



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Gabrielle Araujo Pimentel

**Direito ou esquerdo? Avaliação da lateralização funcional do
hipocampo dorsal na modulação da memória de reconhecimento e
espacial de ratos *Wistar***

São José do Rio Preto

2020

Gabrielle Araujo Pimentel

Direito ou esquerdo? Avaliação da lateralização funcional do hipocampo dorsal na modulação da memória de reconhecimento e espacial de ratos *Wistar*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras:

CNPq – Processo nº 131146/2018-1

Fapesp – Processo nº 2016/07464-0

Faperp – Processo nº 089/2019

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

São José do Rio Preto

2020

P644d	Pimentel, Gabrielle Araujo Direito ou esquerdo? Avaliação da lateralização funcional do hipocampo dorsal na modulação da memória de reconhecimento e espacial de ratos Wistar / Gabrielle Araujo Pimentel. -- São José do Rio Preto, 2020 74 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Luiz Henrique Florindo 1. Neurofisiologia. 2. Memória. 3. Navegação espacial. 4. Hipocampo. 5. CA3. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabrielle Araujo Pimentel

Direito ou esquerdo? Avaliação da lateralização funcional do hipocampo dorsal na modulação da memória de reconhecimento e espacial de ratos *Wistar*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadoras:

CNPq – Processo nº 131146/2018-1

Fapesp – Processo nº 2016/07464-0

Faperp – Processo nº 089/2019

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Prof^a. Dr^a. Azair Liane Matos do Canto de Souza

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

Prof^a. Dr^a. Rejane Maíra Góes

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
23 de Março de 2020

Dedico este trabalho primeiramente a minha irmã, Nathália, por todo seu incentivo, por acreditar no meu potencial e estimular meus maiores sonhos.

Aos meus Pais, Dulcinéia e Luiz, que com todo amor, carinho, estímulo e compreensão me apoiaram durante esses anos.

Ao meu noivo, Vinicius, por me apoiar nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Dulcinéia e Luiz, por todo apoio e incentivo desde os meus primeiros passos, e que só aumentou com o passar do tempo. Obrigado pelas idas e vindas ao laboratório, a preocupação com minhas aulas, meus experimentos, o quanto eu estava estressada e se eu estava conseguindo escrever sem interrupções. Obrigado por todo esse amor e carinho, sem vocês eu não seria capaz de realizar esse trabalho.

Agradeço aos meus irmãos, Nathália e Thiago, e cunhados, Eduardo e Ana Paula, pelas conversas sobre meu Mestrado, sobre a vida e o futuro. Um agradecimento especial a minha irmã Nathalia e meu cunhado Eduardo pelas horas discutindo meu projeto e a vida acadêmica e principalmente, por sempre estarem dispostos e interessados em me ajudar e oferecer um ombro amigo. Vocês deixaram os medos e inseguranças mais leves.

Um agradecimento especial ao meu noivo Vinicius que me acompanhou nas vindas ao laboratório em fins de semana e feriados sem nunca soltar minha mão e dizer que tudo daria certo. Obrigado por todas as nossas conversas, por estar ao meu lado frente aos meus medos e paranoias, por estar sempre me lembrando dos meus sonhos e por nunca deixar de acreditar em mim e também nunca deixar que eu não confiasse em mim mesma.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados (LZCV), Ariela, Victor, Vinicius, Igor, Isadora, Mariana e Nathália que estavam presentes em todos os anos que eu passei no laboratório. Obrigado por me acolherem nesse círculo de amizade e me proporcionar momentos de descontração como só vocês sabem fazer, por todas as brincadeiras e risadas. Além disso, “tirando o fone”, agradeço muito pelas conversas sérias sobre futuro, sobre a vida e também por me ajudarem no meu amadurecimento na carreira acadêmica e também na vida.

Agradeço a Ariela, que me acompanha desde a iniciação científica, primeiro como coorientadora e agora como parceira de pesquisa, e mesmo assim, sempre me ajudando, incentivando e orientando em todos os aspectos. Foi um privilégio trabalhar com você durante esses anos e aprender um pouquinho de tudo o que você sabe. Além disso, obrigada pela amizade que surgiu ao longo desse período de laboratório e nossas conversas.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo, não só por acreditar em mim e no meu potencial, mas por todas as conversas, conselhos e ajuda para enfrentar os dias difíceis da ciência Brasileira. Sou grata por ter me

proporcionado todo o conhecimento que adquiri ao longo desses anos de pesquisa e por ter me aceitado no laboratório quando eu ainda estava no meu primeiro ano de graduação, abrindo as portas para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao técnico Carlos por toda a ajuda e cuidados com meus animais. Da mesma forma, agradeço ao técnico Luís e o pessoal do laboratório de microscopia pela paciência em me auxiliar na realização da histologia desse trabalho. Agradeço também aos coordenadores do Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises pela concessão da infraestrutura necessária para a realização de toda a parte histológica desse trabalho.

Meu muito obrigado ao IBILCE/UNESP, local que durante muito tempo foi minha segunda casa. Agradeço por todo o período que passei neste local, que me proporcionou, além do laboratório, conhecimento e obtenção da minha profissão, o privilégio de conhecer várias pessoas que moldaram meu crescimento e participaram direta ou indiretamente de tudo que realizei. Aproveito para agradecer a Bia, Gabi e Le, amigas de longa data, que dividiram comigo todas as angústias da graduação e da pós-graduação.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de pesquisa, processo nº131146/2018-1. Da mesma forma, agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do apoio a pesquisa, processo nº 2016/07464-0 e a Faperp (Fundação de Apoio a Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto) pela concessão do auxílio à pesquisa, processo nº 089/2019. Foram a bolsa e os auxílios concedidos que propiciaram a realização dessa pesquisa sem eventuais impossibilidades que cercam tantos projetos científicos atualmente.

“Fisicamente, habitamos um espaço, mas, sentimentalmente, somos habitados por uma memória” (SARAMAGO, J.; 2009).

Resumo

Atualmente é bem estabelecido que o hipocampo (HPC) possui um papel importante nos processamentos de aprendizagem e memória. No entanto, existem controvérsias sobre as funções das sub-regiões do Corno de Amon (CA) do HPC propriamente dito e em relação à lateralização funcional dessa estrutura. A partir disso, a função do hipocampo dorsal (HPCd) na memória de reconhecimento e espacial (recente e remota), foi analisada através da inativação direita, esquerda ou bilateral da área CA3. Foram utilizados 37 ratos *Wistar* distribuídos em quatro grupos: grupo GVe (n=8), que receberam injeção bilateral de tampão fosfato-salina (PBS - veículo) na região CA3 do HPCd; grupo HPCd-D (n=9), que receberam injeção do lesionador ácido ibotênico (IBO) na região do hemisfério direito; grupo HPCd-E (n=10), que receberam injeção de IBO na região do hemisfério esquerdo; e grupo HPCd-BI (n=10), que receberam injeção bilateral de IBO na região de ambos HPCd. Os animais foram submetidos ao labirinto aquático de Morris (LAM), teste de reconhecimento de objetos (TRO) e labirinto em T forçado. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Shapiro-Wilk, seguido de análise de variância (ANOVA), e pelo teste de Tukey para dados paramétricos, ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn para dados não paramétricos. Foi admitido nível de significância para $p < 0,05$. Nenhum dos animais apresentou comprometimento para realização de comportamentos exploratórios. Não houve diferenças entre os animais em relação a estratégia de navegação aloentríca no labirinto em T e também na fase de treinos e testes de memória espacial recente e remota no LAM, indicando que a região CA3 de ambos os HPCd não está relacionada com o processamento dessas memórias. No entanto, os animais lesionados uni e bilateralmente diferiram do GVe nos treinos do labirinto em T, sem lateralização funcional, e no TRO, com presença de lateralização funcional. Os animais lesionados no hemisfério direito e bilateralmente não reconheceram o objeto familiar. Dessa forma, a região encefálica avaliada está relacionada com o processamento da memória espacial de trabalho no labirinto em T e a estrutura do hemisfério direito tem maior contribuição no processamento da memória de reconhecimento. A lateralização funcional observada no TRO é inédita e direciona novas pesquisas relacionadas a disfunções com perda de memória de reconhecimento, como envelhecimento e doença de Alzheimer.

PALAVRAS-CHAVE: navegação espacial, CA3, memória espacial, memória de reconhecimento, familiaridade.

ABSTRACT

Currently the hippocampus (HPC) has a well established role in learning and memory processing. However, there are controversies about the functions of sub-regions of the Cornu de Ammon (CA) of the HPC itself and in relation to the functional lateralization of this structure. From this, the function of the dorsal hippocampus (dHPC) in the recognition and spatial memory (recent and remote), was analyzed through the right, left or bilateral inactivation of the CA3 area. Thirty seven Wistar rats were distributed in four groups: group GVe (n = 8), with animals received bilateral injection of phosphate-saline buffer (PBS - vehicle) in the CA3 region of dHPC; group dHPC-R (n = 9), with animals received an injection of the ibotenic acid injury (IBO) in the right hemisphere region; group dHPC-L (n = 10), with animals received an IBO injection in the left hemisphere region; and group dHPC-BI, with animals received bilateral IBO injection in the region of both HPCd. The animals were submitted to the Morris water maze (MWM), object recognition test (ORT) and forced T maze. Data were by first analyzed by Shapiro-Wilk's homogeneity test, followed by analysis of variance (ANOVA), and by Tukey's post-test for parametric data, or by Kruskal-Wallis's test followed by Dunn's post-test for non-parametric data. Significance level was admitted for $p < 0.05$. None of the animals was compromised to perform exploratory behaviors. There were no differences between the animals in relation to the allocentric navigation strategy in the T maze and also in the training phase and tests of recent and remote spatial memory in the LAM, indicating that the CA3 region of both dHPC is not related to the processing of these memories. However, the animals injured unilaterally and bilaterally differed from the GVe in the training of t maze, without functional lateralization, and in the ORT, with the presence of functional lateralization. Animals injured in the right hemisphere and bilaterally didn't recognize the familiar object. Thus, the brain region evaluated is related to the processing of spatial working memory in the t maze and the structure of the right hemisphere has a greater contribution in the processing of recognition memory. The functional lateralization observed in ORT is unprecedented and directs new research related to dysfunctions with loss of recognition memory, like this as aging and Alzheimer's disease.

KEYWORDS: space navigation, CA3, spatial memory, recognition memory, familiarity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posição e estruturas do hipocampo de roedores.....	19
Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental demonstrando todos os experimentos em que os animais experimentais foram submetidos.....	26
Figura 3. Representação do labirinto aquático de Morris.....	27
Figura 4. Representação do Teste de reconhecimento de objetos.	29
Figura 5. Representação do labirinto em “T” forçado.....	33
Figura 6. Representações esquemáticas dos sítios de injeção considerados acertos para os procedimentos cirúrgicos da área CA3 do HPCd direito e esquerdo... ..	35
Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo que representam o local da entrada da agulha de infusão.. ..	37
Figura 8. Fotomicrografias de cortes histológicos do HPCd de ambos os hemisférios de um animal do GVe.....	37
Figura 9. Fotomicrografia de um corte histológico com secção coronal mais anterior do encéfalo de um animal do GVe... ..	38
Figura 10. Fotomicrografias de cortes histológicos do HPCd do hemisfério direito de um animal do HPCd-D.	39
Figura 11. Fotomicrografia e esquematização de um corte histológico com secção coronal mais anterior do encéfalo representando os animais do HPCd-D.	39
Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos do HPCd do hemisfério esquerdo de um animal do HPCd-E.....	40
Figura 13. Fotomicrografia e esquematização de um corte histológico com secção coronal mais anterior do encéfalo representando os animais do HPCd-E.....	40
Figura 14. Fotomicrografias de cortes histológicos do HPCd de ambos os hemisférios de um animal do HPCd-BI.... ..	41
Figura 15. Fotomicrografia e esquematização de um corte histológico com secção coronal mais anterior do encéfalo representando os animais do HPCd-BI.	41
Figura 16. Latência geral de escape. O gráfico representa o tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa durante os 35 treinos espaciais do LAM.. ..	42
Figura 17. Curva de aprendizagem do LAM. A curva representa a variação da latência de escape geral de cada dia para cada grupo ao longo dos sete dias de treinos espaciais.....	43

Figura 18. <i>Probe trials</i> do LAM. Os gráficos representam o tempo médio de retenção dos animais dos quatro grupos no quadrante no qual antes havia a plataforma submersa.	44
Figura 19. Frequência de entrada nos quadrantes do campo aberto. O gráfico representa a média de locomoção total durante a primeira habituação ao campo aberto.	45
Figura 20. Frequência de levantamento no campo aberto. O gráfico representa a média da frequência de exploração vertical dos animais durante a primeira habituação ao campo aberto.	45
Figura 21. Tempo de realização do <i>grooming</i> no campo aberto. O gráfico representa a média de segundos que os animais passaram realizando o comportamento de auto-limpeza durante a primeira habituação ao campo aberto.	46
Figura 22. Familiarização. O gráfico representa o tempo médio que os animais passaram investigando dois objetos iguais durante a familiarização do TRO.	47
Figura 23. Teste de reconhecimento. O gráfico representa o tempo médio que os animais passaram investigando o objeto familiarizado (velho) e o objeto novo durante a sessão de teste do TRO.	47
Figura 24. Porcentagem de acertos dos treinos do labirinto em T. O gráfico representa a porcentagem de animais que encontraram e consumiram o alimento disponível em um dos braços do labirinto.	48
Figura 25. Curva de aprendizagem do labirinto em T. A curva representa a variação diária da porcentagem de acertos para cada grupo ao longo dos 12 dias de experimentos.	49
Figura 26. Porcentagem de animais <i>place learners</i> . O gráfico representa a porcentagem média de animais que optaram pelo braço onde antes havia alimento durante três sessões de <i>probe trials</i> .	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Latência de escape diária do LAM. A tabela representa a média da latência de escape diário em segundos para os animais dos quatro grupos experimentais....	43
Tabela 2. Média de tempo (segundos) que os animais levaram para atingir o critério de investigação de 20 segundos para cada objeto durante a familiarização e o teste de reconhecimento no TRO.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	análise de variância
AP	antero posterior
CA	cornu de Amon
CA1	cornu de Amon 1
CA2	cornu de Amon 2
CA3	cornu de Amon 3
DV	dorso ventral
GD	giro dentado
GVe	grupo veículo
HPC	hipocampo
HPCd	hipocampo dorsal
HPCd-BI	grupo lesionado no hipocampo dorsal direito e esquerdo
HPCd-D	grupo com lesão no hipocampo dorsal direito
HPCd-E	grupo com lesão no hipocampo dorsal esquerdo
HPCv	hipocampo ventral
IBO	ácido ibotênico
Kg	quilograma
LAM	labirinto aquático de Morris
mg	miligrama
min	minuto
ML	linha medial
mm	milímetro
NMDA	N-metil D-Aspartato
PBS	tampão fosfato-salina
E.P.M.	erro padrão da média
TRO	teste de reconhecimento de objetos
°C	graus celsius
®	marca registrada
µg	micrograma
µl	microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Animais	22
3.2. Procedimentos experimentais	23
3.2.1. Grupos experimentais	23
3.2.2. Procedimentos cirúrgicos	23
3.2.3. Testes comportamentais	26
3.2.3.1. Labirinto aquático de Morris (LAM)	27
3.2.3.2. Teste de reconhecimento de objetos (TRO)	28
3.2.3.3. Labirinto em T forçado	31
3.2.4. Análise histológica	33
3.2.5. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Análise histológica	36
4.2. Labirinto aquático de Morris (LAM)	42
4.3. Teste de reconhecimento de objetos (TRO)	44
4.3.1. Habituação: comportamentos exploratórios	44
4.3.2. Familiarização e teste de reconhecimento	46
4.4. Labirinto em T forçado	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
Apêndice A - Protocolo de coloração das lâminas histológicas	73

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de aprendizagem ocorrem mudanças comportamentais a partir da aquisição de novos conhecimentos (KANDEL et al., 2014). Desde o nascimento de um indivíduo há o princípio de “ganho pelo uso, perda pelo desuso” o qual governa a conectividade neuronal nas respectivas partes do encéfalo (GUYTON; HALL, 2011). Dentre os processos de aprendizado, podemos citar: o aprendizado associativo, que inclui o condicionamento clássico e o operante; e o aprendizado não associativo, que se relaciona com a habituação e sensibilização (KANDEL et al., 2014). No condicionamento clássico, descrito por Ivan Pavlov, existe uma associação entre estímulos no qual o animal tende a prever eventos. No condicionamento operante, muito estudada por B.F. Skinner, a resposta é fortalecida com um reforço. Há ainda, a habituação, na qual o indivíduo, depois de repetidas apresentações a um estímulo, perde a característica de novidade (KANDEL et al., 2014; RESCORLA; HOLLAND, 1982).

A memória é o processo pelo qual esses conhecimentos adquiridos são codificados, armazenados e posteriormente evocados, quando necessários (KANDEL et al., 2014; TULVIN, 1987). Existem diferentes tipos de memória e elas podem ser classificadas de diferentes maneiras: segundo a idade de aquisição, em memórias recentes ou remotas; segundo o curso temporal do armazenamento, em memórias de curto ou longo prazo e; segundo a natureza da informação armazenada, em memórias explícitas (declarativas) ou implícitas (não-declarativas) (FRANK; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2006; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008; KANDEL et al., 2014).

A memória denominada recente refere-se às memórias que foram adquiridas há pouco tempo, em até poucos dias; a memória remota refere-se a memórias que foram adquiridas há um período de tempo maior, o que inclui muitos dias, meses e até anos (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). Memórias recém-adquiridas são mais sensíveis a perda e podem ser gradualmente transformadas até um estado mais permanente no qual são menos resistentes à perda (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005).

A memória de curto prazo são as memórias que duram de segundos a minutos enquanto que a memória de longo prazo tem duração de meses, anos e até uma vida inteira (KANDEL et al., 2014; GUYTON; HALL, 2011). A memória de curto prazo caracteriza-se por ser breve e ter a função de retenção e processamento da informação (KANDEL et al., 2014). Um tipo específico de memória de curto-prazo é a memória de trabalho que está relacionada com o planejamento e realização de ações rápidas

(COWAN, 2009). O armazenamento da memória de curto prazo tornando-a de longo prazo envolve o hipocampo e outras regiões do lobo temporal medial. Lesões nessa região prejudicam a sua formação (KANDEL et al., 2014).

As memórias explícitas e implícitas são um tipo específico de memórias de longo-prazo (KANDEL et al., 2014). As memórias explícitas e implícitas se diferenciam pelo fato de envolverem ou não a consciência para sua evocação, respectivamente (KANDEL et al., 2014). Essa classificação, quanto a natureza da informação armazenada, é imprecisa quando se trata de outros animais, no entanto, de uma maneira geral, as memórias explícitas e implícitas e os processos que ocorrem para sua formação são semelhantes em todos os mamíferos e estão sujeitas a circuitos neurais homólogos (PURVES et al., 2008).

A memória implícita relaciona-se a memória processual, que envolvem habilidades e associações a um nível não disponível conscientemente. Ela ocorre, por exemplo, durante o desenvolvimento de uma tarefa de maneira automática, como no aprendizado associativo e não associativo (PURVES et al., 2008; KANDEL et al., 2014). Por outro lado, a memória explícita é disponível conscientemente, pode ser declarada e é maleável com associações de fragmentos de informações sob diferentes situações. Ela apresenta-se na forma de memória semântica (fatos) e episódica (eventos) (PURVES et al., 2008; KANDEL et al., 2014).

É pertinente destacar ainda um tipo específico de memória episódica: a memória de reconhecimento (MORENO-CASTILLA; GUZMAN-RAMOS; BERMUDESRATTONI, 2018). A memória de reconhecimento refere-se à capacidade de se recordar de algo (BROWN; AGLLETON, 2001) e está relacionada com a capacidade de identificar e julgar algo com o que foi visto/apresentado anteriormente (MANDLER, 1980).

Outro tipo de memória relacionada a memória explícita, que é válido ressaltar é a memória espacial (BAILEY, 2008). Ela é fundamental para a vida dos animais, uma vez que é imprescindível para reencontrar lugares, encontrar alimentos e ambiente seguro e para a locomoção, pois proporciona a capacidade de manter um senso de direção e localização enquanto os animais se deslocam em seu ambiente natural (GRECH et al., 2018; WOLBERS; HEGARTY, 2010).

O deslocamento pelo ambiente envolve duas dimensões: o espaço-corporal, que envolve a localização dos membros e tronco; e o espaço do ambiente externo ao indivíduo. A partir dessas dimensões, existem duas estratégias de navegação/locomoção

espacial: a estratégia aloccêntrica e a egocêntrica (BURGESS, 2006; RAINS, 2004). Na estratégia egocêntrica o animal baseia-se na percepção do meio com base em referências centradas no seu próprio corpo e posição (WAGA, 2008). Por outro lado, na estratégia aloccêntrica o animal baseia-se em informações do ambiente, independentemente da sua própria posição corporal (O'KEEFE; NADEL, 1978; WIENER et al., 2011). Em aves e mamíferos, o hipocampo (HPC) está relacionado com o processamento de memórias espaciais aloccêntricas (BROGLIO et al., 2015; SALAS et al., 2006).

