquisition time, with recently acquired memories being more labile and remotely acquired ones more persistent and resistant to losses and manipulations. Among the main sites of modulation of episodic memories and their temporal consolidation, the hippocampus (HPC) and the medial prefrontal cortex (mPFC) stand out, which propitiously establish afferences and efferences, articulating themselves in a encephalic circuit known as the hippocampus - medial pre-frontal cortex (HPC - mCPF) which is, unquestionably, a key neural substrate for the processing of memories. However, the number of studies dedicated to the study of this circuit and their contributions to the processing of episodic memories is still minor. In addition, the lateralization of several brain structures in the modulation of complex behaviors has captured the attention of the scientific community, yet, very few studies have sought to ascertain the possible functional lateralization of this circuit; this being the first work dedicated to the investigation of the contribution of this circuit in the temporal consolidation of episodic memories and their possible functional lateralization. Thus, this study (experiment III), using ipsilateral excitotoxic lesions (left and right) with ibotenic acid (IBO) evaluated the contribution of the circuit to the execution of tasks such as the Morris water maze (MWM), object recognition test (ORT) and forced T maze. For that, animals were divided into three experimental groups: (i) vehicle group, which received bilateral injections of pharmacological vehicle (saline phosphate buffer - PBS) in both mPFC and both ventral portions of the HPC (HPCv); (ii) HPC- mPFC left circuit group, in which animals received injections of PBS in the right mPFC and HPCv and injections of the IBO (10 μ g/ μ l) in the left mPFC and HPCv; (iii) right HPC - mPFC circuit group, in which animals received injections of PBS in the left mPFC and HPCv and injections of IBO in the right mPFC and HPCv. LAM data reveal that lesions in the HPC - mPFC circuit (both left and right) impaired the animals' performance in all stages: task acquisition and recall of recent and remote memories. Despite this, no locomotor and exploratory impairment was observed in the lesioned groups, and the recognition memory does not appear to have been affected by pharmacological manipulations. For the forced T-maze, animals with circuit lesioned showed impairment in the execution of the task. Thus, the articulation of the HPC- mPFC circuit seems to be essential for the processing of spatial memories, as well as for spatial tasks that involve motivated behavior decision making. However, no evidence of functional lateralization was observed in this study.

Keywords: HPC-mPFC circuit, temporal consolidation, recent memory, remote memory, episodic memory.

LISTA GERAL DE FIGURAS

- Figura 1. Modulação das memórias recente e remota pelo circuito hipocampo – córtex pré-frontal medial.** A figura apresenta um esquema que representa a possível interação entre hipocampo e córtex pré-frontal medial que é tempo dependente. Inicialmente, as memórias são codificadas em sítios hipocampais e corticais (1A); com o processo de maturação da memória, as conexões entre módulos corticais são fortalecidas e a memória torna-se independente do hipocampo (1B). Assim, memórias recém adquiridas seriam dependentes do hipocampo, ao passo que tornam-se independentes deste e mais dependentes do córtex pré-frontal medial conforme o processo de consolidação ocorre a longo prazo (1C) 125
- Figura 2. Representação esquemática das projeções neuronais existentes entre o córtex pré-frontal medial e o hipocampo ventral.** SUB, subiculum; EC, córtex entorrinal; Amy, amígdala; NAcc; núcleo accumbens; RE; núcleo reuniens; mPFC, córtex pré-frontal medial 126
- Figura 3. Sítios de injeção.** A imagem é uma representação esquemática dos sítios de injeção considerados corretos no procedimento de lesão do circuito hipocampo - córtex pré-frontal medial. Utilizando-se das coordenadas estereotáxicas (AP: +3,1; ML: $\pm 0,7$ e DV: -4,0 para o córtex pré-frontal medial e AP: -6,0; ML: $\pm 5,5$ e DV: -7,5 para o hipocampo ventral), foram considerados acertos cirúrgicos quando a lesão neuronal abrangia as regiões do córtices pré-límbico e infra-límbico e porção ventral da região CA1 e subiculum. A figura 3A representa os sítios de injeções no hipocampo ventral e córtex pré-frontal medial ipsilaterais esquerdos. A figura 3B representa os sítios de injeções no hipocampo ventral e córtex pré-frontal medial ipsilaterais direitos 129
- Figura 4. Desempenho nos treinos espaciais.** Imagem 4A apresenta ao tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa ao longo dos 35 treinos espaciais no LAM. As barras representam a média \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. *P<0,005 vs GVe. ANOVA *one way* seguida pelo procedimento de BKY. A imagem 4B apresenta o tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma em cada dia do protocolo experimental do LAM. Cada ponto representa a média diária de latência de escape \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. *P<0,005 vs. D1 de cada grupo experimental. ANOVA *two ways* (fator 1: tratamento e fator 2: tempo) seguida do procedimento de BKY 132
- Figura 5. Tempo de retenção nos *probe trials*.** Os gráficos mostram o tempo médio nadando sobre o quadrante que continha previamente a plataforma submersa durante o *probe trial* 1 (5A) e *probe trail* 2 (5B). As barras representam a média \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* ordinária seguida do procedimento de BKY. * P<0,005 comparado ao GVe. As linhas pontilhadas indicam o tempo de natação ao acaso (25%) 133
- Figura 6. Parâmetros locomotores e exploratórios.** A figura 6A apresenta a frequência total de entradas nos quadrantes do aparato de campo aberto durante a primeira sessão de habituação dos animais. A figura 6B apresenta a frequência média de levantamentos no aparato de campo aberto. A figura 6C apresenta o tempo médio que os animais passaram realizando o comportamento de *grooming* durante a habituação ao campo aberto. As barras representam a média de frequência tempo \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* ordinária 134
- Figura 7. Teste de reconhecimento de objetos.** A figura 7A apresenta o tempo em segundos que os animais passaram explorando os objetos idênticos (O1 e O2) apresentados durante a etapa de familiarização. A figura 7B apresenta a média de tempo que os animais passaram explorando o objeto com o qual foram familiarizados (velho – V) e o novo objeto (N) apresentado durante o teste de reconhecimento. As barras representam a média de tempo \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa P<0,005 compara ao tempo explorando o objeto velho de cada grupo. A linha pontilhada representa o tempo mínimo de 20 segundos estipulado para explorar cada objeto 136
- Figura 8. Desempenho durante os treinos espaciais.** As imagens a seguir apresentam a média de porcentagem de escolhas corretas (entradas no braço com reforço alimentar acessível) como média total dos 60 treinos espaciais (8A) ou como médias diárias (8B). Para a imagem 7A, as

barras representam a média de tempo \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P < 0,005$ comparado ao GVe. Na imagem 7B, os pontos representam médias diárias de escolhas corretas \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es 137

Figura 9. Porcentagem de animais *place learners*. O gráfico apresenta a porcentagem média de animais classificados como *place learners* durante as três sessões de *probe trials*. As barras representam a média \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* de medidas repetidas 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média de tempo explorando objetos idênticos durante a sessão de familiarização no teste de reconhecimento de objetos.....	135
Tabela 2. Tempo médio explorando o objeto velho (previamente apresentado na sessão de familiarização) e o objeto novo (apresentado no teste de reconhecimento de objeto)	135

1. INTRODUÇÃO

Nossa fascinante capacidade de registrar experiências cotidianas e recuperar essas memórias muito mais tarde em todos os tipos de situações depende de dois tipos de processamento de informações; (i) primeiro, o cérebro forma rapidamente representações neurais iniciais da nova experiência durante a etapa de aprendizado; (ii) segundo, o cérebro deve consolidar a nova representação em uma organização otimizada para recuperação quando diante de um estímulo ainda que apenas distantemente associado a alguma característica da experiência inicial (PRESTON E EICHENBAUM, 2013). O hipocampo (HPC) e o córtex pré-frontal (CPF) estão criticamente envolvidos em diversos aspectos da aprendizagem e memorização, e muitas teorias destacam a crescente importância das comunicações entre HPC e CPF nas funções cognitivas (DAMASIO, 1989; SQUIRE, 1992). Em geral, defende-se que o HPC e o CPF sejam parte de um sistema único de memória no qual o HPC desempenhe papel duplo; processando determinados tipos de informações e guiando o aprendizado em circuitos neocorticais (Figura 1 - WICKELGREN, 1979).

Estudos com humanos vítimas de danos extensivos no lobo temporal apontam para a presença de amnésia temporariamente graduada que, somando-se a preservação de memórias remotas, formam a base hipotética de que o HPC e estruturas associadas são essenciais para o processo de armazenamento de informações, enquanto memórias mnemônicas multimodais são armazenadas em sítios neocorticais (SQUIRE, 1992). Diante de tal cenário, uma das hipóteses sugere que o HPC possa atuar dirigindo a informação que seria necessária para a consolidação em circuitos neocorticais (LAROCHE et al., 2000); essa teoria pode ser melhor entendida se fizermos uma alusão a metáfora da ferrovia, na qual o hipocampo seria a estrutura responsável por estabelecer novos trilhos de percurso, enquanto o CPF seria a região responsável por alternar a locomoção do trem de maneira flexível entre os diferentes trilhos traçados pelo HPC (MILLER E COHEN, 2001).

Figura 1. Modulação das memórias recente e remota pelo circuito hipocampo – córtex pré-frontal medial. A figura apresenta um esquema que representa a possível interação entre hipocampo e córtex pré-frontal medial que é tempo dependente. Inicialmente, as memórias são codificadas em sítios hipocampais e corticais (1A); com o processo de maturação da memória, as conexões entre módulos corticais são fortalecidas e a memória torna-se independente do hipocampo (1B). Assim, memórias recém adquiridas seriam dependentes do hipocampo, ao passo que tornam-se independentes deste e mais dependentes do córtex pré-frontal medial conforme o processo de consolidação ocorre a longo prazo (1C).