Animais que utilizam a estratégia egocêntrica exibem um aprendizado da “resposta” e são denominados *response learners* enquanto que os que utilizam a aloccêntrica exibem um aprendizado do “lugar” sendo denominados *place learners*. Estudos indicam que as regiões cerebrais necessárias no processamento da aprendizagem de lugar e da resposta são o HPC e o estriado, respectivamente (COLOMBO et al., 2003; COMPTON, 2004). Compton (2004) observou que animais lesionados no estriado ou no HPC apresentavam prejuízos na aprendizagem por local ou resposta. Colombo e colaboradores (2003) associaram essas regiões cerebrais com esses tipos de aprendizagem por meio da presença de fosforilação e/ou expressão de proteínas no HPC e estriado. Além disso, o estriado e o HPC são regiões consideradas necessárias para o processamento da memória implícita e explícita, respectivamente (COMPTON et al., 2004).

A formação de memórias depende da capacidade do sistema nervoso modificar-se de alguma forma frente a um estímulo. Apesar de Frankland e Bontempi (2005) pontuarem que o HPC tem um papel limitado no armazenamento e recuperação de algumas memórias, como por exemplo, as memórias remotas, eles também enfatizam a importância do HPC na aquisição das memórias. De fato, atualmente, é bem estabelecido que o HPC seja essencial para aprendizagem e formação de memórias (SWEATT, 2004; VANGUILDER; FREEMAN, 2011), especialmente a episódica (SHINOHARA et al., 2012), incluindo a de reconhecimento (BROADBENT; SQUIRE; CLARK, 2004).

Nos roedores o HPC é uma estrutura cerebral muito estudada, e por muito tempo os HPCs direito e esquerdo foram considerados funcionalmente equivalentes (SHIPTON et al, 2014). Entretanto, alguns estudos vêm demonstrando que existem diferenças tanto ao longo das sub-regiões do HPC quanto entre os HPCs direito e esquerdo (DIAMOND et al., 1983; KAWAKAMI et al., 2003). Diamond e colaboradores (1983) mostraram que o córtex e o HPC do hemisfério direito são mais espessos do que os do esquerdo em animais machos. Kawakami e colaboradores (2003) mostraram que assimetrias

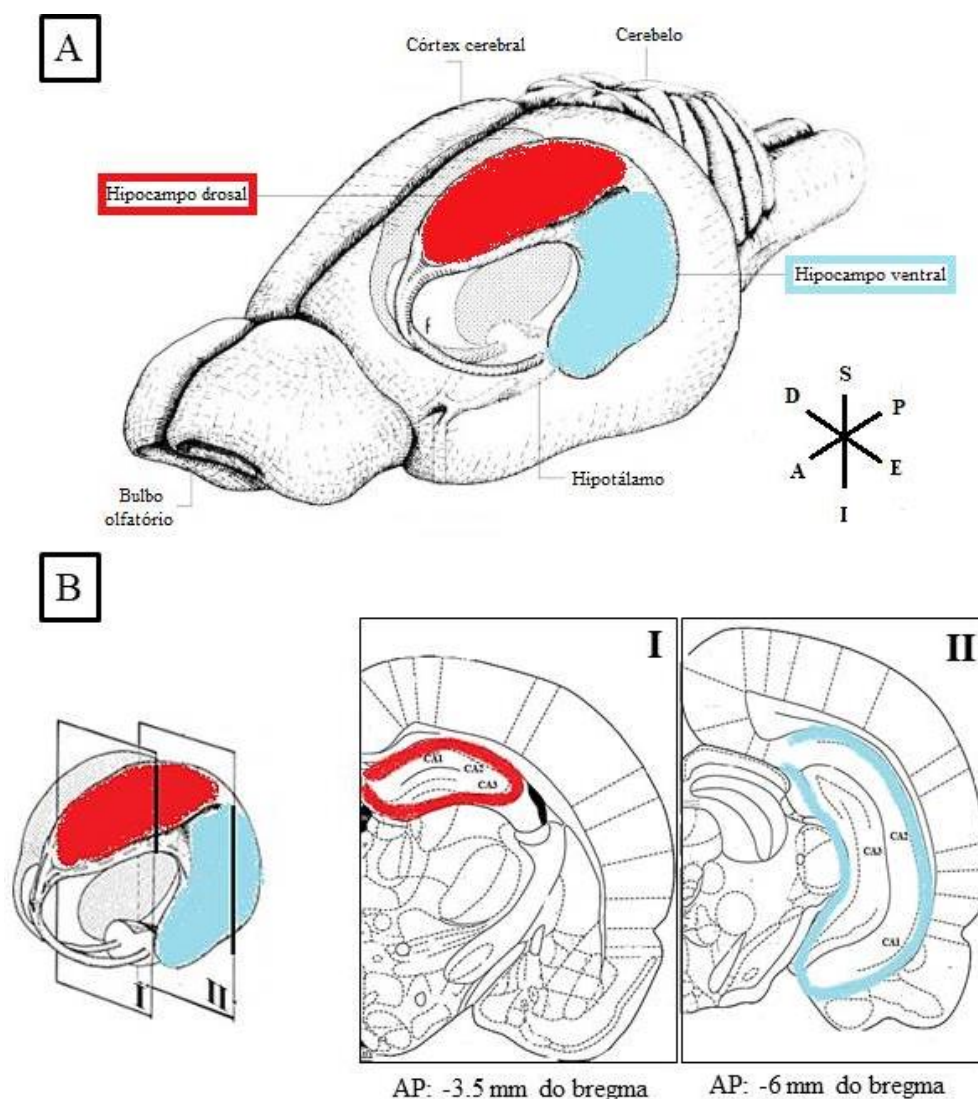
funcionais estão relacionadas com diferenças nas bases moleculares dos hemisférios, como distribuição de sinapses excitatórias (receptores NMDA) distinta entre os hemisférios direito e esquerdo. Os autores observaram que o HPC esquerdo possui uma maior distribuição de receptores NMDA do que o HPC direito (KAWAKAMI et al., 2003).

Uma análise da organização ao longo dos eixos longitudinal e transversal do HPC de roedores pode conferir uma maior compreensão das estruturas que o compõem. O eixo longitudinal refere-se ao eixo dorsal-ventral que corresponde ao eixo pósterio-anterior em primatas (DERDIKMAN; KNIERIM, 2014). Fanselow e Dong (2010) pontuam que existem diferenças de expressão gênica e distinções anatômicas ao longo desse eixo. Dessa maneira, é possível dividi-lo em duas principais porções, a ventral (HPCv) e a dorsal (HPCd) (FANSELOW; DONG, 2010; DERDIKMAN; KNIERIM, 2014) (Figura 1A). Assim sendo, cada vez mais surgem estudos que apontam diferentes especializações das redes neuronais dessas regiões (ROSSATO et al., 2006; FANSELOW; DONG, 2010; SHIPTON et al., 2014; CEMBROWSKI et al., 2016; HALES et al., 2015; KOUVAROS; PAPATHEDOROPOULOS, 2017; RIAZ et al., 2017).

Kouvaros e Papathedoropoulos (2017) observaram diferenças entre o HPCv e HPCd em relação a atividade basal de seus neurônios (*sharp wave-ripples*). Eles observaram que na região ventral os picos de atividade neuronal foram mais intensos e mais frequentes comparados aos da região dorsal em uma análise *in vitro*, o que poderia contribuir de diferentes formas para a diversificação das informações recebidas e processadas por essas duas porções (KOUVAROS; PAPATHEDOROPOULOS, 2017). Riaz e colaboradores (2017) evidenciaram diferenças entre o HPCd e HPCv no processamento de memória contextual baseada em tarefas motivadas por apetite, demonstrando maior relação com o HPCv. Já Fanselow e Dong (2010) apontam que o HPCd é responsável pelas funções cognitivas envolvidas nas memórias declarativas e espacial, enquanto o HPCv está intimamente relacionado a memórias emocionais, regulando respostas ao estresse e cuja disfunção leva a distúrbios afetivos, como a depressão. Bem como há trabalhos que demonstram que o HPCd está envolvido na reconsolidação da memória espacial (ROSSATO et al., 2006) e que existe lateralização funcional do HPC de camundongos em tarefas de memorização espacial (SHIPTON et al., 2014).

Por outro lado, a análise do eixo transversal do HPC revela o circuito clássico da alça do giro dentado (GD), o HPC propriamente dito, também conhecido como Corno de Amon (CA) (DERDIKMAN; KNIERIM, 2014; CHOI; WON, 2011; WITTER; AMARAL, 2004) além do subículo (WITTER; AMARAL, 2004). Segundo Witter e Amaral (2004) essas três regiões citoarquitetônicas distintas constituem a formação do HPC e possuem uma conectividade amplamente unidirecional (WITTER; AMARAL, 2004). Além disso, o HPC propriamente dito é subdividido em três campos: a CA1, CA2 e CA3 (CHOI; WON, 2011; WITTER; AMARAL, 2004) (Figura 1B).

Figura 1. Posição e estruturas do hipocampo de roedores. **(A)** Representação esquemática da localização do hipocampo no encéfalo de roedores evidenciando em vermelho e azul a divisão ao longo do hipocampo nas porções dorsal e ventral, respectivamente. **(B)** Secção coronal mais anterior e mais posterior do encéfalo demonstrando esquematicamente a região do hipocampo dorsal e do ventral com a localização das sub-regiões do Corno de Amon. CA1, CA2 e CA3: campos 1 a 3 do Corno de Amon; S: superior; I: inferior; A: anterior; P: posterior; D: direito; E: esquerdo.



Fonte: adaptado de Cheung e Cardinal (2005) e do livro “The rat brain” de Paxinos e Watson (2006).

Anatomicamente, a diferença entre as três sub-regiões está relacionada ao tamanho dos neurônios. Enquanto a CA2 e CA3 possuem células piramidais maiores, a CA1 possui essas células menores e, além disso, há uma diferença de conexões, enquanto a CA3 recebe conexões neuronais do GD, a CA1 não recebe (WITTER; AMARAL, 2004). O limite entre essas três subdivisões envolve, sobretudo, uma extensa observação da organização laminar, células piramidais e as conexões existentes para cada campo (WITTER; AMARAL, 2004). Além disso, Lorente de Nó (1934) após observar com maior precisão as células piramidais das três sub-regiões, subdividiu a CA1 e CA3 em três outras subáreas cada (CA3a, CA3b, CA3c; CA1a, CA1b, CA1c). de acordo com diferenças na organização dendrítica dessas células.

Quanto ao papel funcional dessas três sub-regiões do HPC propriamente dito, existem muitas controvérsias (NORMAN, 2010; CHOI; WON, 2011). Alguns trabalhos evidenciam que a CA1 parece estar envolvida com a associação de padrões temporais e intermediar os processos de memória, enquanto a CA3 modula processos de associação de padrões espaciais e está relacionado com a memória de curto prazo (SWEATT, 2004; LANGSTON et al., 2010, NORMAN, 2010; SHIPTON et al., 2014). Shipton e colaboradores (2014) por sua vez, demonstraram, em camundongos, que uma lesão da CA3 do HPC esquerdo prejudicou o animal em uma tarefa espacial de memória de longo prazo, enquanto que o silenciamento da mesma região no hemisfério direito não apresentou nenhum efeito. Já a região CA2, é a sub-região de maior controvérsia em relação à disposição, conexão e funcionalidade de seus neurônios constituintes (WITTER; AMARAL, 2004). Sekino e colaboradores (1997) afirmam que essa é uma região de ligação e proporciona uma entrada para os neurônios da região CA3 se projetarem para a CA1. Entretanto, apesar de ser uma sub-região estreita, ela pode apresentar diferenças de conexão e funcionalidade como as outras (WITTER; AMARAL, 2004; DERDKMAN; KNIERIM, 2004). De fato alguns estudos já demonstram que essa sub-região não é só uma simples zona de transição entre a CA1 e CA3 (CUI; GERFEN; YOUNG, 2013) e vem sendo relacionada a memória social (HITTI; SIEGELBAUM, 2014; DOMINGUEZ et al., 2019; TZAKIS; HOLAHAN, 2019).

Em resumo, as três sub-regiões são relacionadas a diferentes tipos de processamento de memória. Alguns autores evidenciam que funções cognitivas superiores, como a atenção e memória, podem ter processamento assimétrico entre os hemisférios cerebrais (HABIB; NYBERT; TULVING, 2003; DEMAREE et al., 2005). De fato o encéfalo humano apresenta pequenas assimetrias anatômicas em relação aos

hemisférios direito e esquerdo, além de lateralização funcional (GAZZANIGA; BOGEN; SPERRY, 1965; ILLINGWORTH; BISHOP, 2009). Essas assimetrias estruturais e funcionais vêm sendo estudadas desde o século XIX quando Broca (1861) expôs a assimetria encefálica para produção da fala (BARRICK et al., 2007). Desde então, uma série de estudos foram realizados com lesões encefálicas e mais recentemente com neuroimagem, os quais identificam especificidades de regiões em relação a determinadas funções (KAPLAN et al., 1994; IGLÓI et al., 2010; HOU et al., 2013).

A lateralização encefálica funcional pode garantir que não tenha conflito, duplicação de resposta e/ou processamento paralelo de informações por recrutamento de duas áreas cerebrais frente a um estímulo (RODGERS, 2002) e por isso, pode conferir certas vantagens. Algum tempo atrás a lateralização funcional encefálica era associada apenas a distinção cognitiva, ou seja, relacionada a seres humanos (FRASNELLI, 2013). Entretanto, essas assimetrias anatômicas e lateralização funcional também já foram descritas para o sistema nervoso de roedores, como já mencionado acima (DIAMOND et al., 1983; KAWAKAMI et al., 2003; SHIPTON et al., 2014) e, em outros animais (MCGREW; MARCHANT, 1999; GÜNTÜRKÜN et al., 2000; PASCUAL et al., 2004; RODGERS; ZUCCA; VALLORTIGARA, 2004). Em exemplo, Rodgers e colaboradores (2004) observaram que galinhas com lateralização conseguiam executar procura de alimentos e vigilância contra predadores simultaneamente. Já Pascual e colaboradores (2004), viram lateralização funcional em drosófilas, indivíduos ainda mais basais na escala evolutiva. Eles observaram que moscas com assimetrias encefálicas acabavam por apresentar sucesso no processamento de formação de memórias (PASCUAL et al., 2004).

Essas assimetrias entre os hemisférios esquerdo e direito provavelmente evoluíram para o uso de sistemas nervosos bilaterais. Embora muitos dos estudos de lateralização funcional relacionada a tarefas cognitivas superiores tenham identificado assimetrias estruturais e funcionais relacionadas ao HPC (SHIPTON et al., 2014; WOOLARD; HECKERS, 2012; HOU et al., 2013), o conhecimento acerca das divergências dos mecanismos sinápticos entre estruturas equivalentes ainda é pouco elucidado (SHIPTON et al., 2014).

Uma das formas de elucidar a funcionalidade de alguma região encefálica em algum processo, como a memória, é a indução de lesões neuronais permanentes. Neste sentido, o ácido ibotênico é um fármaco de ação neurotóxica que promove lesões neuronais permanentes e que vem sendo amplamente utilizado (HANSEN et al., 1982;

ANNETT; MCGREGOR; ROBBINS, 1989; JARRARD, 1989; BALLEINE; KILLCROSS, 1994; PIERCE et al., 1998).

Com isso, também considerando a complexidade de conexões envolvendo todas as regiões e subdivisões do HPC, é notável que para um conhecimento mais amplo do processamento de informações pelo HPC uma descrição mais detalhada da funcionalidade que envolva suas estruturas equivalentes, regiões constituintes e conexões é necessária. Além disso, o HPC é uma estrutura vulnerável e afetada por fatores externos e internos do envelhecimento natural, doenças neurodegenerativas e acidentes vasculares cerebrais (CHOI; WON, 2011). Sendo assim, a indução de uma lesão neuronal permanente pode fornecer o conhecimento acerca da assimetria cerebral do HPC, ajudando a elucidar questões de compartimentalização de funções cerebrais, fornecendo maiores detalhes sobre as bases neurais da neurofisiologia da memória episódica bem como ampliado o conhecimento de doenças relacionadas a essa estrutura encefálica.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a função da região CA3 do hipocampo dorsal sobre a memória de reconhecimento, sobre o processo de consolidação de memórias espaciais recentes e remotas e sobre a estratégia de locomoção espacial adotada (alocêntrica ou egocêntrica) por ratos Wistar.
- Investigar a existência de lateralização funcional do hipocampo dorsal nos processos que envolvem a memória de reconhecimento, consolidação de memórias espaciais recentes e remotas e estratégia de navegação espacial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 37 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos adultos com 8 semanas de idade. Ao todo, 78 animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos. Contudo, devido a complicações que ocorreram durante e após os procedimentos e aos critérios exigidos para os testes experimentais, alguns animais foram retirados da amostragem final.

Eles foram adquiridos do Biotério Central – UNESP *campus* Botucatu, SP. Os ratos foram acomodados em mini isoladores de rack ventilado (Alesco®) em grupos com

4 animais e mantidos a 22 ± 2 °C em ciclo claro-escuro invertido de 12:12 horas (com luzes acesas às 19:30 e apagadas às 7:30).

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados do Departamento de Zoologia e Botânica da Universidade Estadual Paulista, *câmpus* de São José do Rio Preto. Os procedimentos foram realizados visando a diminuição do sofrimento dos animais e foram submetidos à Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP protocolo nº184/2018.

3.2. Procedimentos experimentais

Considerando os objetivos do presente estudo, os animais foram submetidos inicialmente a procedimentos cirúrgicos a fim de lesionar a área de interesse e em seguida, a uma série de testes comportamentais.

3.2.1. Grupos experimentais

Durante os procedimentos cirúrgicos os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

Grupo GVe (veículo, n=8): trata-se do grupo de controle cirúrgico. Ele é composto por animais que passaram pelos procedimentos cirúrgicos com injeção de tampão fosfato-salina (PBS, 0,5µl/por injeção) na região CA3 do HPCd direito e esquerdo (bilateral).

Grupo HPCd-D (n=9): composto por animais que passaram pelos procedimentos cirúrgicos para indução de lesão permanente com uma injeção de ácido ibotênico (IBO – 5µg/ 0,5µl) na região CA3 do HPCd direito.

Grupo HPCd-E (n=10): composto por animais que passaram pelos procedimentos cirúrgicos para indução de lesão permanente com uma injeção de ácido ibotênico (IBO – 5µg/ 0,5µl) na região CA3 do HPCd esquerdo.

Grupo HPCd-BI (n=10): composto por animais que passarão pelos procedimentos cirúrgicos para indução de lesão permanente com injeções bilaterais de IBO (5µg/ 0,5µl) na região CA3 do HPCd direito e esquerdo.

3.2.2. Procedimentos cirúrgicos

Após a aquisição os animais passaram por um período de aclimação até atingirem o peso ideal, entre 250 e 350 gramas, para o início dos procedimentos cirúrgicos. Os animais passaram então por uma cirurgia estereotáxica com micro injeção

bilateral de solução tampão fosfato-salina ou solução com lesionador para a indução de uma lesão excitotóxica direita, esquerda ou bilateral na região CA3 do HPCd. A lesão neuronal do tipo excitotóxica realizada em cirurgia estereotóxica é um método muito confiável para atingir apenas a região de interesse, sem danificar outras células e estruturas encefálicas (KIRBY et al., 2012). Para a localização exata da região, seguiram-se as coordenadas do atlas “*The rat brain*” (PAXINOS; WATSON, 1986, 2006).

Fármacos

O protocolo anestésico e as doses utilizadas foram adaptados do protocolo proposto por Kirby e colaboradores (2012). As drogas utilizadas foram: morfina (4,5 mg/Kg via injeção subcutânea, analgésico); tiopental (50 mg/Kg via injeção intraperitoneal, anestésico) dissolvido em salina; atropina (0,4 mg/Kg, via injeção subcutânea); meloxicam (0,2 mg/kg, por injeção subcutânea, anestésico pré e pós-operatório; e pentabiótico (56,7 mg/Kg, via injeção intramuscular, antibiótico).

Para as microinjeções encefálicas para indução de lesão foi utilizado ácido ibotênio (IBO, Sigma-Aldrich) diluído em tampão fosfato-salina (PBS) (concentração de 1µg/0,1µL) na quantidade injetada de 5µg/0,5µL. Para as microinjeções encefálicas dos animais controle foi utilizado o veículo do lesionador, o tampão fosfato-salina (PBS) a qual a quantidade injetada foi de 0,5µL.

É válido ressaltar que o protocolo anestésico adotado levou em consideração a necessidade de não interferir com o efeito desejado do IBO. O IBO é um aminoácido excitatório, isolado a partir do cogumelo *Amantia muscaria* que atua como um potente agonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos (receptores NMDA e metabotrópicos). Atua como neurotóxico devido a indução de abertura de canais de Ca^{2+} em excesso, promovendo grande influxo de cálcio nos neurônios causando toxicidade e morte neuronal (SCHWARCZ et al., 1979; HERMIT et al., 2004). Dessa forma, uma vez que a lesão envolve receptores NMDA, utilizar-se de anestésicos habituais, como a cetamina, que é antagonista dos receptores NMDA, poderia interferir nas lesões excitotóxicas (KIRBY et al., 2012).