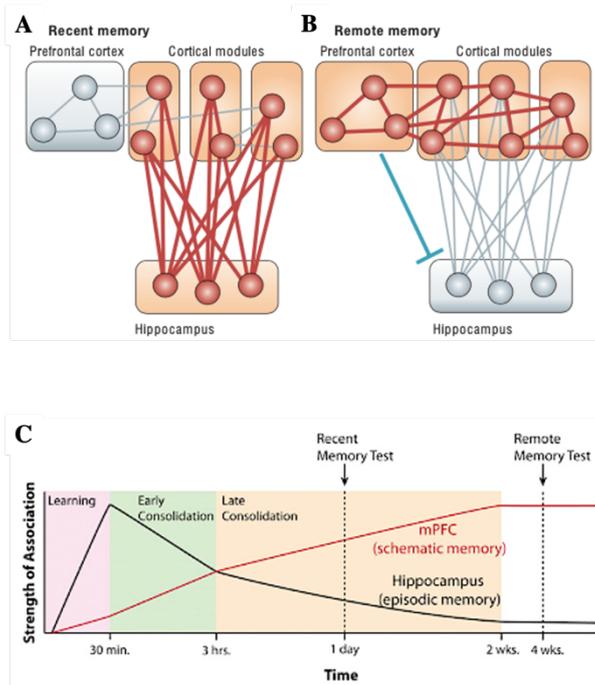


Figura adaptada pela autora, as imagens 1A e 1B extraídas do artigo “*The organization of recente and remote memories*” de Frankland e Bontempi (*Nature Reviews Neuroscience* – 2005). A imagem 1C foi extraída do artigo “*The role of medial pré-frontal córtex in memory and decision making*” de Euston e colaboradores (*Neuron* – 2012).

Trabalhos com humanos e macacos destacam o papel que o CPF desempenha em funções cognitivas tais como memória de trabalho, um processo de manutenção de uma representação ativa da informação para que esta esteja disponível para o uso e para organização e planejamento de respostas (FUSTER, 1984; GOLDMAN-RAKIC et al., 1984). Usualmente, a representação de eventos recentemente adquiridos e planos motores concorrentes são algumas das funções mais características do CPF (LAROCHE et al., 2000). Em roedores, lesões restritas a porção infra-límbica do córtex pré-frontal medial (CPFm) produzem prejuízos severos em tarefas espaciais; entretanto ainda muito se debate sobre se tal déficit seja por prejuízo na memória de trabalho ou a uma incapacidade de planejar um sequencia de respostas, ou ambas (GRANON et al., 1994; SEAMANS et al., 1995; DELATOUR et al., 1996).

Diversos estudos anatômicos utilizando marcadores anterógrados e retrógrados evidenciaram que o HPC projeta-se para regiões específicas do CPF de ratos, gatos e

macacos. Em todas essas espécies, as projeções originam-se da sub-região CA1 e subiculum e inerva o CPFm e córtex orbito-frontal; ao passo que a porção lateral do CPF recebe projeções muito esparsas ou nem mesmo recebe projeções hipocampais (ROSENE E VAN HOESEN, 1977; CAVADA et al., 1983; GOLDMAN-RAKIC et al., 1984; JAY et al., 1989; JAY E WITTER, 1991; CARMICHAEL E PRICE, 1995; HELEN E BLATT, 1995 - Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática das projeções neuronais existentes entre o córtex pré-frontal medial e o hipocampo ventral. SUB, subiculum; EC, córtex entorrinal; Amy, amígdala; NAcc; núcleo accumbens; RE; núcleo reuniens; mPFC, córtex pré-frontal medial.

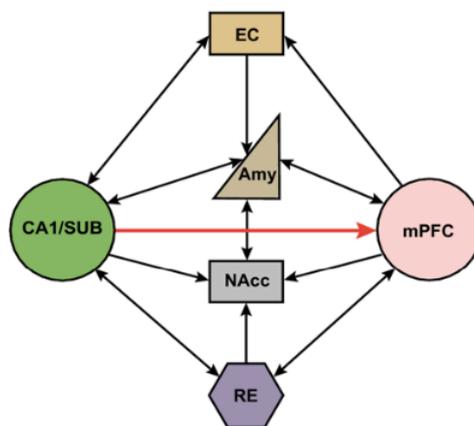


Imagem extraída do artigo “Prefrontal-Hippocampal interactions in memory and emotion” de Jin e Maren (*Frontiers in systems neuroscience* – 2015).

Interessantemente, esse circuito HPC-CPF é estritamente ipsilateral e unidirecional. Diferente de outras áreas neocorticais tais como os córtices perirrinal e entorrinal que são reciprocamente conectados com o HPC (WITTER et al., 1989), a área CA1 e subiculum não recebem projeções diretas do CPF em ratos (SESACK et al., 1989) ou macacos (GOLDMAN-RAKIC et al., 1984; CARMICHAEL E PRICE, 1995). Estudos anatômicos detalhados em roedores demonstraram que as aferências do HPC para o CPF originam-se exclusivamente de sítios restritos da subregião CA1 do corno de Amon e do subiculum; enquanto o giro dentado e sub-regiões CA2 e CA3 não se projetam para o CPF (JAY E WITTER, 1991). As fibras hipocampais percorrem através da fimbria e fórnix, atingindo o septo lateral, núcleo accumbens, córtex medial orbital e duas sub-regiões do CPFm: córtices infralímbico e pré-límbico. Os neurônios da CA1, exceto na porção dorsal do HPC, e os neurônios de toda a região proximal do subiculum (localizado próximo a sub-região CA1) inervam o CPF (LAROCHE et al., 2000).

Estudos eletrofisiológicos em roedores demonstraram que as áreas ventral de Ca1 e subiculum, quando estimuladas com frequências baixas promovem respostas excitatórias nos neurônios do CPF (LAROUCHE et al., 1990). Em consonância com as descrições anatômicas, pouquíssimos (menos de 6%) neurônios nas áreas cinguladas pré-central e anterior respondem a estimulação hipocampal (LAROUCHE et al., 2000). Estudos subsequentes esclareceram que as aferências excitatórias do HPC para o CPF usam glutamato com neurotransmissor (JAY et al., 1992). Uma vez que a via excitatória entre essa regiões se dá por meio de neurotransmissão glutamatérgica, alguns pesquisadores investigaram a neuroplasticidade desse circuito; a primeira evidência de plasticidade neuronal a longo prazo das sinapses entre HPC e CPF deriva de estudos que mostraram que estimulações tetânicas de alta frequência no HPC de ratos anestesiados induzem potenciação de longo prazo (LTP) rapidamente e de forma muito estável em sinapses com o córtex pré-límbico (LAROUCHE et al., 1990). Em animais ativos e em movimento, a LTP no hipocampo para o córtex pré-límbico resultou em um aumento considerável da estabilidade sináptica, que persistiu por diversos dias (JAY et al., 1996).

Quanto ao mecanismo de indução, acredita-se que a ativação de receptores NMDA seja fundamental para a indução de LTP no circuito HPC-CPF (JAY et al., 1995). Uma vez que, infusões de antagonista de receptores NMDAs localmente no córtex pré-límbico bloqueou completamente o desenvolvimento da LTP, enquanto a transmissão sináptica normal ou prévia a LTP não foi afetada (TSUMOTO, 1992; BLISS E COLLINGRIDGE, 1993). Enquanto nas sinapses hipocampais o processo de LTP ocorre muito cedo durante o processo de aprendizagem, as alterações nas sinapses do HPC para o CPF são mais tardias, desenvolvendo-se apenas quando a aprendizagem máxima é atingida. Tais resultados fornecem a primeira evidência eletrofisiológica de que a potenciação sináptica nesse circuito pode servir, ou ao menos estar correlacionada, com um processo que consolidação tardia no qual o HPC atua na estabilização de representações dos eventos aprendidos nos circuitos corticais (LAROUCHE et al., 2000). Outrossim, estudos descreveram aumento na imunoreatividade da proteína c-fos nos córtices pré-límbico e infralímbico, mas não nos córtices motor e cingulado, durante a aquisição de tarefas associativas usando o pareamento entre som e choque elétrico. O bloqueio dessa expressão aumentada da c-fos promoveu detrimento da aprendizagem (MORROW et al., 1999).

Danos ao CPF em primatas não humanos e roedores geralmente resultam em défices comportamentais em tarefas que demandam respostas tardias, que parecem estar

associados a um aumento da distração por pistas sensoriais e inflexibilidade comportamental devido a capacidade prejudicada de alternar entre estratégias para resolução da tarefa (LAROCHE et al., 2000). Outros estudos comportamentais em roedores com lesão restrita ao córtex pré-límbico do CPFm sugerem que essa região exerce papel primordial na memória de trabalho e planejamento de respostas baseadas em informações apresentadas previamente (BRITO E BRITO, 1990; GRANON et al., 1994; SEAMANS et al., 1995; DELATOUR E GISQUET-VERRIER, 1996).

Ante as evidências percorridas ao longo dessa introdução, restam poucas dúvidas de que o conhecimento do processamento de informações em circuitos neurais complexos e integradores como o HPC-CPFm é de suma importância para desvendarmos muitos pontos, ainda obscuros, sobre a neurobiologia da memória e transtornos associadas a mesma. Assim o presente trabalho (experimento III) objetivo, pela primeira vez até o presente momento; (i) avaliar a função do circuito HPC-CPFm na modulação de memória episódicas espaciais e de reconhecimento; (ii) investigar a participação desse mesmo circuito na evocação de memórias espaciais recente e remotamente adquiridas; (iii) bem como analisar a possível lateralização funcional do mesmo no processamento das funções supracitadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Os animais empregados nesse experimento foram submetidos as mesmas condições descritas no item 2.1. do Capítulo 2.

2.2. Drogas

As drogas empregadas nesse experimento foram exatamente as mesmas conforme descrito no item 2.2. do Capítulo 2.