Cirurgia e microinjeção encefálica

Para a indução de analgesia e anestesia durante os procedimentos cirúrgicos os animais receberam uma injeção subcutânea de morfina e uma injeção intraperitoneal de tiopental, respectivamente. A morfina é um opióide comumente utilizado para indução de analgesia em ratos e camundongos sendo considerado um analgésico potente em

comparação a outros opióides (GADES et al., 2000). O tiopental é um barbitúrico de duração rápida, mas que proporciona um período anestésico hábil para a realização dos procedimentos cirúrgicos comumente adotados. Ele produz decréscimo da pressão arterial e de débito cardíaco (KERGER et al., 1997) e uma redução na frequência respiratória (SVENDEN; CARTER, 1985).

Dessa maneira, devido aos efeitos ocasionados pelo tiopental, antes da administração dessa droga foi aplicada atropina para prevenir a depressão respiratória, e também porque é efetiva na elevação da frequência cardíaca e pressão arterial (THOMAS; WOODGATE, 1966). Além disso, como analgésico adicional, antes da morfina e do tiopental também foi administrado meloxicam.

Após a verificação da analgesia, avaliada pelos reflexos da cauda e membros, os animais foram posicionados em um estereotáxico digital de torre dupla (Scienlabor®).

Depois da remoção do pelo foi realizada uma incisão ao longo da linha média do crânio e os sítios de injeção foram expostos por meio de desgaste ósseo com um micromotor. Para encontrar a localização dos sítios de injeção seguiram-se as coordenadas estereotáxicas do atlas “*The rat brain*” (PAXINOS; WATSON, 1986, 2006), assim para a injeção bilateral ou unilateral na região CA3 do HPCd foram utilizadas as coordenadas AP = - 3,5 mm, a partir do bregma, ML = $\pm$ 3,5 mm a partir da linha média e DV = - 3,8 mm a partir da superfície do crânio. Após a localização dos sítios de injeção, os animais dos grupos com inativação uni ou bilateral do HPCd receberam uma injeção única de IBO diluído em PBS (Sigma Aldrich, 5 μ g/0,5 μ L) e os animais do grupo GVe receberam uma única injeção de PBS (Sigma Aldrich, 0,5 μ L) em ambos HPCd por meio de uma seringa de Hamilton de 1 μ L acoplada a uma cânula. A taxa de infusão foi de 0,5 μ L/min (Bomba de infusão - Insight®) sendo que a agulha permaneceu no sítio por 4 minutos para garantir a infusão da droga. Após as injeções as perfurações no crânio foram cobertas por acrílico dental (Vipiflash – VIPI Indústria®) e a incisão na pele suturada.

Com o fim dos procedimentos cirúrgicos, foi administrada, em dose única, uma injeção intramuscular de pentabiótico e a cada 24 horas, duas vezes, foi administrada uma injeção subcutânea de meloxicam para promover analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em suas gaiolas com alimentação e hidratação *ad libitum* e passaram por um período de recuperação de 14 dias. Após esse período, os mesmos foram submetidos aos testes comportamentais.

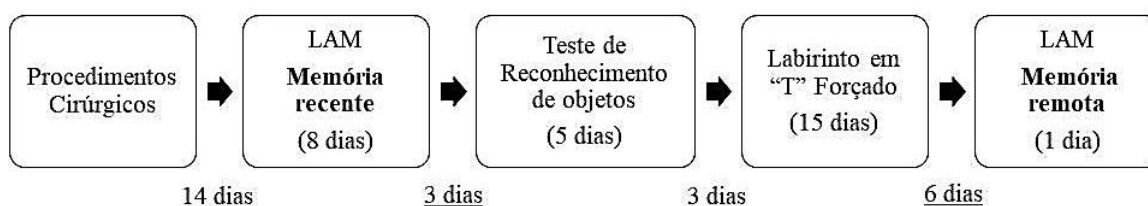
3.2.3. Testes comportamentais

Após 14 dias de recuperação pós-cirúrgica, todos os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: labirinto aquático de Morris (LAM), teste de reconhecimento de objetos e labirinto em T forçado. Os experimentos foram realizados no período da manhã, por volta das 09:00 horas e, no caso de testes com mais de uma exposição por dia, seguia as recomendações de intervalo propostas nos trabalhos utilizados como base.

A fim de avaliar a memória adquirida recente e remotamente foi necessário admitir um intervalo de tempo adequado na execução dos testes comportamentais. Dessa forma, o tempo adotado para a realização de todo o protocolo comportamental foi de 4 semanas e os animais passaram por uma sequência fixa dos testes comportamentais (Figura 2). Antes de serem expostos em qualquer um dos aparatos utilizados nos testes comportamentais, os animais passaram por um período de cinco dias de habituação à manipulação do experimentador.

Inicialmente os animais passaram por uma primeira exposição ao protocolo experimental do LAM para avaliação da memória espacial recente (8 dias de duração). Finalizado o LAM, após 3 dias os mesmos indivíduos passaram pelo teste de reconhecimento de objetos (5 dias de duração). Após 3 dias do teste de reconhecimento de objetos os animais passaram pelo labirinto em T forçado (15 dias de duração). Por fim, os animais passaram por uma segunda exposição ao LAM (1 dia de duração) após 30 dias da primeira exposição e 6 dias do fim do labirinto em T, para avaliação da memória espacial remota. A realização dos testes de reconhecimento de objetos e labirinto em T entre a primeira e segunda exposição ao LAM foi adotada para um melhor aproveitamento do intervalo de tempo entre os testes no LAM. Ao final do protocolo experimental os animais foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos removidos para a confirmação dos sítios de injeção.

Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental demonstrando todos os experimentos em que os animais experimentais foram submetidos.



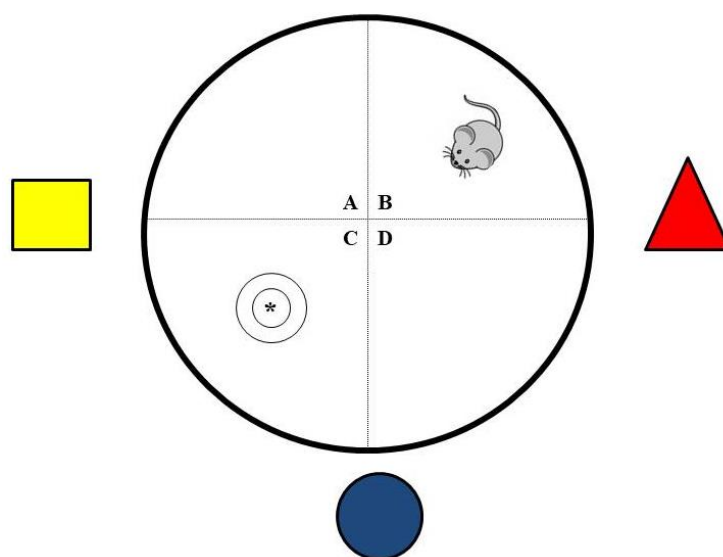
Fonte: Elaborado pelo Autor.

3.2.3.1. Labirinto aquático de Morris (LAM)

O labirinto aquático de Morris (LAM) (MORRIS, 1984) é um teste amplamente utilizado na literatura. Este paradigma experimental é usado para acessar a memória espacial e foi empregado para avaliar a consolidação da memória espacial recente e remota.

O aparato consiste em uma piscina de metal (170 cm de diâmetro e 58 cm de altura) preenchida com água (25°C, 40 cm de profundidade) e leite em pó com o intuito de conferir turbidez ao líquido e dificultar a visualização de uma plataforma de escape removível submersa. Dessa forma, os animais devem encontrar a plataforma, orientando-se espacialmente com ajuda de pistas externas a piscina (MORRIS, 1984), que para o presente estudo foram as formas de um quadrado, um triângulo e um círculo dispostos nas paredes. A piscina foi dividida em 4 quadrantes (A, B, C e D) por duas linhas imaginárias que cruzam o centro e a plataforma de escape foi posicionada no centro de um dos quadrantes (Figura 3).

Figura 3. Representação do labirinto aquático de Morris. A, B, C e D representam os quatro quadrantes imaginários. * representa a plataforma submersa de escape. Os símbolos quadrado, triângulo e círculo representam as pistas externas.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Este teste foi realizado em oito dias e contou com duas etapas que estão descritas a seguir:

Etapas 1: Treino espacial

Para metade dos animais experimentais a plataforma de escape foi posicionada no quadrante B e para a outra metade no quadrante oposto (C), com o intuito de evitar um

viés experimental e permaneceu nesta posição ao longo de todo treino espacial. Esta etapa ocorreu nos primeiros sete dias experimentais, com 1 sessão por dia composta por 5 tentativas por animal.

Para cada tentativa os animais foram gentilmente posicionados na água encarando a parede da piscina a partir de um dos quadrantes onde a plataforma de escape não estava localizada. A sequência de liberação dos animais ao longo das tentativas foi variável, mas idêntica para todos os animais dentro da mesma sessão. Dessa forma, assim que os animais eram liberados no aparato o tempo necessário para encontrar a plataforma invisível (latência de escape) foi registrado por meio de um cronômetro. Se a plataforma não fosse localizada em 60 segundos, os animais eram retirados da água e posicionados em cima da plataforma. Independentemente de o animal localizar a plataforma sozinho ou ser posicionado sobre ela permaneceu sobre a mesma durante 15 segundos. Entre os treinos sucessivos de um mesmo animal, ele foi retirado da plataforma/piscina e permaneceu em uma caixa de plástico durante 30 segundos até iniciar a sua próxima tentativa. Durante esse intervalo de 30 segundos o experimentador retirou os bolos fecais do tanque. Após a última tentativa de cada sessão, cada animal foi seco com uma toalha e recolocado em sua caixa moradia.

Etapa 2: Teste

No 8º dia experimental a plataforma submersa foi removida da piscina e cada animal foi solto no quadrante oposto ao que continha a plataforma invisível em seu último treino. Foi permitido que o animal nadasse por 60 segundos e então o tempo gasto nadando sobre o quadrante que continha a plataforma durante os treinos (tempo de retenção) foi registrado.

Este protocolo experimental foi realizado após os 14 dias de recuperação pós-operatória dos animais no qual foi avaliado a memória recente. Após 4 semanas (30 dias) da finalização da etapa de teste, os animais passaram por um segundo teste para avaliação da memória remota.

3.2.3.2. Teste de reconhecimento de objetos (TRO)

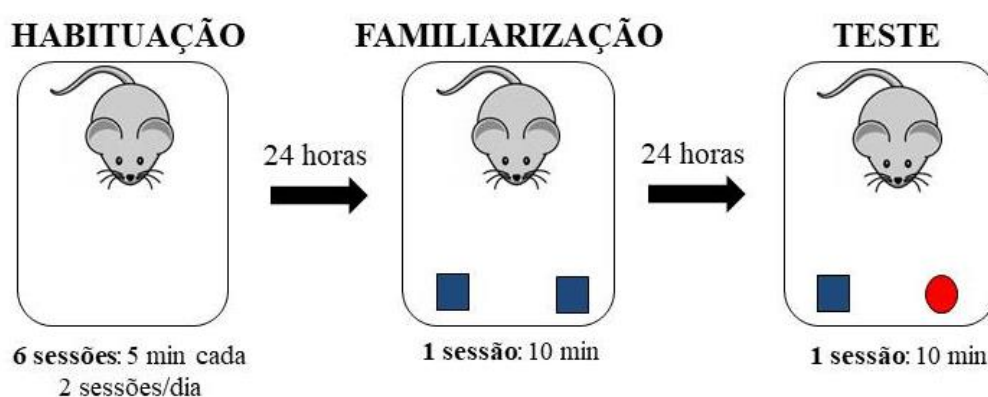
O teste de reconhecimento de objetos (TRO) foi realizado no aparato de teste de campo aberto. Inicialmente o teste do campo aberto foi descrito para pesquisa em relação à emocionalidade em ratos (HALL, 1934), mas, atualmente já existem várias versões do teste, como por exemplo, a utilizada neste teste de reconhecimento, que consiste em

colocar objetos dentro do aparato para os animais explorarem (PRUT; BELZUNG, 2003). Além disso, comportamentos exploratórios como a frequência de entrada nos quadrantes, frequência de levantamento e o tempo realizando comportamento de auto limpeza (*grooming*), são comumente analisados neste aparato (PRUT; BELZUNG, 2003). Dessa forma, durante esse teste além de ser avaliada a memória de reconhecimento, também foram avaliados os comportamentos exploratórios dos animais com o intuito de avaliar possíveis prejuízos locomotores decorrentes dos procedimentos cirúrgicos.

Este teste foi baseado e seguiu as sugestões do protocolo publicado na *Nature Protocols* (LEGER et al., 2013). Para a realização deste teste foi utilizada uma caixa quadrada de campo aberto para ratos (60 x 60 x 60 cm – Insight), na qual os animais experimentais foram habituados e expostos a objetos. O teste possui três etapas seguindo a seguinte ordem de exposição do animal ao aparato: habituação, familiarização e teste de reconhecimento. A primeira exposição do animal ao campo aberto (primeira habituação) ocorreu após cerca de 20 dias dos procedimentos cirúrgicos.

Portanto, após seis sessões de habituação os animais foram expostos, individualmente, a dois objetos similares durante a etapa de familiarização. Posteriormente, um dos objetos foi substituído por um novo durante a etapa de teste. Os objetos empregados foram garrafas preenchidas com areia e colunas montadas com peças de lego (LEGER et al., 2013) (Figura 4). As três etapas do protocolo experimental estão descritas a seguir:

Figura 4. Representação do Teste de reconhecimento de objetos. Os símbolos quadrado e círculo representam os objetos utilizados (garrafas de areia e/ou colunas de lego).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Etapa 1: Habituação

Esta etapa teve duração de 3 dias com duas sessões diárias por animal, com intervalo de 6 horas entre elas. Os animais foram posicionados, individualmente, no

campo aberto com a face voltada para a parede do aparato mais próxima do experimentador e foi permitido que explorassem o aparato por 5 minutos. Encerrada a sessão, o animal retornava para sua caixa moradia e o aparato era limpo com álcool 70%.

Durante essa etapa, foram quantificados os comportamentos exploratórios dos animais a fim de avaliar possíveis prejuízos locomotores decorrentes dos procedimentos cirúrgicos. Dessa forma, todas as sessões foram gravadas e posteriormente a primeira sessão foi analisada com o Software X-Plo-Rat versão 1.1.0 para quantificar os seguintes comportamentos: i) frequência de entrada nos quadrantes do aparato (locomotoção total); ii) frequência de levantamento (exploração vertical) e; iii) tempo em segundos realizando comportamento de auto limpeza (*grooming*). A entrada em cada quadrante foi considerada quando o animal ultrapassou a linha de divisão e entrou/passou em um quadrante do campo aberto com todas as quatro patas. O levantamento foi considerado quando o animal ficou em posição vertical sobre as duas patas posteriores. O comportamento de auto limpeza foi considerado quando o animal parou e passou constantemente as patas anteriores sobre o focinho, corpo e/ou cauda.

Etapa 2: Familiarização

No 4º dia experimental, após 24 horas da última habituação ao aparato, ocorreu a familiarização. Antes do início do processo, foram posicionados dois objetos idênticos no campo aberto, dispostos 5 cm de distância das paredes. Os animais foram expostos aleatoriamente aos pares de objetos similares, sendo que alguns animais foram familiarizados com as garrafas e outros com os blocos de lego.

Após o posicionamento dos objetos, os indivíduos foram colocados na caixa com sua face voltada para a direção oposta dos objetos, ou seja, encarando a parede da caixa mais próxima do experimentador. Seguindo o protocolo foi permitido que o animal explorasse livremente e para quantificar o tempo total de sessão, ou seja, o tempo no qual o animal explorou cada um dos objetos por 20 segundos, foi iniciado um cronômetro no momento em que o mesmo é posicionado no aparato. Outro cronômetro equipado com 2 canais de registro foi utilizado para quantificar o tempo que o animal explorou cada um dos objetos até atingir o critério de 20 segundos de exploração para cada um. O experimento era finalizado quando ambos os objetos expostos fossem explorados por 20 segundos cada, ou após 10 minutos de sessão (o que ocorresse primeiro). Considerou-se exploração, quando o indivíduo dirigiu seu focinho/nariz para o objeto a uma distância máxima de 2 cm e/ou tocou o objeto enquanto olhava para o mesmo. Após a realização

de uma única exposição aos objetos, o aparato e objetos eram higienizados com álcool 70% para excluir qualquer estímulo por odor ao próximo animal.

Etapa 3: Teste de reconhecimento

Um dia após o término da familiarização, no quinto dia experimental, os animais passaram pelo teste de reconhecimento de objetos. Indivíduos que passaram pela familiarização com as garrafas tiveram uma das garrafas substituídas por um bloco de lego, já os animais familiarizados com os blocos de lego, tiveram um deles substituído por uma garrafa.

Os objetos foram 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 foi o mesmo realizado durante a etapa de familiarização.

3.2.3.3. Labirinto em T forçado

O labirinto em T forçado é um teste muito utilizado para acessar a memória espacial (PAUL; GIORDANO; SANTAMARÍA, 2009; SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010) e também as estratégias de locomoção espacial, aloclétrica ou egocêntrica, que o animal pode utilizar para se locomover. Os procedimentos adotados foram baseados no trabalho de Packard (1999).

O aparato que foi utilizado é um labirinto em cruz aberto que possui quatro braços (norte, sul, leste e oeste) com dimensões de 50 x 9 cm que se encontram a uma altura de 50cm em relação ao chão. Durante os testes um dos braços foi bloqueado resultando em apenas três de seus braços acessíveis aos animais, desse modo o aparato passou a assumir a forma e funcionalidade de um labirinto em “T”. Neste teste o animal deveria localizar-se espacialmente e encontrar a recompensa em um dos braços do labirinto. A recompensa adotada foi um pellet doce, palatável aos animais e previamente apresentado para evitar o estresse da novidade. A localização da recompensa foi padronizada para o braço oeste.

Antes do início dos treinos os animais passaram por um período de sete dias de redução alimentar, para que atinjam o peso equivalente a 85% do que pesavam antes. Esse período foi determinado, pois estima-se que o ajuste no peso dos animais seja atingido neste tempo (PACKARD, 1999). Esse período de redução alimentar é essencial para a motivação pela busca de 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. Além disso, para reforçar ainda mais a tarefa, durante todo o

período de experimentação a redução alimentar foi mantida. O protocolo adotado consistiu em 2 etapas que foram realizadas ao longo de 15 dias de experimentos e estão descritas a seguir:

Etapa 1: Habituação ao aparato

Esta etapa foi realizada nos três primeiros dias do procedimento experimental. O acesso ao braço norte do labirinto em cruz foi bloqueado durante a habituação e os treinos com recompensa alimentar. Foram realizadas duas sessões diárias de habituação ao aparato com intervalo de seis horas entre elas. Em cada sessão foi permitido que os animais explorassem o labirinto por cinco minutos, sem oferta alguma de recompensa no labirinto. Após cada sessão de habituação ao experimentador e ao labirinto, foi dado um pellet do alimento reforçador e o animal foi observado até comer o alimento, para garantir que todos estivessem igualmente habituados à recompensa. O labirinto era higienizado com álcool 70% após cada exposição de animais.

Etapa 2: Treinos e testes

Essa etapa dos procedimentos ocorreu do 4º ao 15º dia experimental. Cada animal passou por cinco treinos diários com recompensa alimentar, totalizando 60 treinos por animal. Todos os treinos foram filmados para posterior análise comportamental. Em cada treino, os animais foram colocados no braço sul e podiam atravessar o labirinto e consumir um único pellet localizado no copo de alimentos no final do braço oeste. Entradas no braço leste do labirinto (com recompensa alimentar inacessível ao animal) foram classificadas como respostas incorretas durante o treinamento dos animais, e as entradas no braço contendo o alimento acessível (oeste) foram classificadas como respostas corretas.

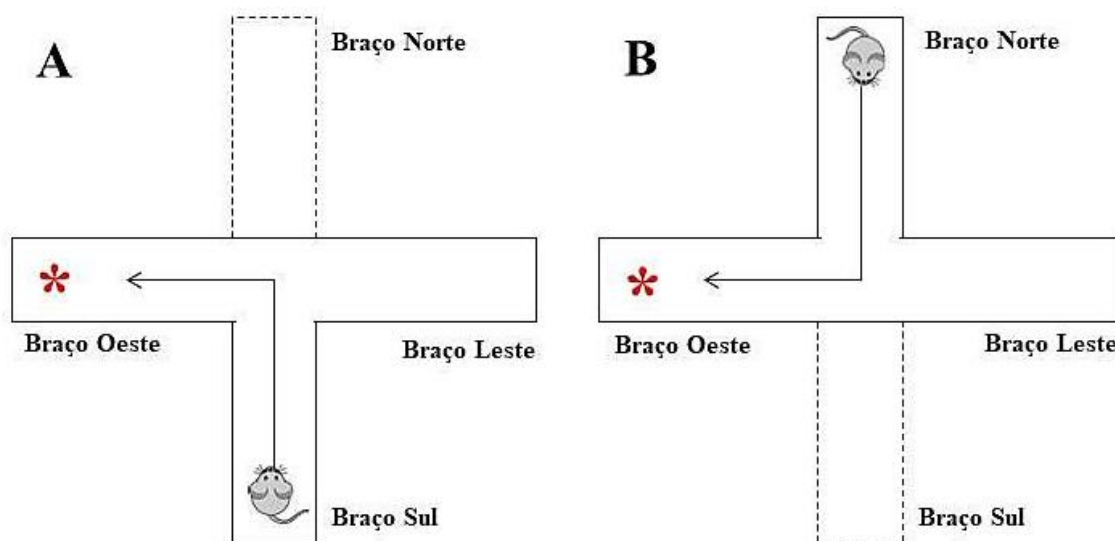
Durante o treinamento também foi adotado um procedimento de correção; os animais que optaram pelo braço “incorreto” do labirinto poderiam explorar o labirinto, seguir de volta para o braço “correto” e consumir o pellet de alimento. Se o animal não consumisse o alimento dentro do intervalo de um minuto, o treino era encerrado. Depois de cada treino os animais eram colocados em uma caixa localizada fora do labirinto, logo atrás do braço de partida (sul) durante um intervalo de 30 segundos, para depois então, dar início a tentativa subsequente.