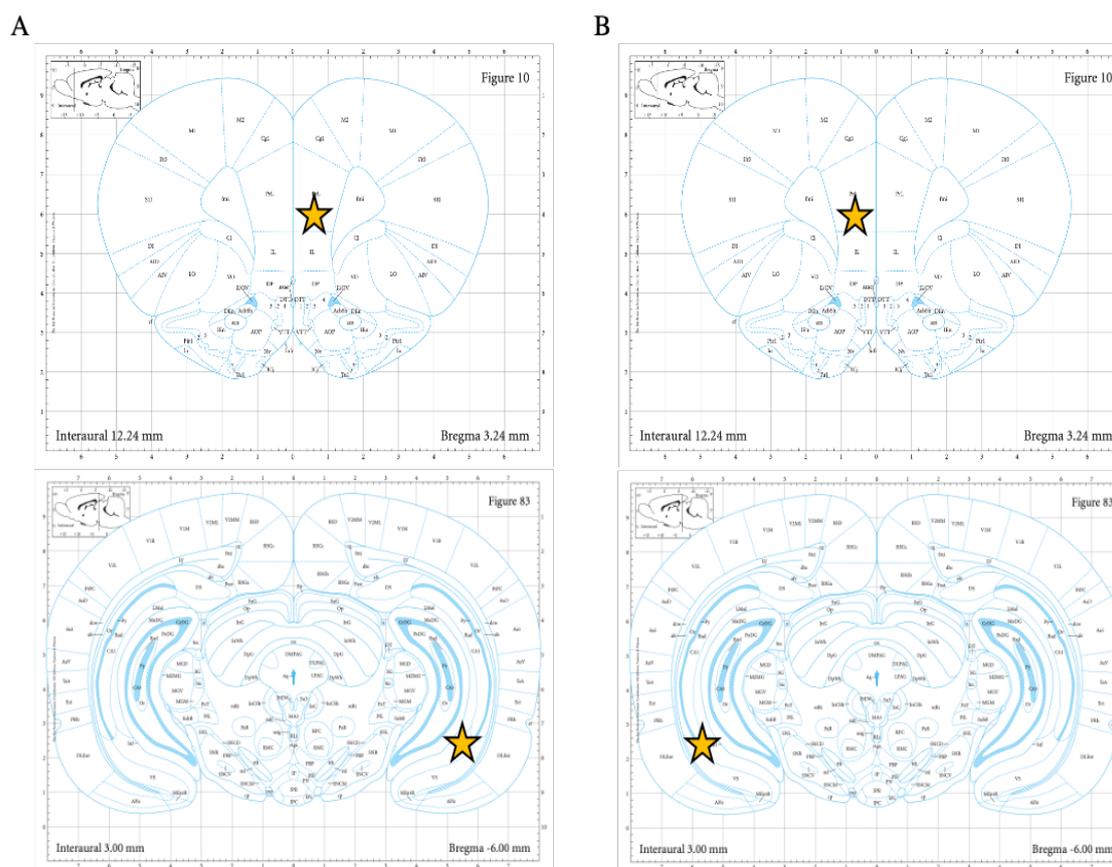
2.3. Procedimentos cirúrgicos

O procedimento cirúrgico adotado nesse experimento foi exatamente o mesmo descrito previamente no item 2.3. do Capítulo 2. As coordenadas estereotáxicas específicas para lesão do CPFm, foram as seguintes: AP: - 6,00 mm (a partir do bregma),

ML: $\pm 5,5$ mm (a partir da linha média) e DV: $-7,5$ mm (a partir da superfície do crânio). Ao passo que as coordenadas para lesão do HPCv foram: AP: $-6,00$ mm (a partir do bregma), ML: $\pm 5,5$ mm (a partir da linha média) e DV: $-7,5$ mm (a partir da superfície do crânio).

Foram considerados como “acerto” cirúrgico, animais nos quais a lesão cortical envolveu a região dos córtices pré-límbico e infralímbico e a lesão hipocampal contida entre as regiões CA1 ventral e subiculum (Figura 3). Animais que receberam injeções em outras regiões encefálicas foram removidas da amostra experimental. Ao final desse capítulo, na seção 8. Anexos, é possível observar o perfil de lesões neuronais produzidas (Itens 8.1. e 8.2.).

Figura 3. Sítios de injeção. A imagem é uma representação esquemática dos sítios de injeção considerados corretos no procedimento de lesão do circuito hipocampo - córtex pré-frontal medial. Utilizando-se das coordenadas estereotáxicas (AP: $+3,1$; ML: $\pm 0,7$ e DV: $-4,0$ para o córtex pré-frontal medial e AP: $-6,0$; ML: $\pm 5,5$ e DV: $-7,5$ para o hipocampo ventral), foram considerados acertos cirúrgicos quando a lesão neuronal abrangia as regiões do córtices pré-límbico e infra-límbico e porção ventral da região CA1 e subiculum. A figura 3A representa os sítios de injeções no hipocampo ventral e córtex pré-frontal medial ipsilaterais esquerdos. A figura 3B representa os sítios de injeções no hipocampo ventral e córtex pré-frontal medial ipsilaterais direitos.



A figura foi criada pela autora utilizando-se de imagens retiradas do livro *The rat brain atlas in stereotaxic coordinates* dos autores George Paxinos e Charles Watson, 6ª ed, 2005.

2.4. Delineamento experimental

Para esse experimento, foram utilizados 23 indivíduos divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, conforme descrito a seguir:

Grupo veículo (GVe, n=13): Os animais foram utilizados como controle cirúrgico. Dessa forma, apesar de passarem pela cirurgia, receberam apenas uma injeção de tampão fosfato-salino (PBS) em ambos os córtices pré-frontais mediais (CPFm – direito e esquerdo) e em ambos hemilaterais do hipocampo ventral (HPCv) – direito e esquerdo;

Grupo Cir-Di (n=5): Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico com uma injeção de ácido ibotênico (IBO) no CPFm direito e no HPCv também direito, lesionando-os permanentemente e uma injeção de PBS no CPFm esquerdo e HPCv esquerdo, como controle cirúrgico;

Grupo Cir-Es (n=5): Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico com uma injeção de IBO no CPFm esquerdo e no HPCv também esquerdo, lesionando-os permanentemente e uma injeção de PBS no CPFm direito e HPCv direito, como controle cirúrgico;

2.5. Paradigmas comportamentais

Os protocolos comportamentais foram exatamente os mesmos para todos os experimentos realizados nesse estudo. Assim, a descrição contida no item 2.5. do Capítulo 2 também descreve todos os procedimentos realizados para esse experimento.

2.6. Histologia

Os procedimentos histológicos empregados nesse experimento foram exatamente os mesmos descritos no item 2.6. do Capítulo 2.

2.7. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *software Prism* (StatSoft Inc., Tulsa, OK – EUA). Os dados obtidos por meio do labirinto aquático de Morris (LAM - latência de escape e tempo de retenção em ambos os *probe trials* 1 e 2) foram submetidos

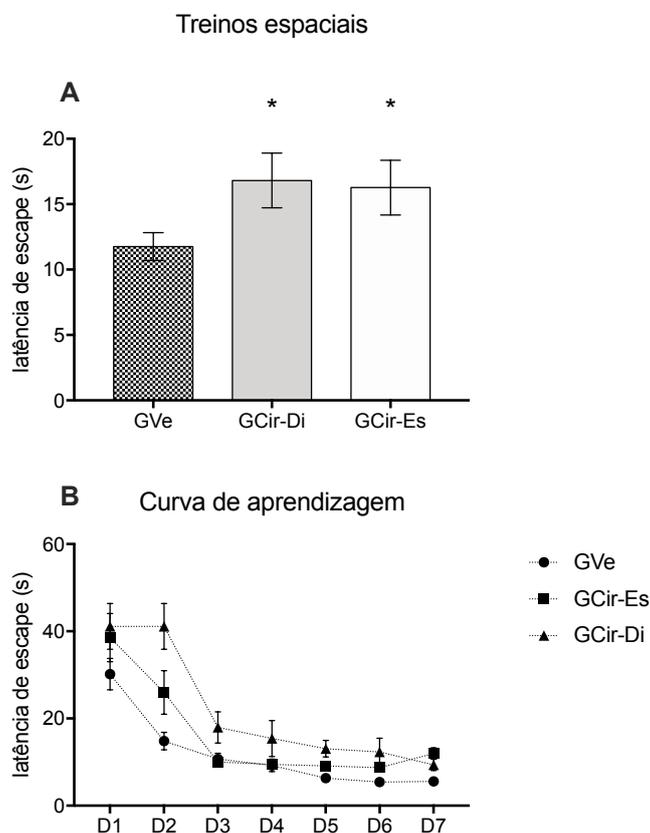
a análise de variância (ANOVA – *one way*) para medidas repetidas (fator principal: tratamento experimental – GVe, CCir-Di, CCir-Es) seguido pelo procedimento de Benjamini, Krieger e Yekutielle (BKY) quando uma diferença estatisticamente significativa fosse apontada. Os dados de porcentagem de escolhas corretas no labirinto em T forçado foram analisados por meio de ANOVA - *one way* de medidas repetidas (sendo o tratamento experimental o principal fator – GVe, CCir-Di, CCir-Es) seguido pelo procedimento de BKY; enquanto os dados dos *probe trials* foram submetidos ao teste de Friedman. Todos os dados obtidos no teste de reconhecimento de objetos (TRO) foram submetidos a ANOVA – *one way* de medidas repetida, sendo o tratamento experimental o principal fator.

3. RESULTADOS

3.1. Labirinto Aquático de Morris

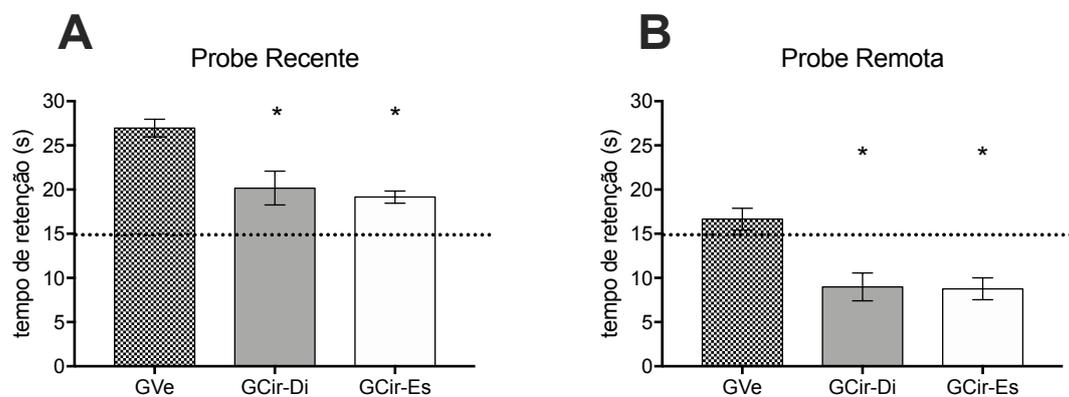
Os dados referentes aos treinos espaciais no LAM estão apresentados na figura 4. Quando comparou-se a média de latência de escape total (obtida ao longo dos 35 treinos espaciais), ANOVA *one way* de medidas repetidas apontou a presença de efeito para o fator tratamento entre os grupos experimentais ($F_{(2,158)}=3,65$ e $P=0,028$ – Figura 4A). O procedimento de BKY indicou que tal efeito deu-se entre os grupos GVe e GCir-Di (GVe= $11,8 \pm 1,1$; GCir-Di= $16,8 \pm 2,1$; $P=0,02$) e entre GVe e GCir-Es (GCir-Es= $16,2 \pm 2,1$; $P=0,04$). Os mesmos dados de latência de escape foram utilizados para a construção de uma curva de aprendizagem (Figura 4B); entretanto devido ao número reduzido de animais nas amostras dos grupos GCir-Di e GCir-Es; não foi possível realizar a análise estatística com rigor; assim o gráfico apresenta apenas as médias diárias de latência de escape \pm E.P.M.