Além das 60 sessões de treinamento, os animais passaram pelos testes (*probe trials*), os quais foram realizados a cada 5 dias de treinamento e no último dia experimental, ou seja, ocorreram no 8º, 13º e 15º dia experimental. Os testes foram

realizados 30 minutos após o término da última sessão de treino do dia. Durante esses testes (*probes*), a entrada dos animais no labirinto foi alterada. Nos treinos o braço de início era o sul, ao passo que durante os testes, os animais tiveram acesso ao labirinto pelo braço norte enquanto o braço sul ficou inacessível aos mesmos (Figura 5).

Os animais que optaram pelo braço oeste durante os testes, ou seja, ratos que se dirigiram ao braço que continha alimento durante os treinos, foram denominados “*place learners*” (aprendizado por lugar) e utilizam-se da estratégia allocêntrica, já os ratos que optaram pelo braço leste, ou seja, animais que realizam o mesmo movimento corporal que exibiam durante os treinos, foram denominados “*response learners*” (aprendizado por resposta) e utilizam-se da estratégia egocêntrica. Foram calculadas as médias das escolhas denominadas “corretas” para cada grupo durante os treinos e foi feita uma curva de aprendizado ao longo dos treinos, também foi calculada a porcentagem de animais “*place learners*” e “*response learners*” em cada grupo.

Figura 5. Representação do labirinto em “T” forçado. A) Representação da disposição do labirinto durante o treinamento dos animais, no qual o braço norte estava inacessível. B) Representação da disposição do labirinto durante os testes (*probe trials*), nos quais o braço sul estava inacessível.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

3.2.4. Análise histológica

Eutanásia

A fim de analisar os encéfalos e verificar os sítios de injeção, ao final do protocolo experimental, depois de aproximadamente 44 dias dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram eutanasiados com base no protocolo para fixação e remoção dos encéfalos proposto por Gage e colaboradores (2012). Neste protocolo é usada a

fixação dos encéfalos por perfusão sanguínea, conforme indicado para o sistema nervoso central, ao invés de serem colocados diretamente no fixador. O objetivo dessa fixação é a preservação rápida e uniforme de todo o tecido, uma dificuldade enfrentada quando o tecido é colocado diretamente no fixador visto que em tecidos maiores, como o encéfalo, ele não atinge todas as regiões (GAGE; KIPKE; SHAIN, 2012).

Por conseguinte, inicialmente os animais receberam uma injeção intraperitoneal de superdose de tiopental (100 mg/Kg). Após aprofundamento de anestesia, apesar da maioria dos animais estarem eutanasiados, a verificação dos reflexos da cauda e membros bem como a constatação da morte foi realizada. Posteriormente, por meio de uma bomba peristáltica (Bonther®) foi perfundido, a partir do ventrículo esquerdo do animal, cerca de 300 ml de solução salina tamponada e, em seguida de 200 a 500 ml de paraformaldeído 4% para fixação rápida do encéfalo.

Logo depois, o encéfalo de cada animal foi removido e armazenado em paraformaldeído 4% por no mínimo 24 horas para melhor preservação do tecido. Após esse período os encéfalos foram lavados com solução salina tamponada três vezes seguidas e foram mantidos em solução crioprotetora a 20°C até os preparativos para o processamento.

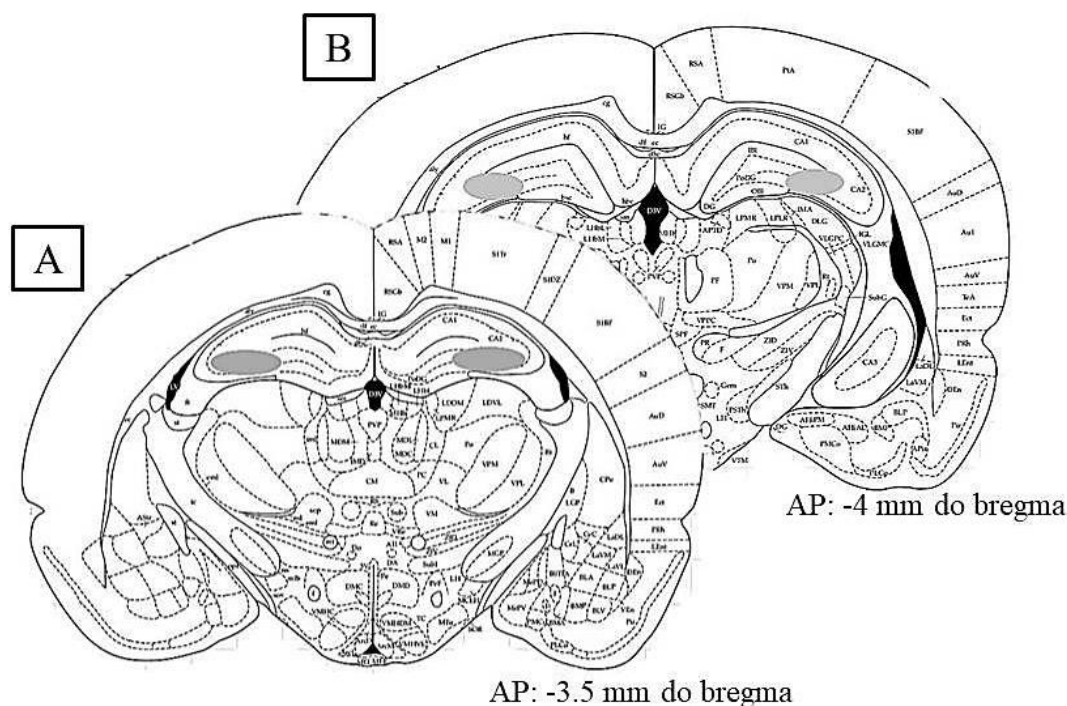
Confecção das lâminas

Cerca de 24 horas antes do processamento dos encéfalos os mesmos foram retirados da solução crioprotetora e armazenados em álcool 70%. Posteriormente eles foram processados, emblocados em parafina e seccionados a uma espessura de 7 µm usando um micrótomo eletrônico automático (Leica Biosystems® RM2245). O protocolo de coloração das lâminas histológicas foi adaptado de Esteves e colaboradores (2004) (Apêndice A). As lâminas foram coradas com violeta cresil e em seguida foram analisadas, fotografadas e escaneadas para confirmação dos sítios de injeção. O violeta cresil é um corante de caráter básico que proporciona uma visão composta do tecido nervoso, uma das estruturas que ele evidencia são os núcleos celulares (OVALLE; NAHIRNEY, 2014).

Os acertos cirúrgicos, seguindo as orientações de Paxinos e Watson (1986, 2006), foram os que apresentaram a lesão na região denominada CA3 do hipocampo dorsal considerando às medidas determinadas inicialmente (AP = -3,5 mm a partir do bregma, ML = ± 3,5 mm a partir da linha média e DV = - 3,8 mm a partir da superfície do crânio). Entretanto, sempre considerando a sub-região CA3, uma pequena variação foi

considerada em relação a medida a partir do bregma (Figura 6). Os animais que apresentaram lesão encefálica em outras regiões foram removidos da amostra experimental.

Figura 6. Representações esquemáticas dos sítios de injeção considerados acertos para os procedimentos cirúrgicos da área CA3 do HPCd direito e esquerdo. As regiões cinza representam a localização da CA3 de ambos os HPCd. **(A)** Sítio de injeção com medida AP= -3,5 mm em relação ao bregma. **(B)** Sítio de injeção com medida AP variável entre -3,5 e -4 mm em relação ao bregma.



Fonte: Adaptado do livro “The rat brain” de Paxinos e Watson (1986).

3.2.5. Análise estatística

Para a realização de todas as análises foi utilizado o software Graphpad Prism 6. Inicialmente, todos os dados passaram por um teste de homogeneidade de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram posteriormente analisados com o teste de análise de variância (ANOVA) ordinária *para um fator*, seguida do pós-teste de Tukey de comparações múltiplas. Os dados não paramétricos foram posteriormente analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. O nível de significância foi aceito quando $p < 0,05$.

Para os dados do LAM: os dados gerais de latência de escape dos treinos e os testes de memória recente e remota (*Probe trials*) foram analisados com ANOVA ordinária *para um fator*, seguida do pós-teste de Tukey; para a construção da curva de aprendizagem a partir da latência de escape dos treinos espaciais foi realizada uma

ANOVA *para dois fatores* (fator 1: tratamento e fator 2: tempo de teste) de medidas repetidas com pós-teste de Tukey.

Para os dados do TRO: os dados adquiridos da primeira habituação ao campo aberto (frequência de entrada nos quadrantes, de levantamento e o tempo realizando *grooming*) bem como do tempo que os animais dos quatro grupos demoraram a atingir o critério (tempo total de teste) e os dados da sessão do teste de reconhecimento, foram analisados com ANOVA ordinária *para um fator*, seguida do pós-teste de Tukey; os dados da sessão de familiarização foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

Para os dados do labirinto em T forçado: os dados gerais dos treinos do labirinto em T forçado foram analisados com ANOVA ordinária *para um fator*, seguida do pós-teste de Tukey; para a construção da curva de aprendizagem a partir da porcentagem de escolhas corretas dos treinos foi realizada uma ANOVA *para dois fatores* (fator 1: tratamento e fator 2: tempo) de medidas repetidas com pós-teste de Tukey; os dados provenientes das três *Probe trials* foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

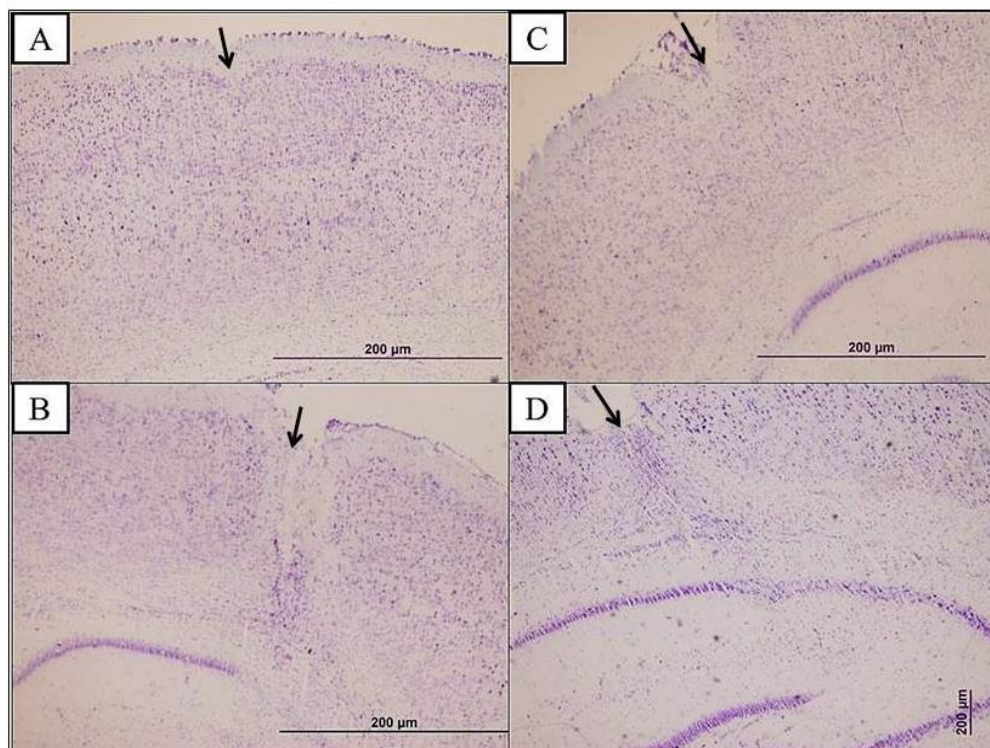
4. RESULTADOS

4.1. Análise histológica

A análise das lâminas de cada animal permitiu a observação e identificação dos sítios de injeção de IBO e PBS para os animais lesionados e os do GVe, respectivamente. Em algumas lâminas de encéfalos de animais que compõem diferentes grupos experimentais foi encontrada evidências de alteração sem indícios de destruição neuronal na região do córtex acima do HPCd que evidenciaria a entrada da agulha de infusão (IBO ou PBS) (Figura 7). A posição e intensidade das marcas observadas nas lâminas variaram devido à região do encéfalo visualizada no corte.

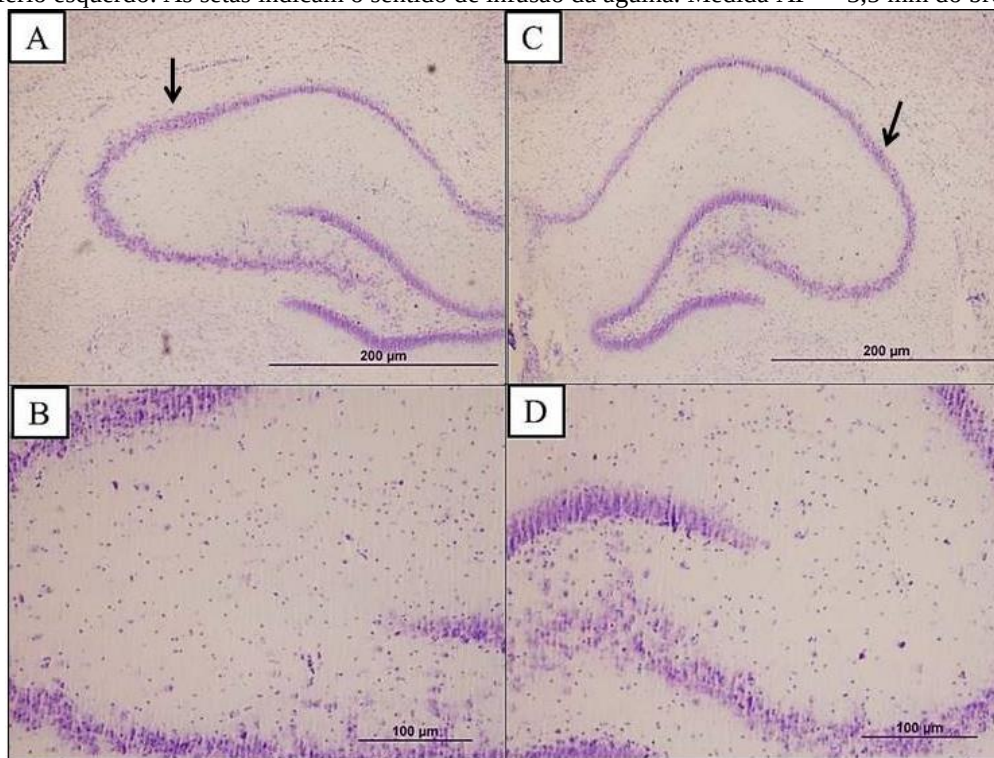
Quando analisadas as lâminas dos animais do grupo GVe, que receberam PBS em ambos os HPCd, foi possível notar a integridade dos neurônios da região CA3 de ambos os HPCd (Figura 8). Mesmo quando as lâminas foram observadas em aumento menor é notória a falta de evidências de qualquer comprometimento neuronal dessas regiões. A Figura 9 evidencia o que foi encontrado nas lâminas de todos os animais do grupo GVe em relação aos sítios de injeção.

Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo que representam o local da entrada da agulha de infusão. **(A)** Grupo GVe **(B)** Grupo HPCd-BI. **(C e D)** Grupo HPCd-E. As setas indicam o local da entrada da agulha. Medida AP $\approx$ -3,5 mm do bregma.



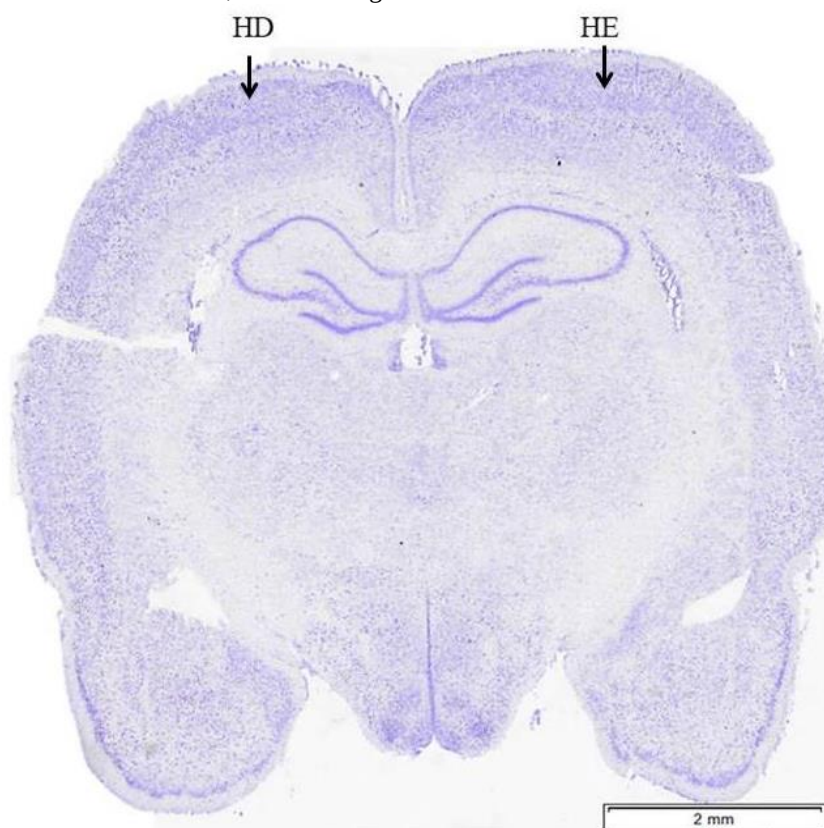
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 8. Fotomicrografias de cortes histológicos do HPCd de ambos os hemisférios de um animal do GVe. **(A)** Vista do HPCd do hemisfério direito. **(B)** Detalhe das sub-regiões CA do HPCd do hemisfério direito. **(C)** Vista do HPCd do hemisfério esquerdo. **(D)** Detalhe das sub-regiões CA do HPCd do hemisfério esquerdo. As setas indicam o sentido de infusão da agulha. Medida AP $\approx$ -3,5 mm do bregma.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

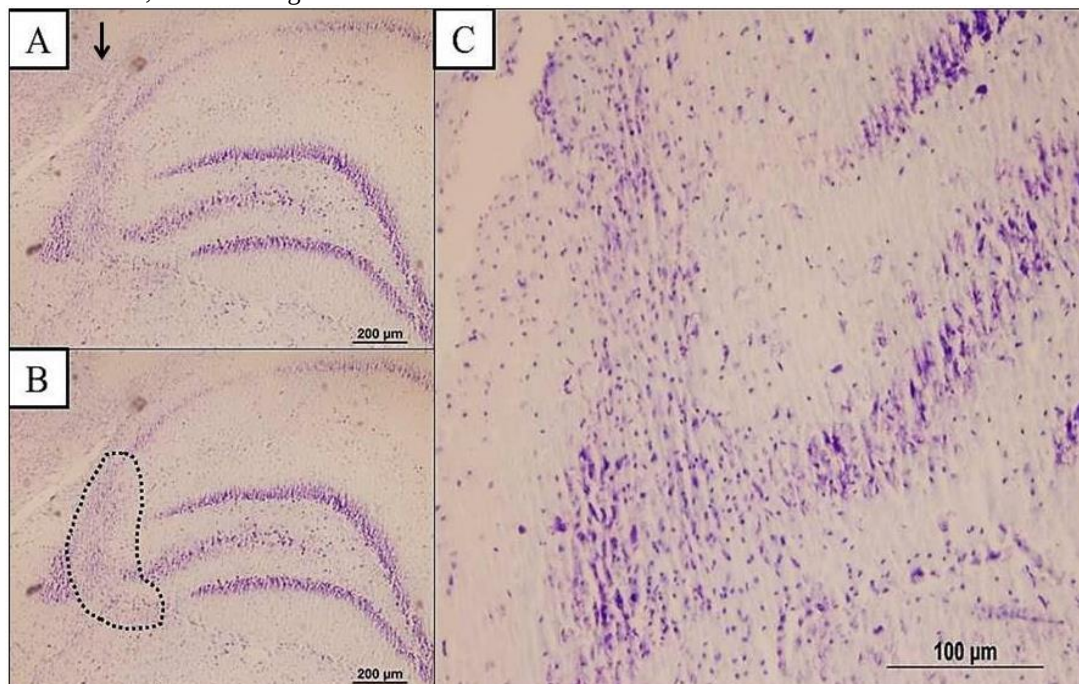
Figura 9. Fotomicrografia de um corte histológico com secção coronal mais anterior do encéfalo de um animal do GVe. HE: hemisfério esquerdo; HD: hemisfério direito. As setas indicam o local/sentido de infusão da agulha. Medida AP $\approx$ -3,5 mm do bregma.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