Figura 4. Desempenho nos treinos espaciais. Imagem 4A apresenta ao tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa ao longo dos 35 treinos espaciais no LAM. As barras representam a média \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. *P<0,005 vs GVe. ANOVA *one way* seguida pelo procedimento de BKY. A imagem 4B apresenta o tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma em cada dia do protocolo experimental do LAM. Cada ponto representa a média diária de latência de escape \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. *P<0,005 vs. D1 de cada grupo experimental. ANOVA *two ways* (fator 1: tratamento e fator 2: tempo) seguida do procedimento de BKY.



Em relação aos *probe trials*, os dados obtidos estão sumarizados na Figura 5. No primeiro *probe trial*, realizado 24 horas após o último treino espacial, ANOVA *one way* ordinária indicou a presença de efeito entre os grupos experimentais quando se comparou o tempo de retenção ($F_{(2,20)}=12,7$ e $P=0,0003$ – Figura 5A). O procedimento de BKY indicou que tal efeito deu-se entre os grupos GVe e GCir-Di (GVe= $27,0 \pm 1,0$ e GCir-Di= $20,2 \pm 1,9$; $P= 0,004$) e GVe e GCir-Es (GCir-Es= $19,2 \pm 0,7$; $P=0,001$). Quanto ao *probe trial 2*, ANOVA *one way* ordinária também indicou a presença de efeito entre os grupos ($F_{(2,20)}=10,7$ e $P= 0,0007$ – Figura 5B). Segundo o procedimento de BKY, tal efeito deu-se entre os grupos GVe e GCir-Di (GVe= $16,7 \pm 1,2$ e GCir-Di= $8,9 \pm 1,6$; $P=0,004$) e entre GVe e GCir-Es (GCir-Es= $8,7 \pm 1,2$; $P=0,0034$).

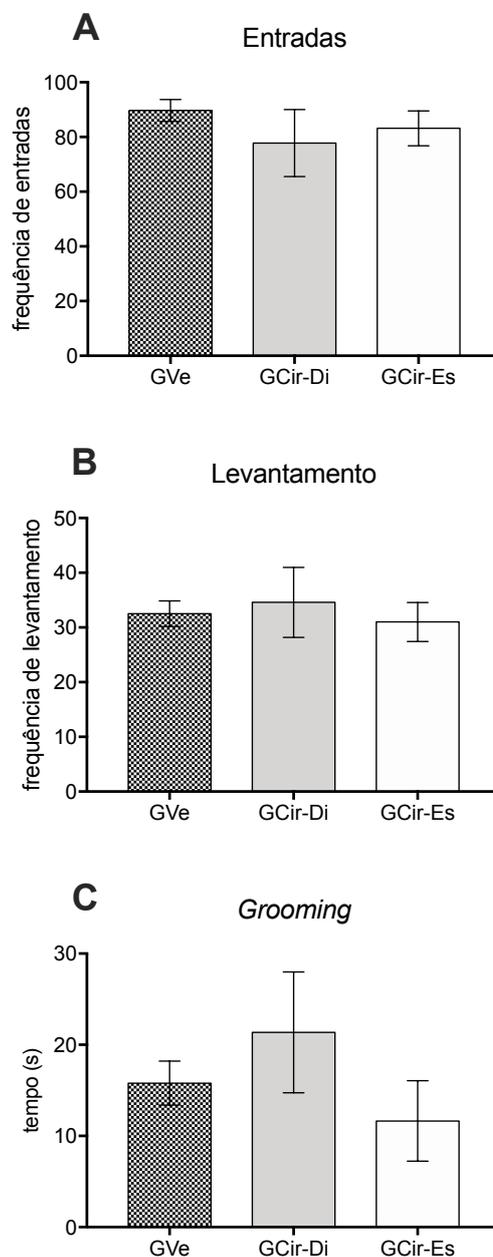
Figura 5. Tempo de retenção nos *probe trials*. Os gráficos mostram o tempo médio nadando sobre o quadrante que continha previamente a plataforma submersa durante o *probe trial* 1 (5A) e *probe trail* 2 (5B). As barras representam a média \pm E.P.M.. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* ordinária seguida do procedimento de BKY. * $P < 0,005$ comparado ao GVe. As linhas pontilhadas indicam o tempo de natação ao acaso (25%).



3.2. Teste de reconhecimento de objetos

No que concerne os dados de locomoção e exploração, ANOVA *one way* ordinária apontou ausência de efeito tanto para frequência de entradas ($F_{(2,20)}=0,87$ e $P=0,43$ – Figura 6A), quanto para frequência de levantamentos ($F_{(2,20)}=0,17$ e $P=0,84$ – Figura 6B) e tempo realizando *grooming* ($F_{(2,20)}=1,1$ e $P=0,35$ – Figura 6C).

Figura 6. Parâmetros locomotores e exploratórios. A figura 6A apresenta a frequência total de entradas nos quadrantes do aparato de campo aberto durante a primeira sessão de habituação dos animais. A figura 6B apresenta a frequência média de levantamentos no aparato de campo aberto. A figura 6C apresenta o tempo médio que os animais passaram realizando o comportamento de *grooming* durante a habituação ao campo aberto. As barras representam a média de frequência tempo \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* ordinária.



Quanto à etapa de familiarização aos objetos, ANOVA *one way* de medidas repetidas indicou ausência de efeito entres os grupos experimentais quando comparou o tempo explorando cada objeto idêntico aos quais os animais foram expostos ($F_{(5,40)}=0,51$ e $P=0,77$ – Figura 7A). Esses dados estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Média de tempo explorando objetos idênticos durante a sessão de familiarização no teste de reconhecimento de objetos.

Grupo Experimental	Objeto 1	Objeto 2	Valor de P
Grupo Veículo	24,9 ± 1,6 (s)	24,3 ± 1,9 (s)	0,99
Grupo Cir-Di	22,8 ± 1,3 (s)	21,5 ± 1,0 (s)	0,99
Grupo Cir -Es	21,7 ± 1,3 (s)	24,2 ± 1,8 (s)	0,97

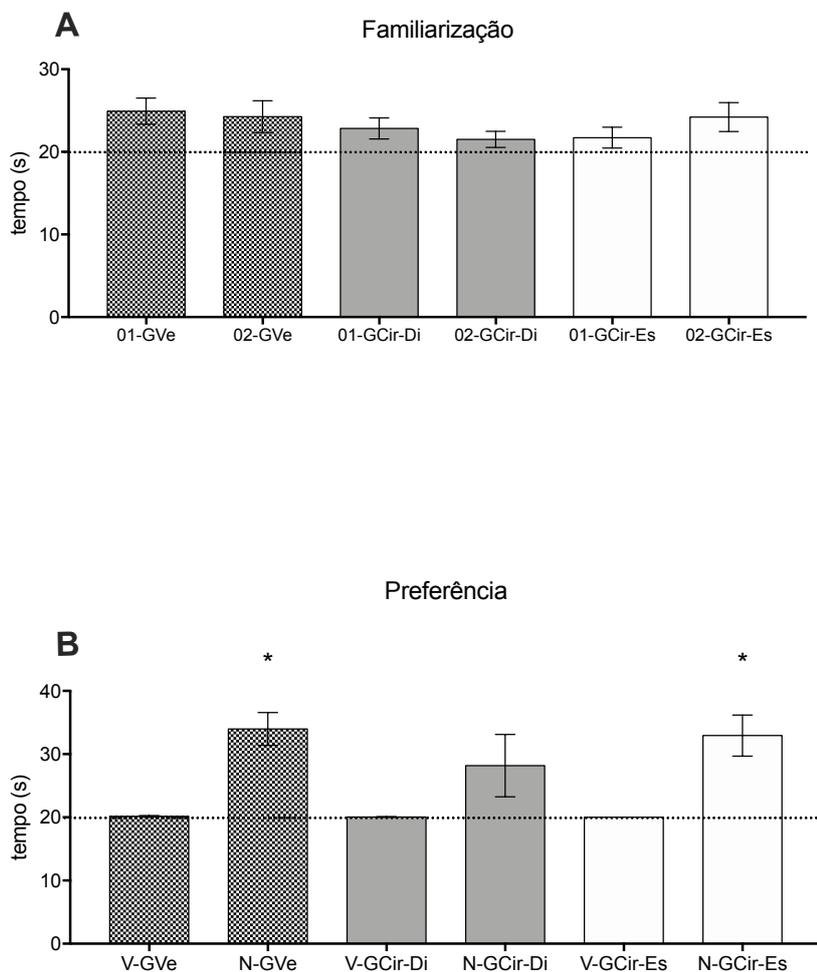
Em relação ao teste de reconhecimento propriamente dito, ANOVA *one way* de medidas repetidas indicou a presença de efeito quando comparou-se o tempo explorando os objetos aos quais já haviam sido apresentados e os novos objetos ($F_{(5,40)}=8,6$ e $P<0,0001$ – Figura 7B). O procedimento de BKY indicou que tal efeito deu-se entre o tempo explorando objeto velho e novo no grupo GVe (velho= 20,2 ± 0,2 e novo= 34 ± 2,6; $P<0,0001$) e no grupo GCir-Es (velho= 20 ± 0 e novo= 32,9 ± 3,5; $P=0,006$); enquanto que a diferença entre o tempo explorando objeto velho e novo e velho no GCir-Di não foi significativa (velho=20,1 ± 0,1 e novo= 28,2 ± 4,9; $P=0,063$).

Tendo em consideração o tempo que os animais levaram para atingir o critério de finalização das tarefas (explorar ambos objetos por ao menos 20 segundos cada) tanto na sessão de familiarização quanto no teste de reconhecimento efetivamente, ANOVA *one way* de medidas repetidas indicou ausência de efeito entre os grupos experimentais ($F_{(5,40)}= 0,83$ e $P=0,54$ – Tabela 2).