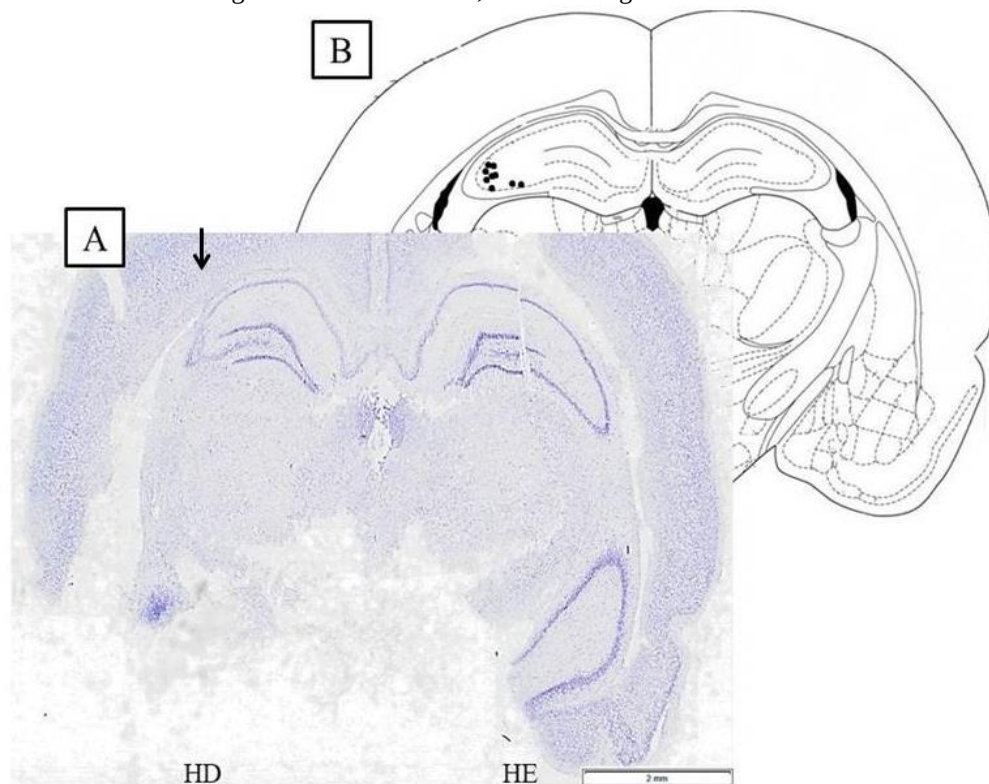
Ao analisar as lâminas dos encéfalos dos animais que receberam o lesionador IBO foi possível observar a presença de alterações na organização dos neurônios nas regiões dos sítios de injeções. Nessas alterações é visível uma região com desorganização neuronal comparada a áreas próximas, o que, ao que tudo indica representa uma região de sítio cicatricial, com desorganização tecidual e perda do padrão de celularidade típico, devido a morte celular. Além do mais, as lâminas nas quais foram observadas essas modificações não apresentavam indícios de artefato ou desprendimento do tecido. As figuras 10, 12 e 14 evidenciam imagens das lâminas com maiores detalhes de um animal do HPCd-D, HPCd-E e HPCd-BI, respectivamente. De uma maneira comparativa entre uma fotomicrografia de um encéfalo e uma esquematização, as Figuras 11, 13 e 15 evidenciam os locais em que as lesões neuronais foram encontradas para todos os animais que compõem os grupos HPCd-D, HPCd-E e HPCd-BI, respectivamente.

Figura 10. Fotomicrografias de cortes histológicos do HPCd do hemisfério direito de um animal do HPCd-D. (A) Vista do HPCd do hemisfério direito. (B) Sub-região CA3 com marcação nas alterações neuronais. (C) Detalhe da sub-região CA3 com as alterações neuronais. A seta indica o sentido de infusão da agulha. Medida AP $\approx$ -3,5 mm do bregma.



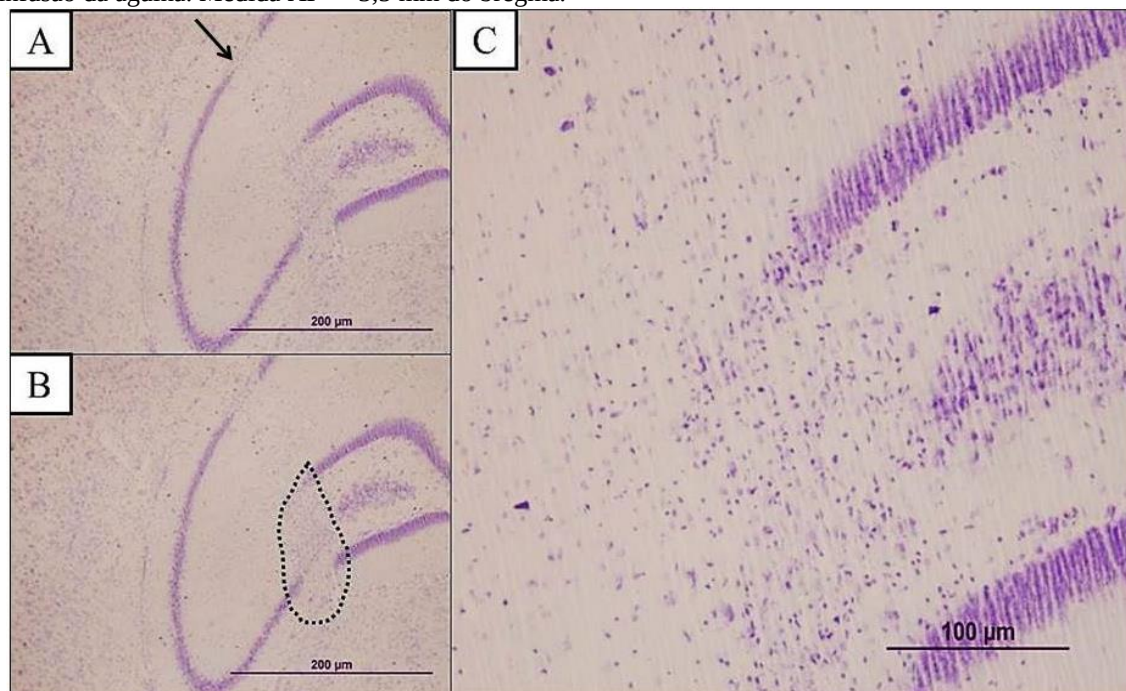
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 11. Fotomicrografia e esquematização de um corte histológico com secção coronal mais anterior do encéfalo representando os animais do HPCd-D. (A) Imagem do encéfalo de um animal do HPCd-D. (B) Esquema dos locais em que as lesões foram encontradas para cada animal do grupo HPCd-D (n=9), cada ponto de lesão representa um animal. HE: hemisfério esquerdo; HD: hemisfério direito. A seta indica o local/sentido de infusão da agulha. Medida AP $\approx$ -3,5 mm do bregma.



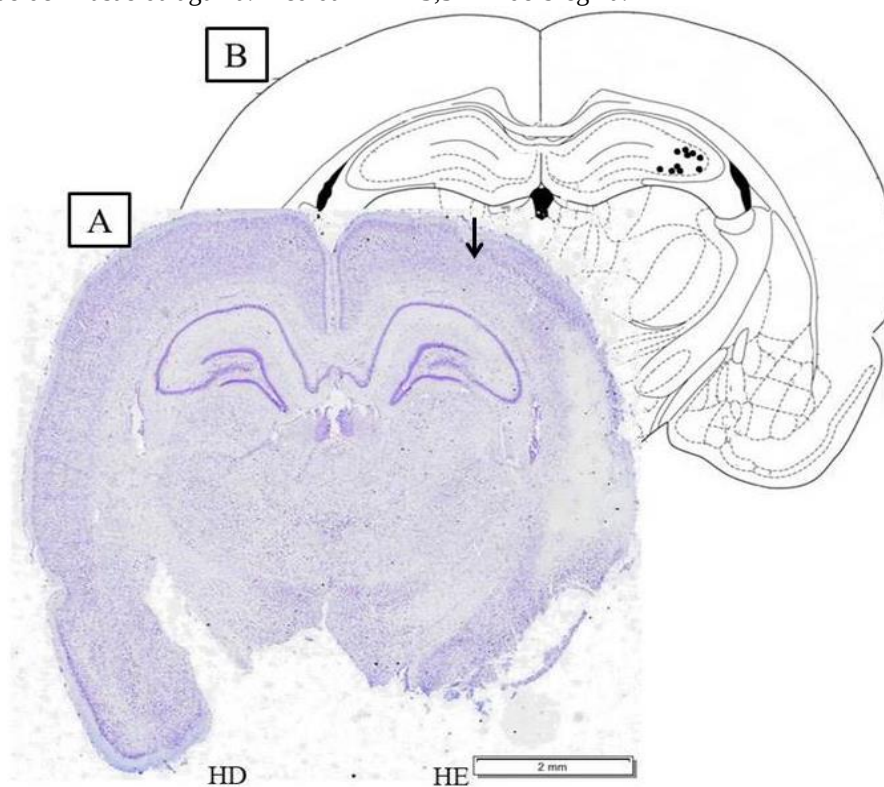
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos do HPCd do hemisfério esquerdo de um animal do HPCd-E. **(A)** Vista do HPCd do hemisfério esquerdo. **(B)** Sub-região CA3 com marcação nas alterações neuronais. **(C)** Detalhe da sub-região CA3 com as alterações neuronais. A seta indica o local/sentido de infusão da agulha. Medida AP $\approx -3,5$ mm do bregma.



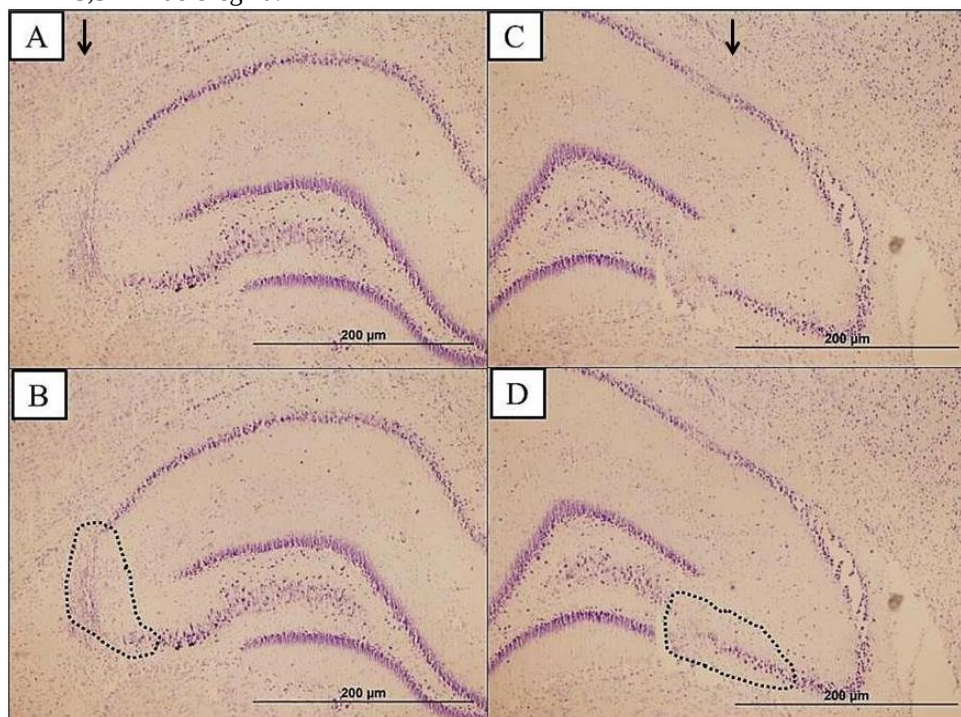
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 13. Fotomicrografia e esquematização de um corte histológico com secção coronal mais anterior do encéfalo representando os animais do HPCd-E. **(A)** Imagem do encéfalo de um animal do HPCd-E. **(B)** Esquema dos locais em que as lesões foram encontradas para cada animal do grupo HPCd-E ($n=10$), cada ponto de lesão representa um animal. HE: hemisfério esquerdo; HD: hemisfério direito. A seta indica o local/sentido de infusão da agulha. Medida AP $\approx -3,5$ mm do bregma.



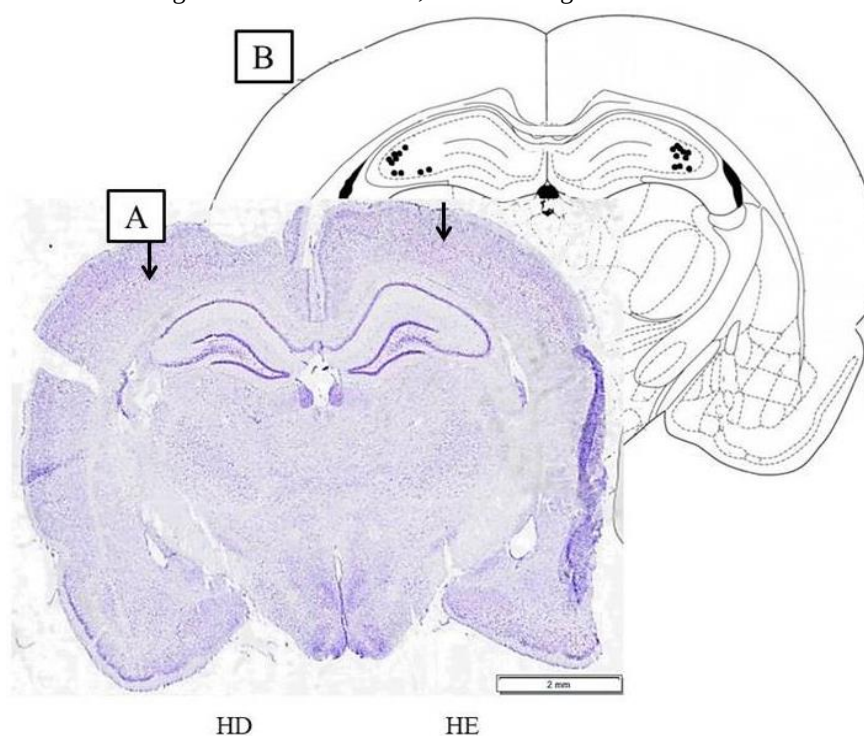
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 14. Fotomicrografias de cortes histológicos do HPCd de ambos os hemisférios de um animal do HPCd-BI. **(A)** Vista do HPCd do hemisfério direito. **(B)** Sub-região CA3 do HPCd direito com marcação nas alterações neuronais. **(C)** Vista do HPCd do hemisfério esquerdo. **(D)** Sub-região CA3 do HPCd esquerdo com marcação nas alterações neuronais. As setas indicam o local/sentido de infusão da agulha. Medida AP $\approx$ -3,5 mm do bregma.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 15. Fotomicrografia e esquematização de um corte histológico com secção coronal mais anterior do encéfalo representando os animais do HPCd-BI. **(A)** Imagem do encéfalo de um animal do HPCd-BI. **(B)** Esquema dos locais em que as lesões foram encontradas para cada animal do grupo HPCd-BI (n=10), cada ponto de lesão representa um animal. HE: hemisfério esquerdo; HD: hemisfério direito. As setas indicam o local/sentido de infusão da agulha. Medida AP $\approx$ -3,5 mm do bregma.

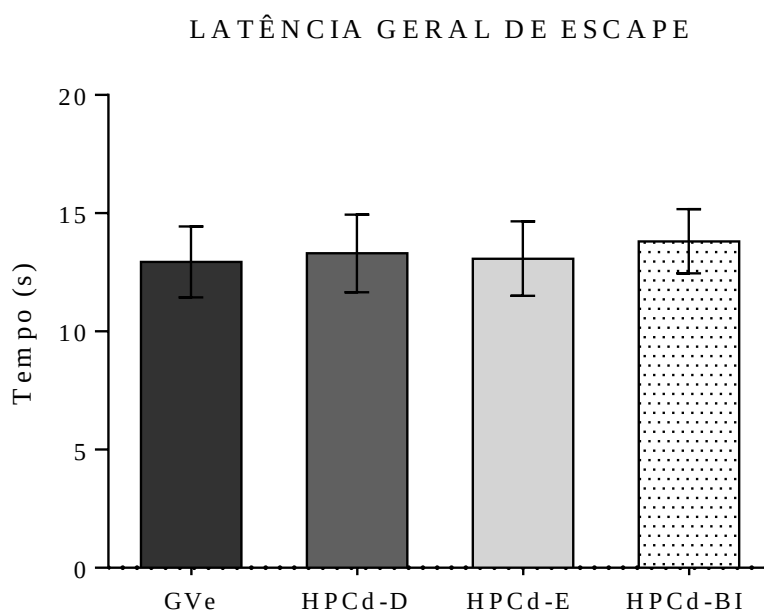


Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.2. Labirinto aquático de Morris (LAM)

A análise dos dados de latência de escape por grupo adquiridos durante os sete dias de treinos espaciais demonstrou que os animais dos grupos GVe, HPCd-D, HPCd-E e HPCd-BI apresentaram uma média geral de latência de escape semelhante sem diferença significativa entre os grupos; GVe= $12,94 \pm 1,5$; HPCd-D= $13,3 \pm 1,6$; HPCd-E= $13 \pm 1,6$; HPCd-BI= $13,8 \pm 1,4$; $F_{(3,255)} = 0,06$; $P = 0,97$ (Figura 16).

Figura 16. Latência geral de escape. O gráfico representa o tempo médio que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa durante os 35 treinos espaciais do LAM. $n=8$ para o GVe, $n=9$ para o HPCd-D e $n=10$ para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. As barras representam a média $\pm$ E.P.M.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

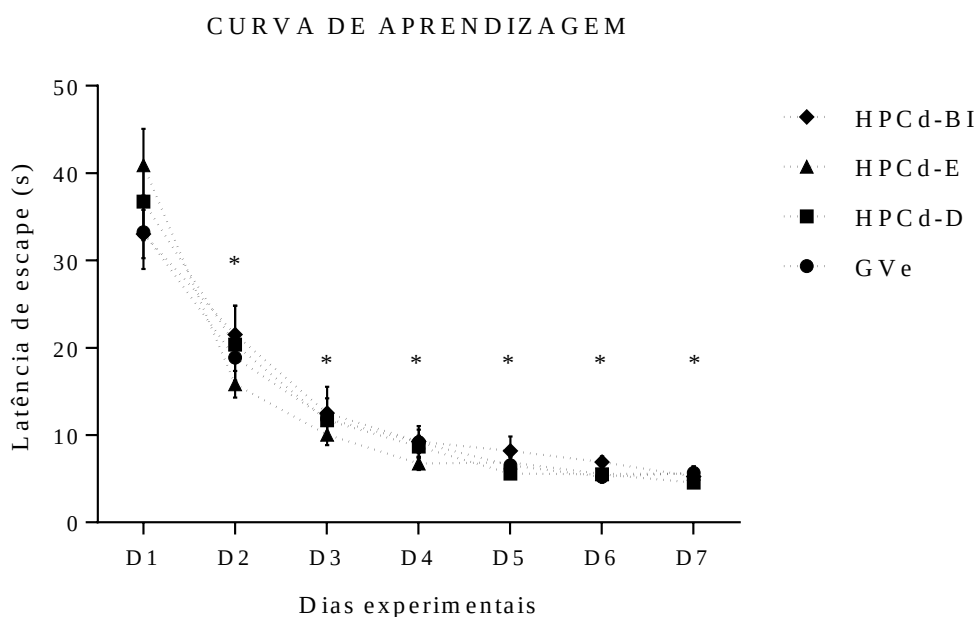
Os dados diários de latência de escape dos treinos espaciais foram utilizados na construção da curva de aprendizado (Figura 17). Não foram evidenciadas diferenças entre os grupos em relação ao desempenho ao longo dos dias para o fator tratamento ($F_{(3, 33)} = 0,95$; $P = 0,96$) (Tabela 1). Contudo, a análise pelo fator tempo demonstrou que o desempenho dos animais melhorou significativamente, em relação ao tempo de teste, a partir do segundo dia até o último dia em relação ao primeiro dia de treino para todos os grupos. Esses resultados podem ser observados na tabela 1 e na figura 17 ($F_{(6, 198)} = 80,5$; $P < 0,0001$).

Tabela 1. Latência de escape diária do LAM. A tabela representa a média da latência de escape diário em segundos para os animais dos quatro grupos experimentais. D1 representa o primeiro dia, D2 o segundo e assim sucessivamente. Os valores representam a média de tempo (segundos) $\pm$ E.P.M.

Treinos Espaciais							
Grupo experimental	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
GVe	33,23 $\pm$ 4,2	18,89 $\pm$ 2,6	11,86 $\pm$ 2,3	9,18 $\pm$ 1,8	6,53 $\pm$ 0,9	5,23 $\pm$ 0,6	5,66 $\pm$ 0,7
HPCd-D	36,73 $\pm$ 4,4	20,35 $\pm$ 4,4	11,7 $\pm$ 1,3	8,69 $\pm$ 1,2	5,6 $\pm$ 0,5	5,49 $\pm$ 0,5	4,55 $\pm$ 0,4
HPCd-E	40,92 $\pm$ 4,1	15,83 $\pm$ 1,5	10,06 $\pm$ 1,2	6,75 $\pm$ 0,7	6,85 $\pm$ 1,1	5,55 $\pm$ 0,8	5,58 $\pm$ 0,8
HPCd-BI	33,03 $\pm$ 2,7	21,53 $\pm$ 3,2	12,53 $\pm$ 2,9	9,27 $\pm$ 1,3	8,18 $\pm$ 1,6	6,89 $\pm$ 0,7	5,26 $\pm$ 0,3

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 17. Curva de aprendizagem do LAM. A curva representa a variação da latência de escape geral de cada dia para cada grupo ao longo dos sete dias de treinos espaciais. n=8 para o GVe, n=9 para o HPCd-D e n=10 para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. Cada ponto representa a média $\pm$ E.P.M. (*) $p < 0,05$ em relação ao D1 para cada grupo.