Tabela 2. Tempo médio (em segundos) que os animais levaram para atingir o critério da tarefa.

Grupo Experimental	Familiarização	Teste de reconhecimento	Valor de P
Grupo Veículo	187,4 ± 13,6 (s)	236,3 ± 16,1 (s)	0,6
Grupo Cir-Di	244,8 ± 74,3 (s)	219,2 ± 38,7 (s)	0,99
Grupo Cir -Es	205,0 ± 31,7 (s)	185,4 ± 23,6 (s)	0,99

Figura 7. Teste de reconhecimento de objetos. A figura 7A apresenta o tempo em segundos que os animais passaram explorando os objetos idênticos (01 e 02) apresentados durante a etapa de familiarização. A figura 7B apresenta a média de tempo que os animais passaram explorando o objeto com o qual foram familiarizados (velho – V) e o novo objeto (N) apresentado durante o teste de reconhecimento. As barras representam a média de tempo \pm E.P.M. $N=13$ para GVe e $N=5$ para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P<0,005$ compara ao tempo explorando o objeto velho de cada grupo. A linha pontilhada representa o tempo mínimo de 20 segundos estipulado para explorar cada objeto.

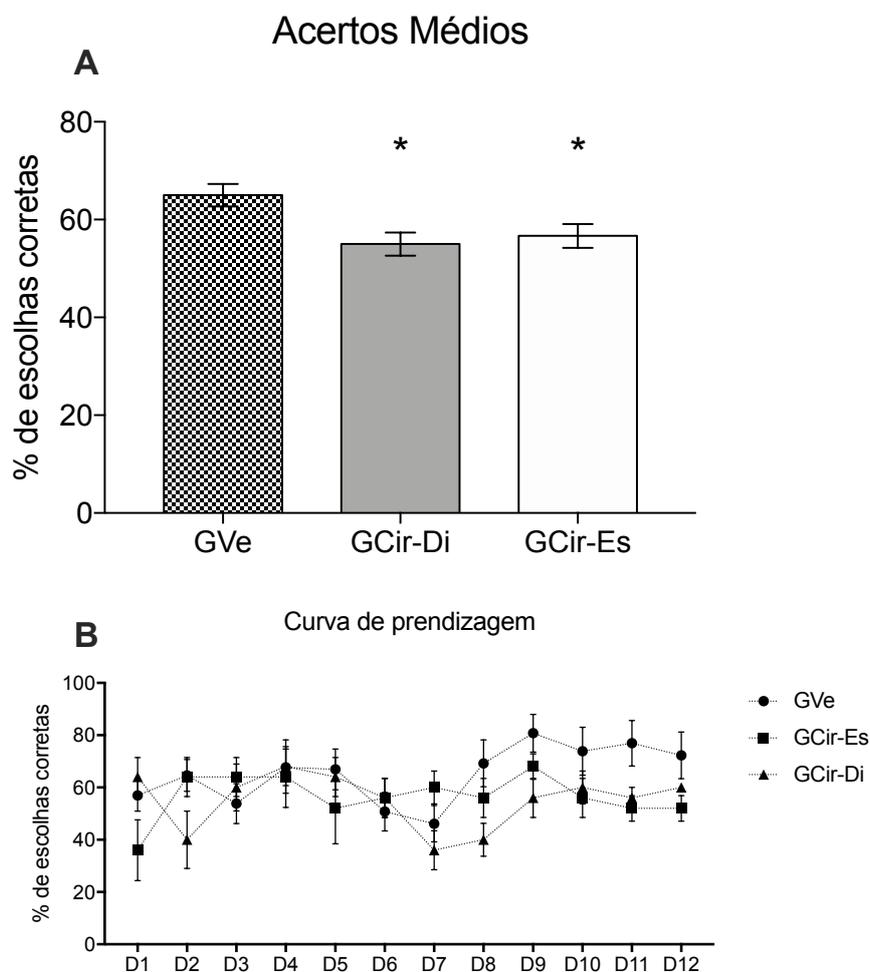


3.3. Labirinto em T forçado

Concernente aos treinos espaciais realizados no labirinto em T, ANOVA *one way* de medidas repetidas revelou efeito entre os grupos experimentais quando comparou a percentagem média de acertos (entradas nos braços com alimento acessível – $F_{(2,273)}=4,7$ e $P=0,01$ – Figura 8A). O procedimento de BKY constatou que tal efeito deu-se entre os grupos GVe e GCir-Di (GVe= $65\pm 2,3\%$ e GCir-Di= $55\pm 2,4\%$; $P=0,009$) e entre GVe e GCir-Es (GCir-Es= $56,7\pm 2,4\%$; $P=0,015$). Os mesmos dados foram empregados para a

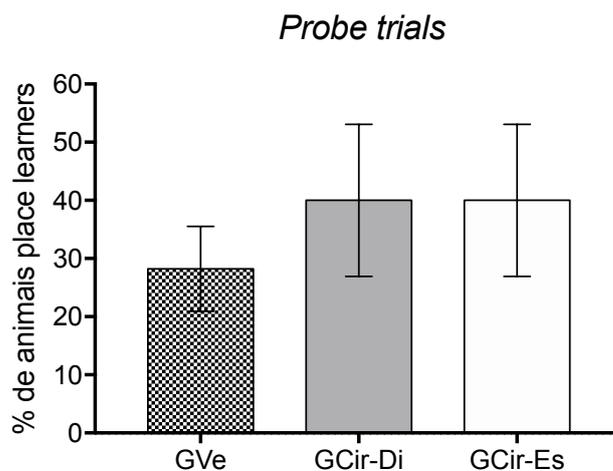
construção de uma curva de aprendizagem, distribuindo as porcentagens de acertos em médias diárias (Figura 8B). Tais dados foram submetidos a uma ANOVA *two ways* (fator 1= tratamento e fator 2 = tempo experimental) que indicou efeito para o fator tempo ($F_{(11,220)}=1,86$ e $P=0,047$) e interação entre os fatores ($F_{(22,220)}=1,63$ e $P=0,04$); ao passo que o fator tratamento *per se* não apresentou efeito segundo essa análise ($F_{(2,20)}= 0,97$ e $P=0,4$). Apesar de a ANOVA ter indicado efeito para o fator tempo, o procedimento de BKY falhou em indicar entre quais grupos esse feito se faria presente.

Figura 8. Desempenho durante os treinos espaciais. As imagens a seguir apresentam a média de porcentagem de escolhas corretas (entradas no braço com reforço alimentar acessível) como média total dos 60 treinos espaciais (8A) ou como médias diárias (8B). Para a imagem 5A, as barras representam a média de tempo \pm E.P.M. $N=13$ para GVe e $N=5$ para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* de medidas repetidas seguida pelo procedimento de BKY. * representa $P<0,005$ comparado ao GVe. Na imagem 5B, os pontos representam médias diárias de escolhas corretas \pm E.P.M. $N=13$ para GVe e $N=5$ para GCir-Di e GCir-Es.



Por fim, os dados referentes aos *probe trials* no labirinto em T estão sintetizados na figura 9. A análise por meio de ANOVA *one way* de medidas repetidas apontou ausência de efeito entre os grupos quando se comparou a porcentagem de animais classificados como *place learners*, ou seja, animais que aprenderam a navegar no paradigma por meio de aprendizado baseado em pistas aloentríca ($F_{(2,66)}=0,52$ e $P=0,6$).

Figura 9. Porcentagem de animais *place learners*. O gráfico apresenta a porcentagem média de animais classificados como *place learners* durante as três sessões de *probe trials*. As barras representam a média \pm E.P.M. N=13 para GVe e N=5 para GCir-Di e GCir-Es. ANOVA *one way* de medidas repetidas.



4. DISCUSSÃO

Os dados coletados durante o protocolo do LAM indicaram que os animais com lesão no circuito HPC-CPF, independente do hemisfério lesionado (direito ou esquerdo) apresentaram desempenho prejudicado ainda na etapa de aquisição aprendizagem dessa tarefa espacial, uma vez que apresentaram médias de latência de escape muito superiores ao do grupo controle; ou seja, levavam mais tempo para encontrar a plataforma submersa. Esse perfil de déficit permaneceu quando analisamos a capacidade de evocação dessa memória 24 horas após a finalização dos treinos espaciais (*probe trial 1* – memória recente) e 30 dias após o primeiro *probe trial* (*probe trial 2* – memória remota); em ambos os momentos, animais com lesão no circuito apresentaram tempo de retenção inferior ao dos animais controle; portanto tiveram prejuízos na capacidade de evocar informações tanto logo após a etapa de aprendizagem como remotamente.

Comparando os presentes resultados aos de experimentos anteriores, em que avaliamos separadamente o papel do HPC e do CPFm nos mesmos paradigmas, percebemos que lesões restritas ao hipocampo ventral (HPCv) não alteraram a capacidade de aquisição de informações espaciais, bem como não afetou a capacidade de evocar informações espaciais recentemente adquiridas. Entretanto, em lesões bilaterais, os animais apresentaram prejuízo na capacidade de evocar as mesmas informações remotamente adquiridas. Quanto ao CPFm *per se*; encontramos que lesões nesse sítio não reduziram a capacidade de aquisição da tarefa espacial no LAM, bem como não comprometeu a capacidade de evocar memórias espaciais recentemente adquiridas. Porém, quando avaliamos a evocação de memórias remotamente adquiridas, nota-se que qualquer lesão do CPFm (direito, esquerdo ou bilateral) prejudicou claramente o comportamento dos animais.

Diante de tais dados, levantamos a hipótese de que o perfil de dados que encontramos ao lesionarmos o circuito HPC-CPF deva-se ao fato de que os dois principais sítios de articulação desse circuito (porção ventral do HPC/subiculum e o córtex pré-límbico no CPFm) estavam lesionados, portanto a comunicação entre essas estruturas não mais existia diretamente. Ainda que a porção dorsal do hipocampo (HPCd) desses animais estivesse preservada e apta a codificar/adquirir novas informações espaciais, a principal via de “transmissão” de tais informações para estruturas corticais estava comprometida, o que pode justificar o prejuízo (não antes observado) dos animais ainda na fase de aquisição da tarefa e que perdurou durante a evocação de informações tato recém adquiridas como remotamente.