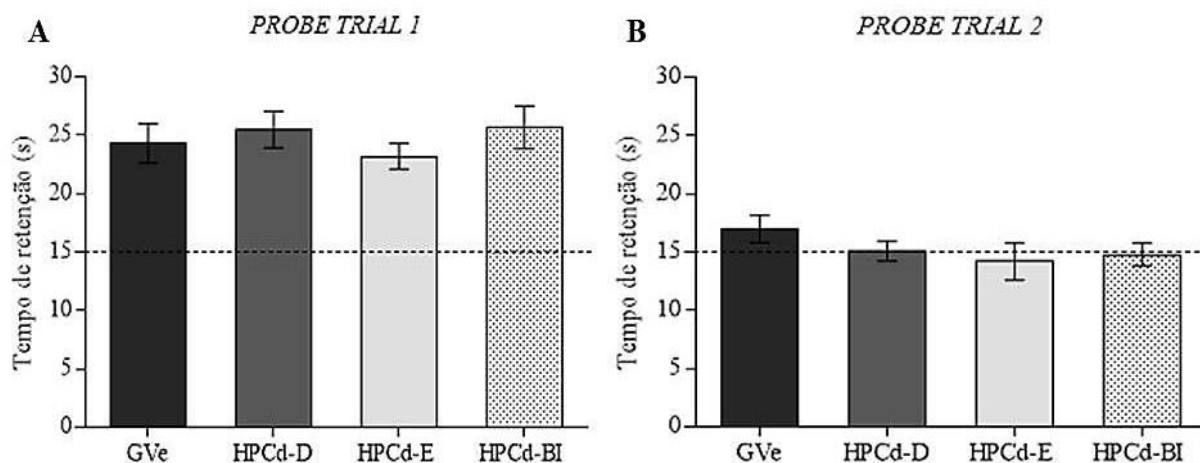


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Em relação às *probe trials* 1 e 2, ou seja, o teste de memória recente realizado no 8º dia experimental e o teste de memória remota realizados 30 dias depois, respectivamente, a análise da média do tempo de retenção dos animais dos quatro grupos experimentais foi semelhante em ambos os testes. No teste de memória recente a média de tempo de retenção dos grupos variou de 23 a 26 segundos com os animais do HPCd-E e passando menos tempo sobre o quadrante; GVe= 24,33 $\pm$ 1,7; HPCd-D= 25,49 $\pm$ 1,6; HPCd-E= 23,17 $\pm$ 1,1; HPCd-BI= 25,6 $\pm$ 1,8; $F_{(3,33)} = 0,57$; $P = 0,64$ (Figura 18A). No teste

de memória remota a média de tempo de retenção dos quatro grupos ficou próxima de 15 segundos sem diferenças significativas; GVe= $16,98 \pm 1,2$; HPCd-D= $15,1 \pm 0,9$; HPCd-E= $14,2 \pm 1,6$; HPCd-BI= $14,8 \pm 1$; $F_{(3,33)} = 0,89$; $P=0,45$ (Figura 18B).

Figura 18. *Probe trials* do LAM. Os gráficos representam o tempo médio de retenção dos animais dos quatro grupos no quadrante no qual antes havia a plataforma submersa. **(A)** *Probe trial 1* (teste de memória recente). **(B)** *Probe trial 2* (teste de memória remota). $n=8$ para o GVe, $n=9$ para o HPCd-D e $n=10$ para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. As linhas tracejadas representam a média de tempo de retenção dos animais durante 60 segundos em cada quadrante. As barras representam a média $\pm$ E.P.M.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

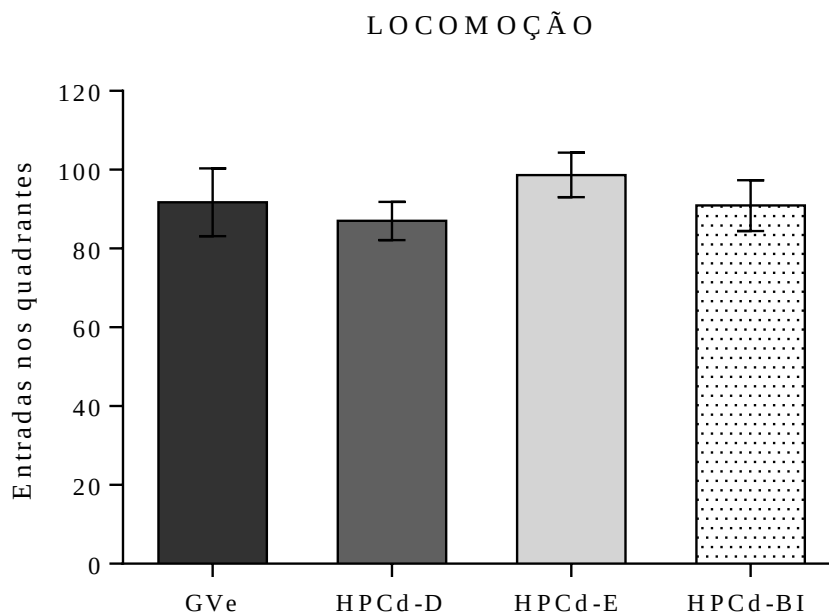
4.3. Teste de reconhecimento de objetos (TRO)

4.3.1. Habituação: comportamentos exploratórios

A análise dos dados de frequência de entrada nos quadrantes demonstrou que os animais dos quatro grupos experimentais apresentaram uma média de frequência semelhante, sem diferenças significativas; GVe= $91,7 \pm 8,6$; HPCd-D= $87 \pm 4,8$; HPCd-E= $98,7 \pm 5,6$; HPCd-BI= $90,9 \pm 6,4$; $F_{(3,33)} = 0,61$; $P=0,6$ (Figura 19).

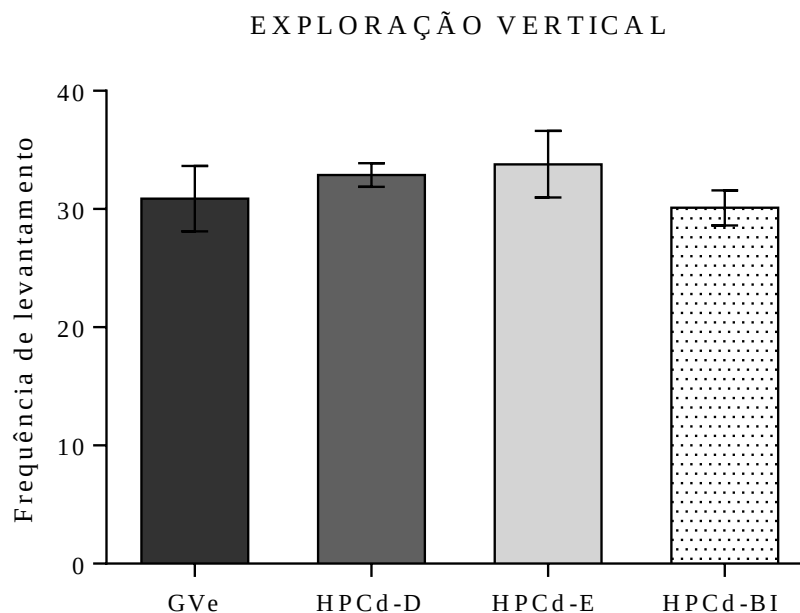
A análise dos dados de frequência de levantamento dos animais, ou seja, a frequência do movimento de se apoiarem e ficarem na posição vertical sobre as extremidades inferiores explorando verticalmente o ambiente, indicou que a média dos animais dos quatro grupos foi semelhante; GVe= $30,9 \pm 2,8$; HPCd-D= $32,9 \pm 1$; HPCd-E= $33,8 \pm 2,8$; HPCd-BI= $30,1 \pm 1,5$; $F_{(3,33)} = 0,66$; $P=0,58$ (Figura 20).

Figura 19. Frequência de entrada nos quadrantes do campo aberto. O gráfico representa a média de locomoção total durante a primeira habituação ao campo aberto. n=8 para o GVe, n=9 para o HPCd-D e n=10 para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. As barras representam a média $\pm$ E.P.M.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 20. Frequência de levantamento no campo aberto. O gráfico representa a média da frequência de exploração vertical dos animais durante a primeira habituação ao campo aberto. n=8 para o GVe, n=9 para o HPCd-D e n=10 para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. As barras representam a média $\pm$ E.P.M.

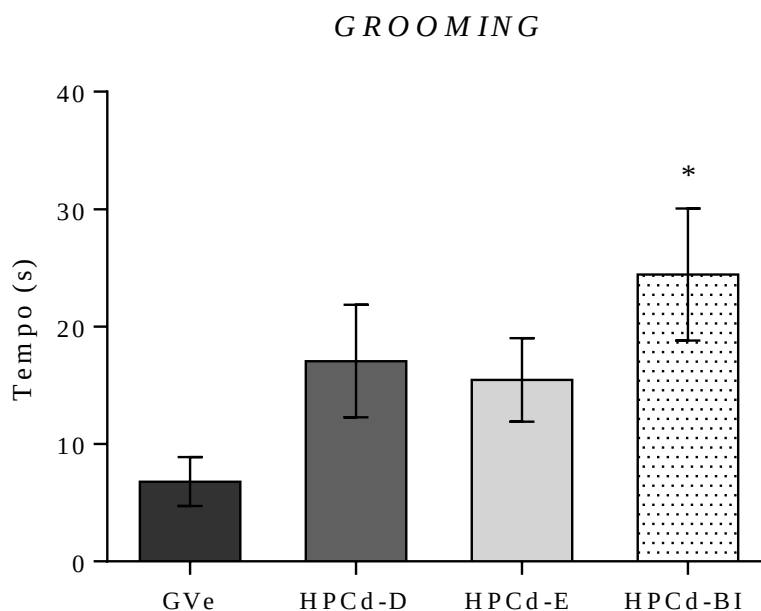


Fonte: Elaborado pelo Autor.

A análise dos dados da quantidade de segundos que os animais passaram realizando comportamento de auto limpeza demonstrou que os animais do HPCd-BI passaram mais tempo realizando essa atividade em relação aos do GVe ($P < 0,05$); GVe=

$6,8 \pm 2,1$; HPCd-D= $17,1 \pm 4,8$; HPCd-E= $15,5 \pm 3,6$; HPCd-BI= $24,4 \pm 5,6$; $F_{(3,33)} = 2,6$; $P=0,068$ (Figura 21).

Figura 21. Tempo de realização do *grooming* no campo aberto. O gráfico representa a média de segundos que os animais passaram realizando o comportamento de auto limpeza durante a primeira habituação ao campo aberto. $n=8$ para o GVe, $n=9$ para o HPCd-D e $n=10$ para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. (*) $p < 0,05$ em relação ao GVe.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.3.2. Familiarização e teste de reconhecimento

A análise dos dados referentes à exploração de dois objetos iguais (garrafas ou colunas de lego) durante a sessão de familiarização demonstrou que não houve diferenças significativas entre o tempo de exploração do objeto 1 e objeto 2 para o mesmo grupo e também não houve diferença quando comparados os quatro grupos experimentais; Objeto 1: GVe= $27,2 \pm 3,2$; HPCd-D= $20,8 \pm 0,3$; HPCd-E= $22,6 \pm 1,1$; HPCd-BI= $27 \pm 2,3$; Objeto 2: GVe= $24,2 \pm 2,6$; HPCd-D= $22,1 \pm 1$; HPCd-E= $23 \pm 1,6$; HPCd-BI= $23 \pm 1,8$; KW= 5,3; $P=0,62$ (Figura 22).

A análise dos dados referentes à exploração de dois objetos diferentes (uma garrafa e uma coluna de lego), sendo um o familiar (velho) e o outro um recém-apresentado (novo), não indicou diferença significativa quando analisados o tempo de exploração de ambos os objetos entre os diferentes grupos ($P>0,05$). Contudo, quando analisado para o mesmo grupo, o tempo de exploração do objeto novo foi significativamente maior em relação a exploração do objeto velho para os grupos GVe e HPCd-E ($p<0,0001$); Objeto velho: GVe= $21,1 \pm 0,9$; HPCd-D= $20,1 \pm 0,1$; HPCd-E= 20

± 0 ; HPCd-BI= $20,6 \pm 0,4$; Objeto novo: GVe= $32,9 \pm 3,4$; HPCd-D= $28,4 \pm 3,4$; HPCd-E= $30,9 \pm 2,4$; HPCd-BI= $26,6 \pm 2,5$; $F_{(7,66)} = 6,34$ (Figura 23).

Figura 22. Familiarização. O gráfico representa o tempo médio que os animais passaram investigando dois objetos iguais durante a familiarização do TRO. $n=8$ para o GVe, $n=9$ para o HPCd-D e $n=10$ para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. (1) e (2) representam o objeto 1 e 2, respectivamente. A linha tracejada representa o critério de investigação aceito para cada objeto (20 segundos). As barras representam a média $\pm$ E.P.M.

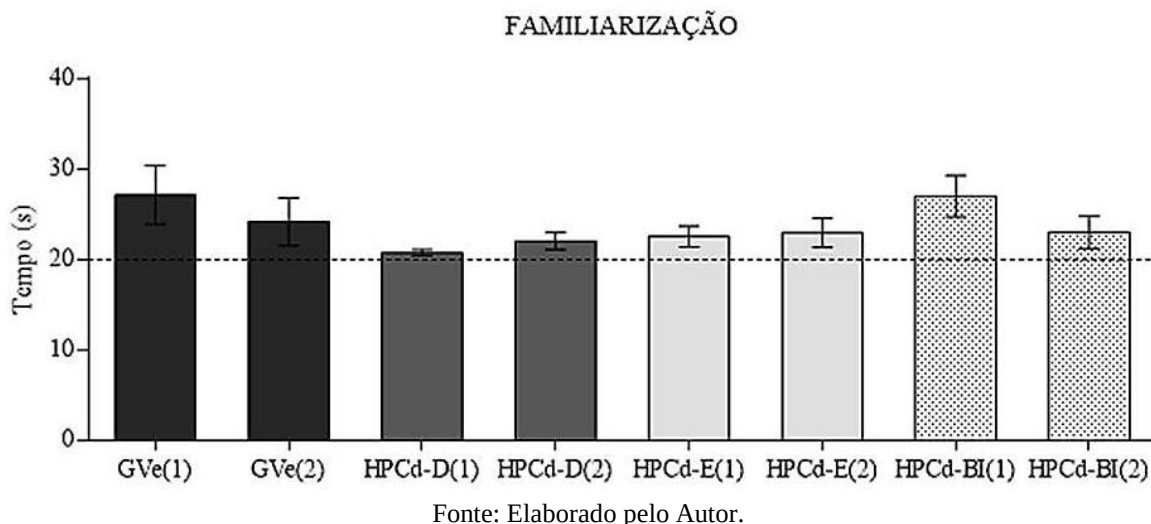
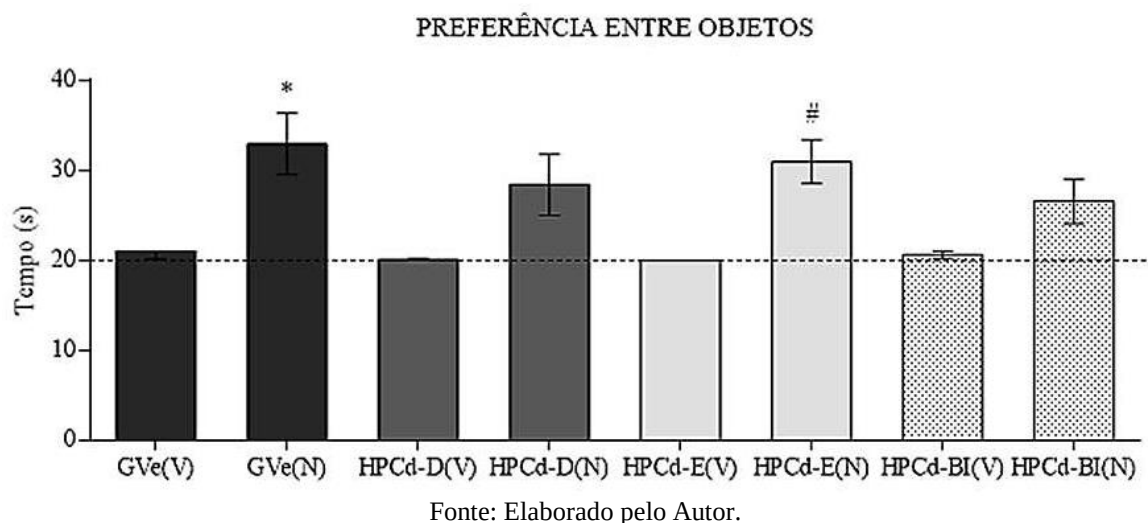


Figura 23. Teste de reconhecimento. O gráfico representa o tempo médio que os animais passaram investigando o objeto familiarizado (velho) e o objeto novo durante a sessão de teste do TRO. $n=8$ para o GVe, $n=9$ para o HPCd-D e $n=10$ para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. (V) e (N) representam o objeto velho e novo, respectivamente. A linha tracejada representa o critério de investigação aceito para cada objeto (20 segundos). As barras representam a média $\pm$ E.P.M. (*) $p < 0,05$ em relação a exploração do objeto familiarizado para o GVe. (#) $p < 0,05$ em relação a exploração do objeto familiarizado para o HPCd-E.



A análise do tempo que os animais dos quatro grupos demoraram a atingir o critério de exploração de 20 segundos para cada objeto na sessão de familiarização e na sessão de teste, demonstrou que não houve diferença na média de tempo entre os grupos e

para cada grupo individualmente quando considerada cada sessão ou ambas as sessões; $F_{(7,66)} = 0,88$; $P = 0,52$ (Tabela 2).

Tabela 2. Média de tempo (segundos) que os animais levaram para atingir o critério de investigação de 20 segundos para cada objeto durante a familiarização e o teste de reconhecimento no TRO. Os valores representam a média de tempo (segundos) $\pm$ E.P.M.

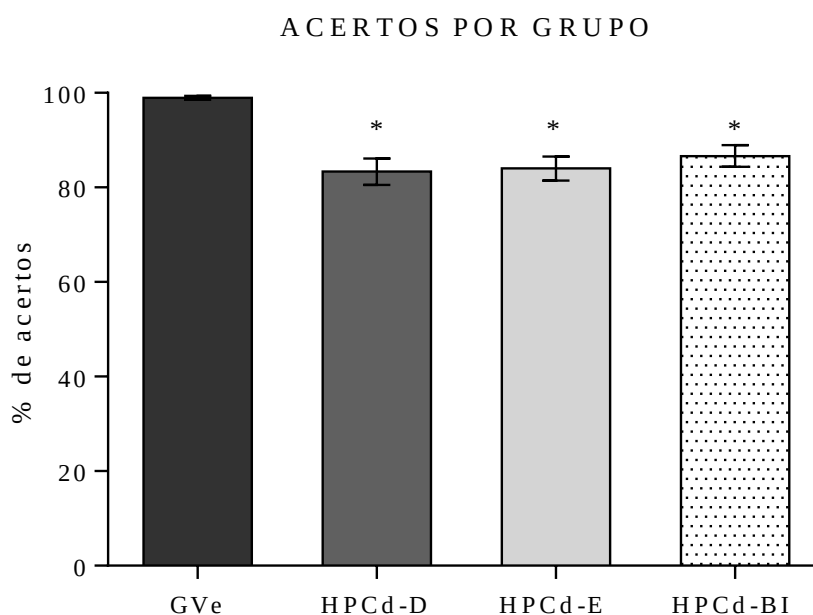
Grupo experimental	Familiarização	Teste
GVe	252,6 $\pm$ 31,4	286,4 $\pm$ 29,6
HPCd-D	204,2 $\pm$ 18,6	318,5 $\pm$ 37,5
HPCd-E	278,9 $\pm$ 41,8	301,4 $\pm$ 31
HPCd-BI	264,7 $\pm$ 49,9	282,7 $\pm$ 35,6

Fonte: Elaborado pelo Autor.

4.4. Labirinto em T forçado

Quando analisados os dados de escolha correta do braço o qual continha alimento disponível, a análise indicou que os animais do HPCd-D, HPCd-E e HPCd-BI apresentaram porcentagem de acertos menor que os animais do grupo GVe; GVe= 98,9 $\pm$ 0,4; HPCd-D= 83,3 $\pm$ 2,8; HPCd-E= 84 $\pm$ 2,5; HPCd-BI= 86,6 $\pm$ 2,3; $F_{(3,440)} = 9,02$; $P < 0,0001$ (Figura 24).