Apesar de pouquíssimos estudos abordarem especificamente o papel do circuito HPC-CPF no processamento de memórias, Floresco e colaboradores (1997) mostraram que a desconexão entre a CA1 ventral/subiculum e o córtex pré-límbico contralateral, por meio de inativações transientes, causaram prejuízo de desempenho seletivo durante a fase de teste em uma tarefa espacial. Prejuízos similares foram observados quando a inativação bilateral da região CA1/subiculum e córtex pré-límbico foi realizada (Seamans et al., 1995). Wang e Cai (2008) em um trabalho mais recente em que realizaram a desconexão reversível do circuito HPC-CPF (mais especificamente HPCv e córtex pré-límbico) encontraram resultados oponíveis aos supracitados; dado que animais com inativação ipsilateral do HPCv e córtex pré-límbico apresentaram latência de escape e tempo de retenção similar ao do grupo controle.

Vale ressaltar, que os autores descrevem que as lesões estavam restritas ao córtex pré-límbico, assim o infra-límbico estaria preservado e quando ao HPCv não descrevem especificamente quais seriam as regiões lesionadas (apenas CA1 ou envolvendo também o subiculum). Assim, é possível que o principal papel do HPC em relação ao CPFm seja de proporcionar um aprendizado rápido ao animal, de fato os efeitos descritos da desconexão HPC-CPFm são muito similares aos efeitos observados quando se inativa/lesiona o CPFm bilateralmente, embasando a ideia de que o CPFm é dependente do circuito HPC-CPFm para o aprendizado rápido e de informações contextuais (FRANKLAND et al., 2004). Novamente, nenhuma evidência de lateralização funcional foi observada.

Os resultados gerados nesse experimento por meio da realização do teste de reconhecimento de objetos, apontou que apenas o grupo tratado com veículo da droga e o grupo com lesão ipsilateral esquerda do circuito HPC-CPFm exploraram o objeto novo por mais tempo em relação ao objeto familiarizado, preservando assim sua capacidade de reconhecer o objeto ao qual foram apresentados previamente. Quanto ao grupo com lesão ipsilateral direita do circuito, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi revelada quando comparado o tempo de exploração dos objetos familiarizado e novo. Tais dados poderiam ser interpretados com uma possível lateralização funcional do circuito no processamento desse paradigma, sendo o hemilateral direito um sítio de maior relevância para o reconhecimento e discriminação de objetos. Entretanto, se observamos os resultados obtidos durante o primeiro e segundo experimentos, destacamos que independente de lesões uni (direita ou esquerda) ou bilaterais tanto do HPCv e do CPFm separadamente, nenhum prejuízo foi observado.

Assim, diante do diminuto número de animais experimentais por grupo lesionado ($n=5$), dos dados prévios gerados, e da média de tempo de exploração do objeto novo maior ($28,2 \pm 0,1$ - ainda que não significativo $P=0,06$) comparado ao tempo de exploração do objeto familiarizado ($20,06 \pm 4,9$), é mais parcimonioso assumirmos que o resultado possa não refletir uma lateralização funcional do hemilateral direito para tarefas de reconhecimento de objetos. Tais dados poderão ser confirmados perante aumento de réplicas experimentais por grupo de tratamento.

Até o presente momento, nenhum trabalho ocupou-se de avaliar o envolvimento do circuito HPC-CPFm especificamente em tarefas de reconhecimento de objeto, o que restringe e dificulta a exploração e extrapolação de nossos resultados. Perante aos numerosos trabalhos que destacam a importância das regiões extra-hipocâmpais, em

especial o córtex perirrinal na modulação desse tipo de memória episódica (HAMMOND et al., 2004; ALBASSER et al., 2009; AGGLETON et al., 2010), é expectável nos deparamos com tais dados, uma vez que em todos os experimentos desenvolvidos nesse trabalho os animais possuíam seus córtex perirrinal e regiões para-hipocampais preservadas.

Referente ao labirinto em T forçado, nossos resultados indicaram que animais com lesões ipsilaterais direita e esquerda do circuito HPC-CPFm apresentaram prejuízo para resolver a tarefa espacial comparado ao grupo veículo, dado que obtiveram porcentagem de escolhas pelo braço com alimento disponível inferior ao do grupo veículo. Esse perfil de resultados está em consonância com os dados obtidos no experimento envolvendo o CPFm desse estudo, em que grupos com lesões uni (direita ou esquerda) ou bilaterais desse sítio também apresentaram desempenho prejudicado no paradigma do labirinto em T forçado; resultado esse, de certa forma, esperado; dado que o CPFm também estava lesionado na manipulação do circuito HPC-CPFm e lesões envolvendo apenas o HPCv, não prejudicaram os animais nesse paradigma.

Diante da pouquidade de trabalhos que investigam o papel do circuito HPC-CPF em tarefas de memória espacial, artigos dedicados à memória de trabalho espacial ou ao uso do paradigma do labirinto em T forçado são ainda mais escassos. Spellman e colaboradores (2015), utilizando-se do protocolo de alternância espontânea no labirinto em T para estudo da memória de trabalho espacial, observaram que a integridade das aferências entre HPCv e CPFm são essenciais para a execução apropriada dessa tarefa. Quando inibiam as aferências entre esses sítios por técnicas de optogenéticas, os pesquisadores observaram prejuízos no desempenho dos animais em etapas iniciais, específicas para a codificação das informações espaciais. Ao passo que, durante etapas posteriores de execução da tarefa, tais como durante a manutenção ou evocação da informação espaciais, a inativação das mesmas aferências não afetou o comportamento dos animais.

Ainda, os pesquisadores observaram que durante essa fase de codificação de informações espaciais, ocorre uma sincronização de oscilações do tipo gama entre os neurônios do HPCv e CPFm. Em nosso protocolo, trabalhamos com lesões excitotóxicas permanentes, de modo que durante todo o protocolo experimental no labirinto em T, os animais estavam com a comunicação entre HPCv e CPFm comprometidas; assim é possível considerar que comunicação comprometida entre esse sítios, possivelmente levou ao desempenho prejudicado que observamos nesse paradigma.

Liu e colaboradores, em um trabalho recente (2018), também investigando a memória de trabalho espacial, agora no labirinto em Y; assim como no trabalho supracitado observaram a presença de atividade neuronal sincrônica entre o HPCv e o CPFm durante a execução desse paradigma. Esses autores ainda constataram que atividade neural iniciada no HPCv e direcionada ao CPFm via aferências diretas precede a tomada de decisão correta do animal durante a execução da tarefa. Assim, os autores propõem que, em tais situações, o HPCv parece desempenhar um papel mais determinante na execução bem-sucedida da memória de trabalho espacial quando comparado ao CPFm. Entretanto, quando direcionamos atenção para os dados obtidos ao longo do três experimentos desenvolvidos nesse trabalho, observamos que lesões uni ou bilaterais do HPCv não afetaram o desempenho dos animais no labirinto em T, ao passo que lesões uni ou bilaterais do CPFm e lesões ipsilaterais (direita e esquerda) do circuito HPCv-CPFm prejudicaram o desempenho dos animais nessa mesma tarefa. Dessa forma, nossos dados contradizem o proposto pelas autores nesse último trabalho citado. De qualquer forma, em todos os estudos citados, a comunicação íntegra entre HPCv e CPFm parece ser essencial para a execução apropriada da memória de trabalho espacial.

5. CONCLUSÕES FINAIS

Diante dos dados gerados nesse estudo é possível depreender que o HPCv, de fato, parece não ser a sub-região hipocampal elementar para o processamento de memórias episódicas espaciais, dado que quaisquer lesões nesse sítio não prejudicaram o desempenho dos animais nas tarefas aos quais foram submetido. Entretanto, parece desempenhar papel significativo no processo de evocação de memórias episódicas remotamente adquiridas, dado que animais com lesões bilaterais nessa região tiveram evocação de memória prejudicada compara aos demais grupos. Dada a articulação íntima dessa estrutura com o CPFm, levantamos a hipótese de que tal prejuízo se dê por conta da desconexão entre essas estruturas, uma vez que a evocação de memória remotas pelo CPFm parece ocorrer concomitantemente com ativações de neurônios hipocampais, possivelmente contribuindo com informações a respeito do contexto onde os comportamentos precisam ser guiados. A inexistência de efeitos sobre aquisição de informações e evocação das memórias recém adquiridas, possivelmente deva-se ao fato de que a porção dorsal do HPC ainda estar preservada, dada a grande importância que esta possui para a aquisição e consolidação de memórias episódicas.

Nossos dados sobre CPFm, reforçam a hipótese de que essa região participe mais ativamente da evocação de memórias remotas do que das recentes ou até mesmo da fase de aquisição de informações espaciais; dado que nossos dados sugerem um envolvimento seletivo do CPFm na evocação das memórias remotas. Reafirmamos também o papel do CPFm em tarefas que envolvam avaliação de informações e tomada de decisões, dado que na tarefa com reforço alimentar empregada nesse estudo (labirinto em T) os animais com CPFm lesionado (uni ou bilateral) tiveram desempenho prejudicado. Assim, em tais condições o CPFm parece ser relevante ainda na fase de aquisição ou expressão de memória de trabalho.

Por fim, os resultados obtidos pelo experimento final, lesão ipsilateral do circuito HPC-CPFm; somam-se as ideias previamente postuladas nos experimentos anteriores. Apesar da integridade do HPCd; a articulação entre as porções componentes do circuito HPC-CPFm parece ser fundamental para aquisição e evocação de memórias episódicas; dado que os animais apresentaram prejuízos expressivos em fases de aquisição das tarefas e evocação de memórias independente de seu tempo de aquisição.

Nenhum efeito foi observado sobre a memória de reconhecimento, possivelmente por ser uma função mais associada a tecidos extra-hipocampais, tal como o córtex perirrinal que esteve preservado durante todas nossas manipulações. Apesar das recentes evidências de lateralização do CPFm em tarefas cognitivas e do HPC na aquisição e modulação de memórias, nenhum indicativo de lateralização funcional foi observada nesse estudo; possivelmente dada a natureza complexa de memórias episódicas e sua riqueza de informações distintas que se articulam.

É válido ressaltar que a memória (independente de seu conteúdo) trata-se de um processo altamente dinâmico e articulado no qual representações de eventos/contextos/experiências são constantemente atualizados por meio de incorporação contínua de novas informações do ambiente, o que faz dessa capacidade cognitiva um objeto de estudo altamente complexo e de compreensão lenta, ainda que muitos pesquisadores dediquem sua carreira tentando desvendá-la. Existem muitas questões a serem atendidas quanto ao papel desse circuito (HPC-CPFm) na modulação da memória e quais os mecanismos de neuroplasticidade envolvidos nesse processo. Entretanto, hoje possuímos conhecimento suficiente e metodologias para começarmos a compreender como se dá seu funcionamento basal e a partir de então lançar luz sobre como o mau funcionamento do mesmo pode estar relacionado a determinadas doenças que afetam a

capacidade cognitiva do indivíduo, tais como doença de Alzheimer ou mesmo a esquizofrenia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGLETON, J. P.; ALBASSER, M. M.; AGGLETON, D. J.; POIRIER, G. L.; PEARCE, J. M. Lesions of the Rat Perirhinal Cortex Spare the Acquisition of a Complex Configural Visual Discrimination Yet Impair Object Recognition. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, p. 55 – 68, 2010.

ALBASSER, M. M.; DAVIES, M.; AGGLETON, J. P. Magnitude of the Object Recognition Deficit Associated With Perirhinal Cortex Damage in Rats: Effects of Varying the Lesion Extent and the Duration of the Sample Period. **Behavioral Neuroscience**, v. 123, p. 115 – 124, 2009.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 31 – 39, 1993.

BRITO, G. N. O.; BRITO, L. S. O. Septohippocampal system and the prelimbic sector of frontal cortex: A neuropsychological battery analysis in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 36, p. 127–146, 1990.

CARMICHAEL, S. T.; PRICE, J. L. Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. **Journal of Comparative Neurology**, v. 363, p. 615 – 641, 1995.

CAVADA, C.; LLAMAS, A.; REINOSO-SUÁREZ, F. Allocortical afferent connections of the prefrontal cortex of the cat. **Brain Research**, v. 260, p. 117 – 120, 1983.

DELATOUR, B.; GISQUET-VERRIER, P. Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, p. 1282 – 1298, 1996.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. **Neuron**, v. 76, p. 1057 – 1070, 2012.

FLORESCO, S. B.; SEAMANS, J. K.; PHILLIPS, A. G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. **The Journal of neuroscience**, v. 17, p. 1880 – 1890, 1997.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B.; TALTON, L. E.; KACZMAREK, L.; SILVA, A. J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science**, v. 304, p. 881 – 883, 2004.

FUSTER, J. M. Behavioral electrophysiology of the prefrontal cortex. **Trends in Neurosciences**, v. 71, p. 408 – 414, 1984.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; SELEMON, L. D.; SCHWARTZ, M. L. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. **Neuroscience**, v. 12, 1984.

GRANON, S.; VIDAL, C.; THINUS-BLANC, C.; CHANGEUX, J. P.; POU CET, B. Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, p. 883 – 891, 1994.

HAMMOND, R. S.; TULL, L. E.; STACKMAN, R. W. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, p. 26 – 34, 2004.

HELEN, B.; BLATT, G. J. Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. **Hippocampus**, v. 5, p. 511 – 533, 1995.

JAY, T. M.; THIERRY, A. M.; WIKLUND, L.; GLOWINSKI, J. Excitatory Amino Acid Pathway from the Hippocampus to the Prefrontal Cortex. Contribution of AMPA Receptors in Hippocampo-prefrontal Cortex Transmission. **European Journal of Neuroscience**, v. 4, p. 1285 – 1295, 1992.

JAY, T. M.; BURETTE, F.; LAROCHE, S. NMDA Receptor-dependent Long-term Potentiation in the Hippocampal Afferent Fibre System to the Prefrontal Cortex in the Rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 7, p. 247 – 250, 1995.

JAY, T. M.; BURETTE, F.; LAROCHE, S. Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses. **Journal of Physiology Paris**, v. 90, p. 361 – 366, 1996.

JAY, T. M.; GLOWINSKI, J.; THIERRY, A. M. Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. **Brain Research**, v. 505, p. 337 – 340, 1989.

JAY, T. M.; WITTER, M. P. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **Journal of Comparative Neurology**, v. 313, p. 574 – 586, 1991.

JIN, J.; MAREN, S. Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 9, p. 1 - 8, 2015.

LAROCHE, S.; DAVIS, S.; JAY, T. M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. **Hippocampus**, v. 10, p. 438 – 446, 2000.

LAROCHE, S.; JAY, T. M.; THIERRY, A. M. Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. **Neuroscience Letters**, v. 114, p. 184 – 190, 1990.

LIU, T.; BAI, W.; XIA, M.; TIAN, X. Directional hippocampal-prefrontal interactions during working memory. **Behavioural Brain Research**, v. 338, p. 1–8, 2018.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrate theory of PFC function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 167 – 202, 2001.

MORROW, B. A.; ELSWORTH, J. D.; INGLIS, F. M.; ROTH, R. H. An antisense oligonucleotide reverses the footshock-induced expression of Fos in the rat medial prefrontal cortex and the subsequent expression of conditioned fear-induced immobility. **Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 5666 – 5673, 1999.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Sexta edição. New York: Editora Academic Press, 2005.

PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. **Current Biology**, v. 23, p. R764 – R773, 2013.

DAMASIO, A. R. Time-locked multiregional retroactivation: a systems-level proposal for the neural substrates of recall and recognition. **Cognition**, v. 33, p. 25 – 62, 1989.

ROSENE, D. L.; VAN HOESEN, G. W. Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. **Science**, v. 198, p. 315 – 317, 1977.

SEAMANS, J. K.; FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, A. G. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. **Behavioral neuroscience**, v. 109, p. 1063 – 1073, 1995.

SESACK, S. R.; DEUTCH, A. Y.; ROTH, R. H.; BUNNEY, B. S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Journal of Comparative Neurology**, v. 290, p. 213 – 242, 1989.

SPELLMAN, T.; RIGOTTI, M.; AHMARI, S. E.; FUSI, S.; GOGOS, J. A.; GORDON, J. A. Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. **Nature**, v. 522, p. 309 – 314, 2015.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological review**, v. 99, p. 195 – 231, 1992.

TSUMOTO, T. Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. **Progress in Neurobiology**, v. 39, p. 209 – 228, 1992.

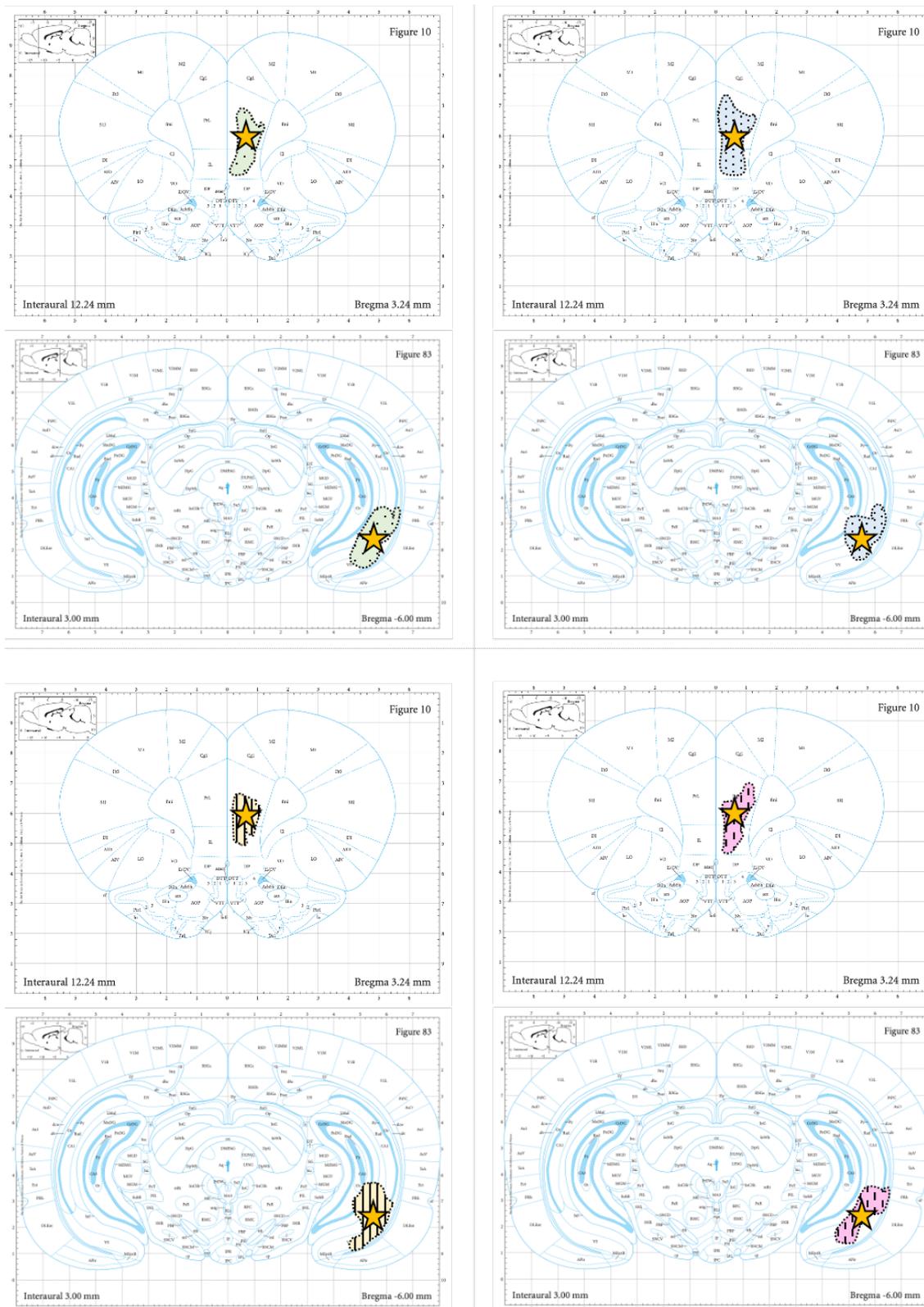
WANG, G. W.; CAI, J. X. Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic cortical circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, p. 365 – 373, 2008.