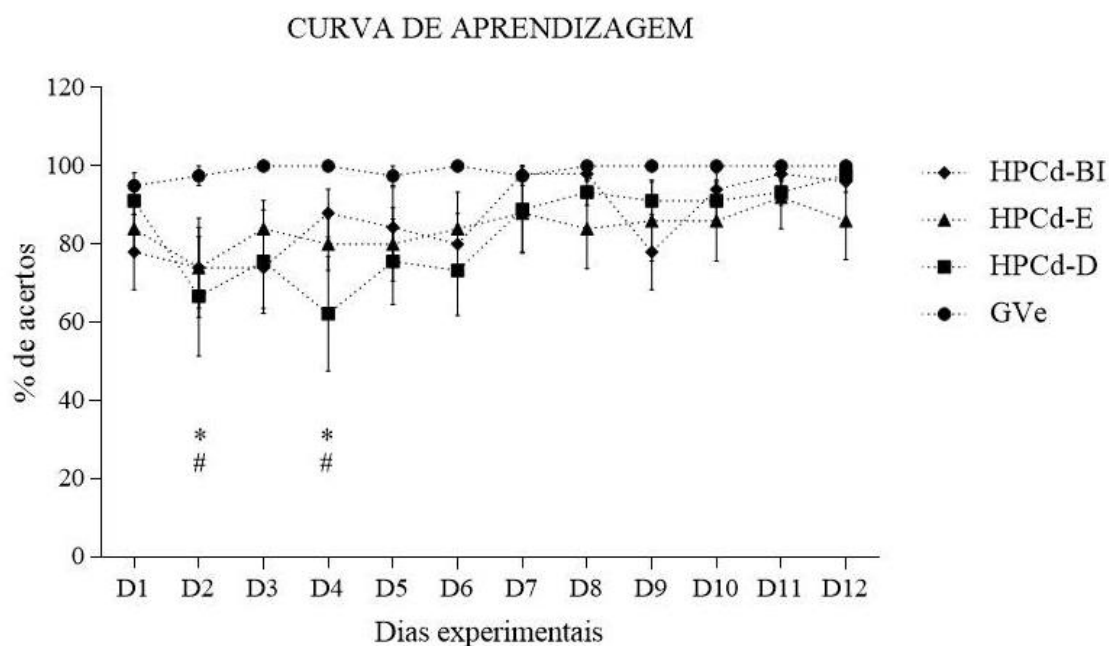
Figura 24. Porcentagem de acertos dos treinos do labirinto em T. O gráfico representa a porcentagem de animais que encontraram e consumiram o alimento disponível em um dos braços do labirinto. n=8 para o GVe, n=9 para o HPCd-D e n=10 para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. As barras representam a média $\pm$ E.P.M. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo GVe.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Quando os dados diários da porcentagem de acertos dos treinos foram analisados na construção da curva de aprendizado, pela análise do fator tratamento, ficou evidente que a porcentagem de acertos do HPCd-D em relação ao dia 2 e 4 de treinos foi estatisticamente menor que a do grupo GVe ($P < 0,05$). Os outros grupos, quando analisadas suas médias diárias, apresentaram desempenho semelhante ($F_{(3, 33)} = 1,8$; $P = 0,1713$). Para o fator tempo, a análise revelou que os animais do HPCd-D apresentaram porcentagem de acertos significativamente maior no último dia de treino em relação a porcentagem de acertos observada nos dias 2 e 4 (porcentagens médias diárias de acertos do HPCd-D - D2: 66,67%; D4: 62,22%; D12: 97,78%); o mesmo não foi encontrado para nenhum outro grupo experimental ($F_{(11, 363)} = 3,354$; $P = 0,0002$) (Figura 25).

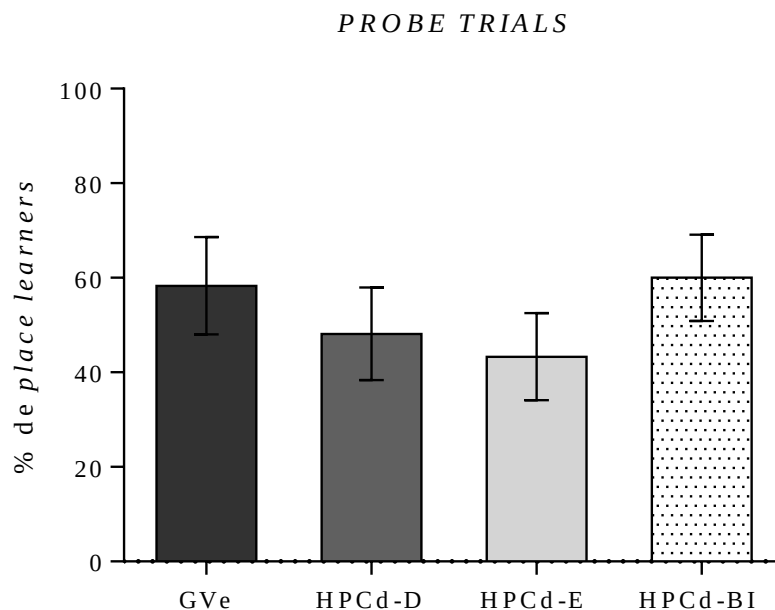
Figura 25. Curva de aprendizagem do labirinto em T. A curva representa a variação diária da porcentagem de acertos para cada grupo ao longo dos 12 dias de experimentos. $n=8$ para o GVe, $n=9$ para o HPCd-D e $n=10$ para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. Cada ponto representa a média $\pm$ E.P.M. de um dia. (*) $p < 0,05$ em relação ao D2 e D4 do grupo GVe. (#) $p < 0,05$ para o D12 na análise intragrupo para o HPCd-D.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A análise da porcentagem de animais *place learners* provenientes da média das 3 *probe trials* (testes de memória), indicou que não houve diferenças significativas entre os grupos; GVe= $58,3 \pm 10,3$; HPCd-D= $48,1 \pm 9,8$; HPCd-E= $43,3 \pm 9,2$; HPCd-BI= $60 \pm 9,1$; KW= 2,2; $P=0,53$ (Figura 26).

Figura 26. Porcentagem de animais *place learners*. O gráfico representa a porcentagem média de animais que optaram pelo braço onde antes havia alimento durante três sessões de *probe trials*. n=8 para o GVe, n=9 para o HPCd-D e n=10 para os grupos HPCd-E e HPCd-BI. As barras representam a média $\pm$ E.P.M.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

5. DISCUSSÃO

Validação dos grupos experimentais

A análise das lâminas de cada animal permitiu a observação e identificação dos sítios de injeção de IBO e PBS para os animais lesionados e do GVe. Em algumas lâminas foi encontrada evidências de entrada da agulha de infusão (IBO ou PBS). Entretanto, a desorganização neuronal bem como a diminuição/ausência de neurônios visivelmente íntegros observada nas lesões neuronais causadas pelo IBO, não foram identificadas nas marcas de entrada de agulha. Aliás, não foi observado lesões ou qualquer deterioração de neurônios para os animais do grupo GVe. Dessa forma a introdução da agulha de Hamilton e o PBS não ocasionaram lesões comprometedoras.

Além disso, a desorganização tecidual e perda do padrão de celularidade típico, com aparência de uma região se sítio cicatricial observada nas lâminas dos animais que receberam IBO, condizem com o que Kirby e colaboradores (2012) descreveram para uma lesão excitotóxica, ainda que eles não tenham utilizado IBO. Apesar de esses autores analisarem cortes de 30-60 μ m e uma montagem específica de lâminas de vidro, eles descrevem as lesões como uma “mancha oca” ou uma área de diminuição do corante violeta cresil proporcionando uma mancha diferenciada que indica o local da morte celular dos neurônios (KIRBY et al., 2012). Ademais, os resultados observados também

corroboram com o que Schwarcz e colaboradores (1979), Markowska e colaboradores (1985) e Robbins e colaboradores (1989) descrevem para a lesão por IBO. Esses autores pontuam a lesão excitotóxica como discreta, com degeneração e perda neuronal (SCHWARCZ et al., 1979; MARKOWSKA et al., 1985; ROBBINS et al., 1989).

Por outro lado, as lâminas dos animais do GVe não apresentaram nenhuma alteração na região CA3 do hipocampo dorsal direito e esquerdo demonstrando que a injeção de PBS não ocasionou nenhum dano neuronal que pudesse comprometer os animais. Além disso, a análise dos dados provenientes dos testes comportamentais fortalece o observado na histologia uma vez que os animais do GVe apresentaram elevado desempenho e em nenhum dos testes demonstrou algum déficit em realizar a tarefa proposta.

Os animais de todos os grupos também não apresentaram nenhum comprometimento motor e/ou exploratório como consequência da cirurgia estereotáxica. Os resultados da frequência de entrada nos quadrantes e da frequência de levantamento analisados na primeira habituação do campo aberto, cerca de 20 dias após os procedimentos cirúrgicos, indicam que a atividade motora e a exploração horizontal e vertical desses animais não foram prejudicadas.

A média de frequência de entrada nos quadrantes foi semelhante para os animais dos quatro grupos experimentais, demonstrando que todos eles se locomoveram de maneira similar no campo aberto durante o tempo de exposição. Santiago e colaboradores (2010) em seu estudo relacionado à indução de doença de Parkinson analisaram em diferentes dias de seu protocolo, a atividade locomotora e também a frequência de levantamento de ratos Wistar machos que não passaram por nenhum procedimento cirúrgico e/ou manipulação experimental. A média de frequência de locomoção observada por eles para esses animais na primeira análise realizada, 1 dia após a cirurgia dos outros ratos que foram operados, foi de 113 quadrantes (SANTIAGO et al., 2010). Keles e colaboradores (2018) em seu estudo dos efeitos de campos eletromagnéticos sobre a morfologia do HPC também avaliaram a entrada de quadrantes no campo aberto para ratos machos jovens intactos (grupo controle). Eles observaram que essa frequência foi de 106 ± 15 quadrantes após 25 dias contínuos de exposição aos campos eletromagnéticos (KELES et al., 2018). Markowska e Lukaszewska (1981) avaliaram a frequência de entrada nos quadrantes do campo aberto para ratos submetidos a lesões no HPCd e HPCv 11 dias após os procedimentos cirúrgicos. Eles observaram que eles não apresentavam diferenças de locomoção em relação aos seus respectivos animais controle,

sendo que a média foi de 60 a 70 quadrantes na primeira exposição (MARKOWSKA; LUKASZEWSKA, 1981). A partir desses resultados prévios e, considerando a média observada nos resultados atuais para os animais de todos os grupos (de 87 a 98 quadrantes), podemos afirmar que a cirurgia em si e a lesão encefálica não ocasionaram prejuízos locomotores e de exploração horizontal.

Para a exploração vertical, não houve diferenças entre os grupos lesionados e o GVe quanto a média de frequência de levantamento. Santiago e colaboradores (2010) observaram que animais intactos apresentaram uma média 31 levantamentos na primeira análise no campo aberto (1 dia após a cirurgia dos outros grupos). De maneira semelhante, no nosso estudo, os animais dos quatro grupos apresentaram uma média de ± 30 levantamentos, demonstrando que até mesmo os lesionados exploraram o ambiente verticalmente como um animal intacto o fez em outro estudo. Entretanto, Keles e colaboradores (2018) viram que ratos jovens intactos exibiam uma média de frequência de levantamento de 78 ± 12 , resultado bem acima dos observados no estudo atual, inclusive para animais do GVe. Contudo, isso pode ter ocorrido devido a idade dos animais em questão, enquanto eles avaliaram animais com cerca de 7 semanas de idade, os animais desse estudo já apresentavam pelo menos 3 meses de idade, com isso, uma diminuição de comportamento motivado pode ter ocorrido.

Apesar disso, Bannerman e colaboradores (2003) observaram que animais com lesão citotóxica no HPCv não diferiam dos animais controle em relação a locomoção e levantamento na arena do campo aberto. Complementando esses resultados com os observados neste estudo para o HPCd, podemos afirmar que lesões hipocâmpais não tendem a prejudicar os animais em relação a locomoção e exploração.

Durante a habituação do campo aberto também foi analisado o tempo que os animais passaram realizando o comportamento de autolimpeza conhecido como *grooming*. A realização do *grooming* além do habitual é relacionada a graus de stress, ansiedade e depressão (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Os resultados mostram que os animais do GVe foram os que apresentaram menor média de tempo realizando *grooming* e os animais do HPCd-BI passaram mais tempo realizando esse comportamento, significativamente. Apesar dos animais com lesão unilateral, direita ou esquerda, não terem diferido na média de tempo realizando o *grooming* em relação ao GVe, eles passaram mais tempo realizando esse comportamento (cerca de 16 segundos versus ± 7 segundos). A partir disso, supõe-se que quanto maior a lesão encefálica maior o tempo que o animal realiza tal comportamento.

Apesar desses resultados, o *grooming* é um comportamento que é muito complexo e envolve uma série de fatores. Kalueff e Tuohimma (2005), por exemplo, pontuam que é necessária uma análise minuciosa dos detalhes do comportamento, como frequência, tempo de realização e local do corpo escolhido para a limpeza a fim de diferir se o *grooming* realizado é algo natural ou ocasionado por estresse ou outra condição propriamente dita.

Dessa maneira, mesmo com os resultados do comportamento de autolimpeza, os outros resultados obtidos a partir da habituação ao campo aberto revelaram que os animais de todos os grupos não apresentaram prejuízos de locomoção e exploração. Sendo assim, os resultados obtidos nos testes comportamentais não foram inviabilizados uma vez que a cirurgia em si e as lesões encefálicas não ocasionaram impedimento nos animais quanto à movimentação e exploração.

Labirinto aquático de Morris: memória espacial recente e remota

No LAM os animais com lesão unilateral ou bilateral não diferiram do observado para o grupo GVe tanto para a aprendizagem durante os treinos quanto para os testes de memória. A similaridade observada na média geral de escape, ou seja, a média de tempo que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa durante os treinos, indica que o HPCd e sua região CA3 não está envolvida com esse processo de aprendizagem espacial. Isso também pode ser observado na curva de aprendizagem, visto que quando observamos os resultados ao longo dos dias confrontando os grupos, fica evidente que eles não diferiram na latência diária. Entretanto, uma análise pelo fator tempo revela que a latência de escape a partir do segundo dia de treino até o último, diferiu significativamente do primeiro dia para cada grupo, demonstrando que todos os animais foram capazes de aprender a tarefa espacial, realizando-a cada vez mais rápido ao longo dos dias.

Esses resultados divergem do que já havia sido encontrado anteriormente tanto para lesão de ambos os HPC como um todo (MORRIS et al., 1982) quanto para lesões na região dorsal (MACDONALD; WHITE, 2004; FANSELOW; DONG, 2010), uma vez que sabe-se que o HPC é essencial para a aprendizagem e formação de memórias (SWEATT, 2004; VANGUILDER; FREEMAN, 2011), sobretudo a memória espacial em roedores (SHINOARA et al., 2012).

Morris e colaboradores (1982) já observavam que animais com lesões no HPC total apresentavam severo prejuízo na execução de tarefa espacial no LAM. MacDonald e

White (2004) observaram que animais com lesão neurotóxica na região dorsal de ambos os hipocampos não aprendiam a localização da plataforma submersa.

Por outro lado, Fenton e Bures (1993) observaram que ratos com lesões unilaterais no HPCd aprendiam a tarefa espacial do LAM assim como um animal com o encéfalo intacto e que não havia especialização de um dos HPC (direito ou esquerdo) para o processamento dessas informações. Corroborando com esses autores, nos nossos resultados, animais com lesões também aprenderam a tarefa uma vez que não possuíam todo o HPC lesionado, ademais, não foi observada especialidade entre os HPCd direito e esquerdo.

Ainda, não foi evidenciada lateralização funcional da sub-região CA3 para a tarefa espacial do LAM, uma vez que os grupos com lesões unilaterais também não diferiram entre si. Klur e colaboradores analisaram o HPCd e não detectaram lateralização funcional para a tarefa do LAM. Apesar de eles terem visto maior relação da estrutura de um dos hemisférios cerebrais ou do outro em diferentes etapas do processamento da memória espacial, eles propõem que existe uma relação complexa de processamento de memórias entre ambos HPCd e para constatar uma lateralização, um extenso estudo deve ser realizado (KLUR et al., 2020).

Além disso, durante o teste de memória recente, que ocorreu logo após as sessões de treinos, não houve diferença entre os grupos em relação ao tempo que passaram nadando sobre o quadrante onde antes havia a plataforma. Embora os grupos não tenham diferido quanto a este tempo, eles demonstraram preferência pelo quadrante onde antes havia a plataforma. Isso pelo motivo de que, os animais nadaram em média 25 segundos neste local quando o tempo esperado ocasionalmente é de 15 segundos, uma vez que são 4 quadrantes a serem explorados em 60 segundos.

Da mesma maneira, no teste de memória remota não houve diferença significativa no tempo observado para cada grupo. Além disso, os animais dos quatro grupos não apresentaram preferência por nenhum dos quadrantes visto que nadaram em média de 15 a 17 segundos no quadrante de interesse. Apesar disso, é válido ressaltar que os animais do GVe foram os que passaram um pouco mais de tempo nadando sobre o quadrante onde antes havia a plataforma (± 17 segundos). Esta falta de preferência por quadrantes no teste de memória remota nos indica que a memória espacial adquirida durante os treinos foi esquecida. Resultado semelhante ao observado por Rossato e colaboradores (2006), só que com animais lesionados na região CA1 do HPCd depois de alguns dias do fim dos treinamentos.

Os resultados observados em ambos os testes de memória apontam que não há indícios de lateralização funcional e a CA3 do HPCd não está envolvida com a evocação da memória espacial recente e remota. Esses dados divergem de trabalhos anteriormente publicados que descrevem que lesões no HPC prejudicam os animais em testes de memória recente e remota no LAM (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; BROADBENT; SQUIRE; CLARK, 2006; CLARK; BROADBENT; SQUIRE, 2007).

Broadbent e colaboradores (2006) viram que animais com lesão em ambos HPC passavam um tempo menor no quadrante quando comparados aos animais sem as lesões em testes de memória que ocorriam no dia 0 (memória recente) e 30 dias depois (memória remota) do fim das sessões de treinos. Os autores deixam evidente que lesões que prejudicam o funcionamento do HPC causam comprometimento no processamento e evocação de memórias recentes e remotas (BROADBENT; SQUIRE; CLARK, 2006). Clark e colaboradores (2007) observaram que animais com lesão no HPC apresentavam desempenho inferior durante teste de memória remota 60 dias após a aquisição do local da plataforma no LAM com a ajuda de pistas extras. Além disso, os resultados do LAM também diferem do estudo anterior de Clark e colaboradores (2005) que avaliaram o desempenho de animais com lesões no HPC completas ou apenas na região dorsal em testes de memória recente e remota no LAM. Eles observaram que animais com lesão na região dorsal de ambos os hipocampus apresentaram prejuízos nos testes da mesma maneira que os animais com lesão no HPC inteiro.

Frankland e Botempi (2005) enfatizam a relação do HPC nos processos iniciais de aquisição da memória, mas pontuam seu papel necessário, mas limitado no armazenamento e recuperação de algumas memórias, como por exemplo, as memórias remotas. Dessa maneira, eles pontuam que memórias remotas tem processamento e armazenamento mais relacionado ao córtex pré-frontal e a recente por sua vez, ao HPC (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). A partir disso, de alguma maneira a lesão na CA3 dorsal não impediu que os animais preferissem o quadrante elementar no teste de memória recente e a memória não passou a ser remota por sua vez, pois não foi devidamente processada e consolidada.

Considerando a discordância com trabalhos anteriormente publicados, os animais podem não ter apresentado comprometimento em realizar a tarefa espacial do LAM devido à extensão da lesão realizada. É válido ressaltar que a lesão do IBO vem sendo considerada discreta (SCHWARCZ et al., 1979; MARKOWSKA et al., 1985; ROBBINS et al., 1989). Com isso, é notório recordar que devido a sutis diferenças nos neurônios

piramidais essa sub-região já foi subdividida em três outras (CAa,b,c) (LORENTE DE NÓ, 1934). Dessa maneira, a lesão pode ter sido ainda mais pontual e discrepante entre os animais, mas, nesse caso, uma extensa análise seria necessária para qualquer conclusão. Em alternativa, alguns outros estudos que investigam a sub-região CA3 investiram em mais de um sítio de injeção por hemisfério cerebral a fim de garantir o dano de toda a sub-região de interesse (LI; CHAO, 2008; HOGE; KESNER, 2007). No nosso estudo foi realizado um único sítio de injeção por hemisfério para que a cirurgia fosse o menos invasiva possível, o que pode ter resultado em uma lesão mais pontual e não por toda a sub-região desejada. No entanto, as lesões foram relativamente homogêneas em relação ao local, como pode ser observado nas análises histológicas.

Além disso, o não comprometimento da tarefa também pode ser devido à sub-região do HPC lesionada. Rossato e colaboradores (2006) notaram um comprometimento na consolidação da memória espacial relacionada a região CA1 do HPCd de ratos Wistar. Os autores observaram que quando essa região estava comprometida com a inibição de síntese de proteínas envolvidas no processamento de memórias, os animais ficavam com a consolidação e a reconsolidação da memória espacial prejudicada quando submetidos ao teste do LAM (ROSSATO et al., 2006). Além do mais, estudos anteriores já indicam que a região CA1 do HPC está envolvida com padrões temporais e nos processos de memória (SWEATT, 2004; ROSSATO et al., 2006; LANGSTON et al., 2010; NORMAN, 2010).

Ademais, apesar de ser um teste amplamente utilizado na busca pela aprendizagem e memorização espacial em roedores, existem algumas controvérsias em seu uso. Devido à aversão pela água dos animais, o LAM é um ambiente estressante e o aprendizado é subjacente com reforço negativo (KOSAKI et al., 2018).