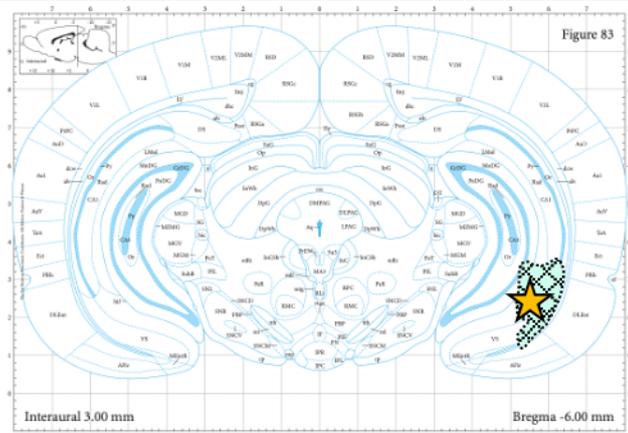
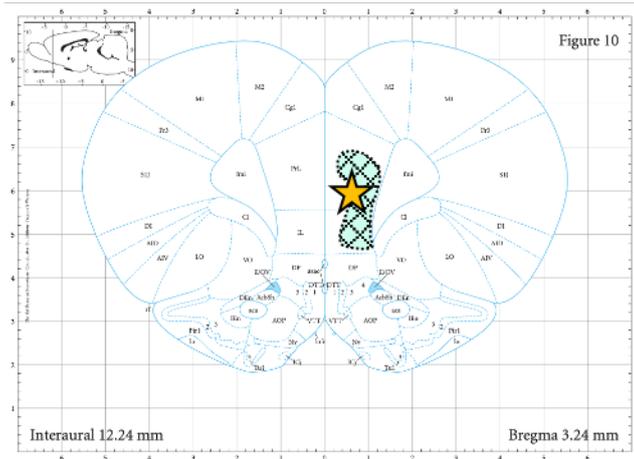
WICKELGREN, W. A. Chunking and consolidation: A theoretical synthesis of semantic networks, configuring in conditioning, S-R versus cognitive learning, normal forgetting, the amnesic syndrome, and the hippocampal arousal system. **Psychological Review**, v. 86, p. 44 – 60, 1979.

WITTER, M. P.; GROENEWEGEN, H. J.; DA SILVA, F. H. L.; LOHMAN, A. H.
Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal
region. **Progress in Neurobiology**, v. 33, p. 161 – 253, 1989.

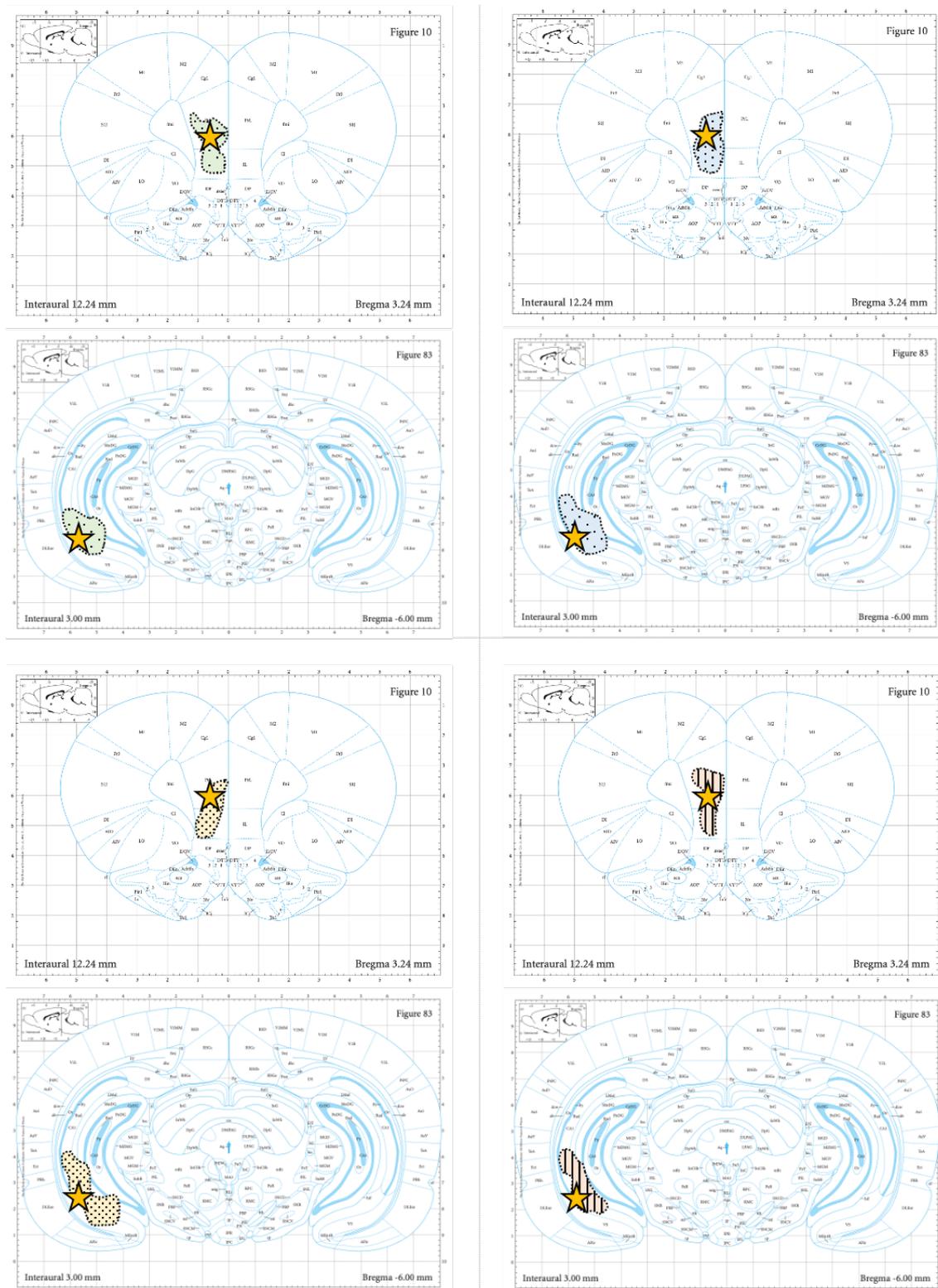
7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1 - Prancha com imagens representativas dos sítios lesionados nos animais pertencentes ao grupo com lesão no circuito hipocampo – córtex pré-frontal medial esquerdo ipsilaterais.





7.2. ANEXO 2 - Prancha com imagens representativas dos sítios lesionados nos animais pertencentes ao grupo com lesão no circuito hipocampo – córtex pré-frontal medial direitos ipsilaterais.



CAPÍTULO 5

Considerações finais e perspectivas futuras

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em face dos resultados apresentados ao longo desse estudo; foi possível perceber que o circuito hipocampo-córtex pré-frontal medial (HPC – CPFm) de fato trata-se de uma via encefálica extremamente importante para o processamento de memórias episódicas espaciais, dados que manipulação nesse circuito como um todo ou em suas partes separadamente, produziram, em algum nível, desempenho prejudicado na execução das tarefas pelos animais.

O hipocampo ventral (HPCv), ainda que seja a principal sub-região hipocampal com a qual o córtex pré-frontal medial se articula, mostrou-se uma estrutura relacionada principalmente a evocação de memórias espaciais remotamente adquiridas. Enquanto etapas de aquisição e evocação de memórias espaciais recentes não foram afetadas pela manipulação dessa estrutura.

O córtex pré-frontal medial per se, mostrou-se ativamente relacionado com a evocação de memórias espaciais independente do seu tempo de aquisição, evidenciando que essa estrutura possa participar já em etapas iniciais no processamento de memórias episódicas. Especialmente quando a tarefa envolve comportamentos guiados ou reforços positivos, como pudemos observar no labirinto em T forçado, em que a lesão (ainda que unilateral) do CPFm prejudicou a etapa de aquisição desse paradigma.

Manipulações do circuito HPC-CPFm mostrara-se igualmente críticas para o processamento de memórias episódicas, assim como as manipulações eram realizadas em sua sub-regiões separadamente. Corroborando as evidencias de que esse circuito de fato, é chave para a biologia de memórias contextuais/episódicas no encéfalo de mamíferos.

Surpreendentemente, nenhuma evidência de lateralização funcional foi observada nesse estudo, para nenhuma das regiões encefálicas manipuladas e nenhum dos teste comportamentais elencados para esse estudo. É possível que devido a natureza complexa e a riqueza de módulos distintos que compõem memórias episódicas, a lateralização funcional seja um atributo biologicamente inviável para o processamento dessas informações.

2. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse estudo foi um dos primeiros (e o primeiro em alguns pontos/aspectos) a dedicar sua atenção e esforços para o estudo HPCv e CPFm no processamento temporal

de memórias episódicas. Especialmente com um olhar sobre as possibilidades de o circuito HPC-CPFm e suas partes separadas, atuarem como estruturas bilaterais, com funções e características distintas no processamento de memórias, questão essa que tem sido historicamente negligenciada pela comunidade de neurocientistas.

Diante de tantos dados produzidos, esse trabalho abre canais para inúmeros desdobramentos e investigações que venham a somar e construir um entendimento mais abrangente desse circuito e dessa função biológica tão instigante que é a memória. Assim, levantamos algumas instigações a serem investigadas; (i) a investigação do papel do HPCv e/ou CPFm no processamento de memórias emocionais, como condicionamento ao contexto; incluindo-se um perspectiva temporal dessa memórias (recente e remotas) e análise de possível lateralização dessa região nessas tarefas; (ii) inativação transiente uni e bilaterais das regiões alvo desse estudo (HPCv e CPFm) durante as diferentes etapas da memória (aquisição, consolidação, evocação de memórias recentes e evocação de memórias remotas) para uma análise mais refinada e (iii) estudo das sub-regiões das estruturas alvo desse estudo); como realizar a manipulação especificamente o subiculum, ou CA1/CA2 do HPCv; bem como uma análise das funções separadas do córtex pré-límbico e infralímbico do CPFm na modulação da memória e suas possíveis lateralizações funcionais.

Muitos foram os esforços e contribuições desse trabalho; entretanto, muito também permanece a ser estudado e pesquisado acerca da modulação da memória espacial; seus possíveis substratos encefálicos que permitem o processamento temporal das mesmas, bem como sua possível e debatida lateralização funcional. O presente estudo fornece importantes substratos metodológicos, filosóficos, conceituais para fomentar esforços contínuos nessa área e trazer luz a neurobiologia da memória.