De qualquer maneira, a sub-região lesionada, independentemente da sua extensão, não foi suficiente para prejudicar, de uma maneira lateralizada ou não, o processamento da memória espacial no LAM. Do mesmo modo, não afetou o processamento da memória recente e não mostrou relação com a memória remota, embora os animais não tenham apresentado preferência pelo quadrante no último teste. A partir disso, se faz necessário investigar a relação de alguma outra região do HPC no processamento dessas informações.

Labirinto em T forçado: memória espacial e estratégia de navegação espacial

Ainda que os resultados encontrados no LAM tenham divergido do que era esperado a partir de outros trabalhos em relação ao HPC e a memória espacial, no labirinto em T, os animais lesionados apresentaram comprometimento em realizar a tarefa espacial. Neste labirinto é possível analisar a memória espacial de trabalho, uma vez que eles se locomovem para encontrar o braço que contém o alimento além da estratégia de locomoção espacial adotada através das *probes trials*.

Os resultados dos treinos evidenciaram que todos os grupos lesionados apresentaram média de porcentagem de acertos inferior ao grupo GVe, indicando que a região CA3 do HPCd tem envolvimento no processamento da memória espacial de trabalho, mas esse processamento não ocorre de uma maneira lateralizada. Quando analisada a curva de aprendizagem os animais com lesão no HPCd direito demonstraram um desempenho inferior em relação ao grupo GVe, ao menos nos dias iniciais. De certa forma, a lesão nessa região tem maior relevância no processamento dessas novas informações e retarda a aquisição, mas o déficit é superado pelo treinamento repetido. Esta falta de comprometimento duradoura sugere que, com a repetição dos treinos, algum mecanismo faz com que outra região do HPC assuma essa função.

Apesar disso, os resultados não indicam lateralização pela ausência de diferenças entre os grupos lesionados unilateralmente, o que não corrobora com alguns resultados de Shipton e colaboradores (2014). Esses autores utilizando-se do labirinto em T pontuam que existe lateralização funcional do HPC de camundongos em uma tarefa espacial de memória de longo prazo (SHIPTON et al., 2014). Apesar disso, os resultados encontrados nos treinos para a média de acertos corroboram com outros resultados de Shipton e colaboradores (2014), uma vez que eles também observaram que a lesão na CA3 de ambos os HPCd prejudicou a memória de curto prazo dos seus animais.

Ademais, os resultados observados também corroboram com o de outros estudos envolvendo ratos com lesões em ambos HPCd em uma tarefa similar com recompensa alimentar no labirinto em T (POTVIN et al., 2006; HOCK; BUNSEY, 1998). Hock e Bunsey (1998) observaram que lesões por IBO em ambos HPCd são críticas para formação de memórias espaciais no labirinto em T. Potvin e colaboradores (2006) também demonstraram que ratos com lesão excitotóxica no HPCd como um todo apresentavam prejuízos em uma tarefa espacial que envolvia memória espacial de trabalho no labirinto em T. Eles também observaram que esse prejuízo se repetia quando os animais eram submetidos ao labirinto radial (POTVIN et al., 2006).

De fato os resultados aqui evidenciados no labirinto em T também corroboram com outros envolvendo o labirinto radial (POTVIN et al., 2006; POTHUIZEN et al., 2004; POE et al., 2000), um aparato que também envolve busca e recompensa alimentar, com a diferença de que possui oito braços e opções de escolha ao invés de duas como no labirinto em T. Pothuizen e colaboradores (2004) observaram que animais com lesão excitotóxica em ambos HPCd ficaram comprometidos com a formação da memória espacial de trabalho precisa em uma tarefa no labirinto radial. Já Poe e colaboradores (2000) observaram que animais com lesão em ambos HPC como um todo apresentavam comprometimento da memória espacial em uma tarefa que envolvia reforço no labirinto radial. Entretanto, esses mesmos autores observaram que apenas lesões unilaterais não prejudicavam os animais (POE et al., 2000), contrariando os resultados observados neste estudo, no qual os animais com lesões unilaterais diferiram do observado para o GVe.

Confrontando a literatura podemos afirmar que para realização da tarefa espacial do labirinto em T, utilizando-se a memória espacial de trabalho, a sub-região CA3 do HPCd possui a mesma relevância do HPCd como um todo. E, além disso, não foi evidenciada lateralização funcional para essa relevância, o que não foi examinado nesses outros estudos.

Por outro lado, quanto à estratégia de navegação, os resultados demonstram que a região de interesse não afeta o uso da estratégia aloccêntrica. Quando analisadas a média das *probe trials* que ocorreram no decorrer do protocolo do labirinto em T é possível observar que não houve diferenças na porcentagem de animais denominados *place learners*, ou seja, animais que optaram pelo braço onde antes havia alimento disponível nos treinos. Pelo menos 40% dos animais dos quatro grupos experimentais optaram por essa estratégia.

Apesar da escolha pela estratégia de navegação envolver uma série de fatores, dentre eles o uso ou não de processos espaciais e a aprendizagem estabelecida (por “resposta” ou “lugar”), vários estudos relacionam o uso e processamento da estratégia de navegação espacial de lugar/alocêntrica com o HPC (MORRIS et al., 1990; COLOMBO et al., 2003; KOSAKI et al., 2018) e também com a sua porção dorsal (PACKARD; MACGAUGH, 1996; COMPTON, 2004). Dessa maneira, as conclusões atuais não só contrariam o observado para lesões no HPC como um todo, mas também para lesões mais restritas, no HPCd.

Kosaki e colaboradores (2018) pontuam que a estratégia de resposta (egocêntrica) é relacionada a um hábito de movimento automático e a de local (alocêntrica) relaciona-

se a busca de um objetivo e que, quando esse objetivo é desvalorizado de algum modo, esses animais tendem a mudar de estratégia. Eles observaram que animais com lesão em ambos HPC com IBO não modificavam a sua escolha pela estratégia no labirinto em T após a desvalorização do reforço, mas ela foi predominantemente egocêntrica devido às lesões hipocâmpais (KOSAKI et al., 2018). Morris e colaboradores (1990) e Compton (2004) constataram que ratos com lesão no HPC e no HPCd, respectivamente, apresentavam comprometimento em utilizar-se da navegação espacial aloccêntrica no LAM. Packard e McGaugh (1996) viram que animais com lesão em ambos HPCd com lidocaína após treinamento no labirinto em T e antes dos testes, não utilizavam a aprendizagem por lugar (estratégia aloccêntrica) sendo que eles utilizavam predominantemente a estratégia egocêntrica com aprendizado por resposta.

Apesar disso, estudos demonstram que a aprendizagem por lugar (estratégia aloccêntrica) ou por resposta (estratégia egocêntrica) pode ser adquirida no labirinto em T através de sistemas de memória separados, que incluem o hipocampo e o caudado putâmen, respectivamente (PACKARD, 1999; PACKARD; MCGAUGH, 1996; THOMPSON; GUILFORD; HICKS, 1980). Packard e McGaugh (1996) observaram que animais tratados com salina mudavam a estratégia de aprendizado e navegação de um teste para o outro, concluindo que existe uma mudança nos mecanismos de aprendizagem com treinamento prolongado. Dessa maneira é possível que o treinamento prolongado utilizado tenha causado essas alterações na aprendizagem e estratégia utilizada e a lesão localizada não foi suficiente para impedir uma aprendizagem por lugar. Essa informação também esclarece o uso das duas estratégias de navegação presentes nos quatro grupos experimentais.

Por outro lado, Iglói e colaboradores (2010) evidenciaram que não há lateralização funcional no HPC para estratégia de navegação espacial em humanos, e eles observaram, por ativação neuronal, que os dois HPC (direito e esquerdo) contribuem para a estratégia de navegação utilizada. Apesar dos resultados atuais não mostrarem efeitos significativos da sub-região estudada no processamento da navegação espacial, também não foi observada qualquer contribuição mais elevada de algum dos hemisférios encefálicos.

A partir dessas observações, avaliando os resultados, é plausível que a ausência de comprometimento significativo do uso da estratégia e aprendizado por lugar possa ter ocorrido pelo motivo de que apenas uma fração do HPC foi lesionada. Provavelmente essa sub-região não tem relação com o processamento dessa estratégia, diferentemente do

que é observado quando porções maiores do HPC estão lesionadas. Para maiores esclarecimentos, assim como observado após os resultados do LAM, outras sub-regiões do HPC devem ser analisadas em estudos futuros.

Teste de reconhecimento de objetos: memória de reconhecimento

Além da relação do HPC no processamento da memória espacial, existem evidências que relacionam essa estrutura encefálica com o processamento da memória de reconhecimento (BROADBENT; SQUIRE; CLARK, 2004). Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais em relação a duração total da sessão nas sessões de familiarização e de teste, nas quais os animais deveriam atingir o critério de exploração mínimo (20 segundos por objeto). O critério de exploração mínimo é fundamentado para diminuir a variabilidade individual dos animais em relação a atividade exploratória e garantir que eles explorem os objetos por um tempo mínimo igual (LEGER et al., 2013). Segundo Leger e colaboradores (2013) o tempo absoluto gasto para atingir esse critério varia de 3 a 5 minutos. Os resultados observados corroboram com o que esses autores propuseram uma vez que o tempo total de sessão foi de ± 5 minutos para todos os grupos experimentais em ambas as sessões do TRO.

Na sessão de familiarização os animais dos quatro grupos não apresentaram diferenças entre si em relação à exploração de dois objetos iguais. Ademais, quando analisadas a exploração dos objetos para um mesmo grupo, nenhum dos grupos apresentou preferência entre esses objetos. Dessa forma, os procedimentos cirúrgicos pelos quais os animais passaram não os impediram e/ou prejudicaram na exploração dos objetos, validando o observado em relação aos comportamentos exploratórios. Considerando que o TRO baseia-se no comportamento natural dos ratos que é a curiosidade e o interesse pela novidade (STUPIEN; FLORIAN; ROULLET, 2003), é válido ressaltar que os animais atingiram o critério de familiarização e estavam aptos a realizar o teste de reconhecimento (LEGER et al., 2013).

A diferença de exploração entre um objeto que já foi previamente apresentado ao animal e um novo objeto, proporciona o que é conhecido como reconhecimento (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Estudos anteriores demonstram que ratos possuem preferência pelo novo em relação a algo familiarizado, seja um objeto e/ou lugar (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; HANNESSON et al., 2004).

Durante a sessão de teste no TRO, os animais do GVe e do grupo HPCd-E apresentaram preferência por investigar o objeto novo e passaram menos tempo

investigando o objeto velho (familiarizado), demonstrando que reconheceram o objeto previamente apresentado. Esse resultado corrobora com o elucidado por Stupien e colaboradores (2003) e Hoge e Kesner (2007) para os animais do grupo controle, que não apresentavam nenhuma lesão.

Por outro lado, a falta de preferência entre os objetos velho e novo no teste pelos animais do HPCd-D e HPCd-BI indicam que a lesão do lado direito impediu que eles reconhecessem o objeto familiar como conhecido. Com isso, os resultados encontrados neste estudo sugerem que a CA3 do HPCd do hemisfério direito está mais relacionada com o processamento e evocação da memória de reconhecimento, prejudicando a detecção de novos objetos visuais. O fato dos animais lesionados bilateralmente também não apresentarem preferência de exploração entre os objetos corrobora essa afirmação, pois também apresentam a região do hemisfério direito lesionada. Dessa forma, existe lateralização para o processamento dessa memória, uma vez que a lesão no hemisfério esquerdo não conferiu os mesmos resultados.

Esses resultados contrariam o observado em estudos anteriores para regiões envolvidas no processamento da memória de reconhecimento a partir da familiaridade por um estímulo (EICHENBAUM; OTTO; COHEN, 1994; AGGLETON; BROWN, 1999; EICHENBAUM; YONELINAS; RANGANATH, 2007) e também para estudos com lesões no HPC (STUPIEN; FLORIAN; ROULLET, 2003; MUMBY et al., 2002; LI; CHAO, 2007; HOGE; KESNER, 2007).

Eichenbaum e colaboradores (1994) e Aggleton e Brow (1999) propuseram que dois processos contribuem para o reconhecimento, um relacionado à lembrança e outro relacionado a familiaridade de um estímulo. O processo de reconhecimento referente a familiaridade geralmente é disponível ao indivíduo mais rapidamente do que a lembrança. O procedimento envolvendo a lembrança relaciona-se com maiores detalhes sobre o estímulo do que apenas discriminar entre itens previamente apresentados e outros não (EICHENBAUM; YONELINAS; RANGANATH, 2007). Dessa forma, apesar do intervalo de 24 horas entre familiarização e teste, a memória de reconhecimento aqui analisada apenas evidência uma familiaridade ao objeto e não uma lembrança, uma vez que não foram analisados contextos e lugares relacionados aos objetos.

Eichenbaum e colaboradores (1994) e Aggleton e Brow (1999) relacionaram o processamento da memória de reconhecimento pela lembrança com o HPC e pela familiaridade com a região parahipocampal. Dessa maneira, lesões no HPC prejudicariam gravemente o processamento da memória de reconhecimento em relação à lembrança do

estímulo, mas não pela sua familiaridade (EICHENBAUM; OTTO; COHEN, 1994; AGGLETON; BROWN, 1999).

Apesar disso, vários estudos avaliam a relação do HPC com a memória de reconhecimento de uma maneira menos específica a esses processos. Mumby e colaboradores (2002) detectaram que ratos que apresentavam lesão citotóxica nos HPC direito e esquerdo exibiam preferência ao objeto novo em relação a outro apresentado anteriormente. Mais especificamente, Stupien e colaboradores (2003) observaram que camundongos com lesão na CA3 do HPC como um todo não apresentaram eventuais prejuízos nas fases de aprendizagem e memória na tarefa de reconhecimento de objetos e, portanto conseguiam reconhecer o objeto velho (STUPIEN; FLORIAN; ROULLET, 2003). Da mesma maneira, Li e Chao (2008) viram que ratos com lesão na CA3 do HPC como um todo, por lesão eletrolítica, não apresentavam problemas para processar a memória de reconhecimento. Assim como Hoge e Kesner (2007) que evidenciaram que ratos com lesão por neurotoxina na CA3 do HPCd, não apresentavam problemas em detectar um novo objeto, exibindo preferência pelo objeto novo e reconhecendo o velho.

Apesar dos resultados encontrados discordarem de grande parte da literatura em relação a lesões na CA3 do HPCd ou HPC como um todo, eles complementam o trabalho de Broadbent e colaboradores (2004). Esses pesquisadores viram que ratos com lesão de quase 100% do tecido hipocampal dorsal apresentavam prejuízos em reconhecer objetos familiarizados (BROADBENT et al., 2004). A evidência de lateralização funcional destacada com maior contribuição do hemisfério direito refina esse resultado anterior da literatura, direcionando o processamento dessa memória para uma região hipocampal mais específica.

Cahn e colaboradores (1998) examinaram as contribuições do volume do lobo temporal esquerdo e direito para a memória de reconhecimento verbal e não verbal em pacientes humanos com doenças de Alzheimer, por ressonância magnética. Eles observaram que pacientes com déficit de volume de tecido da substância cinzenta do lobo temporal direito e também do HPC direito, tinham dificuldade na memória de reconhecimento facial enquanto que déficits do lado esquerdo, relacionado com o sexo dos pacientes (homem ou mulher), tinham algum envolvimento com o reconhecimento verbal (CAHN et al., 1998). Kaplan e colaboradores (1994) viram em humanos, como cada lobo temporal relaciona-se com a aquisição da memória de objetos por meio de técnica de anestesia de um dos hemisférios cerebrais. Eles observaram que o lobo temporal do lado esquerdo está mais relacionado em codificar a representação verbal de

um objeto e o hemisfério direito é crítico para a discriminação entre objetos idênticos além de ser relacionado com a memória de atributos visuais (KAPLAN et al., 1994). De certa maneira, a lateralização funcional observada em conjunto com esses outros estudos em humanos, indicam uma relação do hemisfério direito com a memória de reconhecimento visual em mamíferos.

Os resultados aqui encontrados sobre o processamento da memória de reconhecimento podem ser uma abertura para estudos mais detalhados do envolvimento da CA3 do HPCd. Ainda, o maior envolvimento da sub-região direita pode direcionar esses novos estudos e ajudar a elucidar distúrbios da memória relacionados ao envelhecimento e doenças.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo contribuem no entendimento do envolvimento da CA3 do HPCd em ratos no processamento da memória de reconhecimento, espacial e na estratégia de navegação espacial. Ao que tudo indica essa área do HPC não tem relação específica com o processamento da memória espacial na tarefa do LAM. Além disso, ela não se mostrou envolvida com a memória espacial recente e tão pouco há como afirmar seu envolvimento no processamento da memória espacial remota, apesar dos resultados terem demonstrado que não houve consolidação dessa memória.

Apesar dos dados anteriores na literatura, a sub-região também não demonstrou relação com o processamento da estratégia de navegação allocêntrica relacionada a aprendizagem por lugar no labirinto em T. No entanto, ainda no labirinto em T, a lesão, seletiva ou bilateral mostrou-se prejudicial para o processamento e evocação da memória espacial de trabalho, apesar de não ter demonstrado prejuízo aos animais na análise diária permitindo-lhes cumprir a tarefa. Dessa forma, há a sugestão de que a sub-região é importante para o processamento dessa memória, porém não é suprema e provavelmente existem conexões e outras regiões envolvidas.

Apesar disso, foi evidenciada lateralização funcional da sub-região para o processamento da memória de reconhecimento. No teste de reconhecimento ficou evidente que a CA3 do HPCd direito é fundamental para o reconhecimento a partir da familiaridade. Esse resultado pode ser preponderante para novas investigações acerca de disfunções que prejudiquem a memória de reconhecimento, como o envelhecimento e o mal de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- AGGLETON, J.P.; BROWN, M.W. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. **Behav. Brain Sci.** v. 22, p. 425–44, 1999.
- ANNETT, L.E.; MCGREGOR, A.; ROBBINS, T.W. The effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on spatial learning and extinction in the rat. **Behav Brain Res**, v. 31, n.3, p. 231-242, 1989.
- BALLEINE, B.; KILLCROSS, S. Effects of ibotenic acid lesions of the Nucleus Accumbens on instrumental action. **Behavioural Brain Research**, v. 65, p. 181-193, 1994.
- BAILEY, C.H.; BARCO, A.; HAWKINS, R.D.; KANDEL, E.R. Molecular Studies of Learning and Memory in *Aplysia* and the Hippocampus: A Comparative Analysis of Implicit and Explicit Memory Storage. In: BYRNE, J.H. (Org.). **Learning and Memory: A Comprehensive Reference**. Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 11-29.
- BANNERMAN, D.M.; GRUBB, M.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; FELDON, J.; RAWLINS, J.N.P. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v. 139, p. 197-213, 2003.
- BARRICK, T.R.; LAWES, I.N.; MACKAY, C.E.; CLARK, C.A. White Matter Pathway Asymmetry Underlies Functional Lateralization. **Cerebral Cortex**, v. 17, n. 3, p.591-598, 2007.
- BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**. 1ªed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **PNAS**, v. 101, n. 40, p. 14515 – 14520, 2004.
- BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. **Learn. Mem.**, v. 13, n. 2, p. 187-191, 2006.
- BROCA, P. Remarques sur la sieg´ de la faculte´ du langue. **Bull Soc Anat**, v. 6, p.330-357, 1861.
- BROGLIO, C. et al. Hippocampal Pallium and Map-Like Memories through Vertebrate Evolution. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v. 05, n. 03, p. 109–120, 2015.
- BROWN, M. W.; AGGLETON, J. P. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 2, p. 51–61, 2001.
- BURGESS, N. Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 10, n. 12, p. 551–557, 2006.
- CAHN, D.A.; SULLIVAN, E.V.; SHEAR, P.K.; MARSH, L.; FAMA, R.; LIM, K.O.; YESAVAGE, J.A.; TINKLENBERG, J.R.; PFEFFERBAUM, A. Structural MRI correlates of recognition memory in Alzheimer's disease. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 4, n. 2, p. 106-114, 1998.

CEMBROWSKI, M.S.; WANG, L.; SUGINO, K.; SHIELDS, B.C.; SPRUSTON, N. Hipposeq: a comprehensive RNA-seq database of gene expression in hippocampal principal neurons. **eLife**, v. 5, 2016.

CHEUNG, T.H.C.; CARDINAL, R.N. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. **BMC Neuroscience**, v.6, p. 36, 2005

CHOI, J. H.; WON, M-H. Microglia in the normally aged hippocampus. **Lab Anim Res**, v. 27, n. 3, p. 181-187, 2011.

CLARK, R.E.; BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R. Hippocampus and Remote Spatial Memory in Rats. **Hippocampus**, v. 15, p. 260–272, 2005.

CLARK, R.E.; BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R. The Hippocampus and Spatial Memory: Findings with a Novel Modification of the Water Maze. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n.25, p.6647– 6654, 2007.

COLOMBO, P.J.; BRIGHTWELL, J.J.; COUNTRYMAN, R.A. Cognitive Strategy-Specific Increases in Phosphorylated cAMP Response Element-Binding Protein and c-Fos in the Hippocampus and Dorsal Striatum. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 8, p. 3547–3554, 2003.

COMPTON, D.M. Behavior strategy learning in rat: effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. **Behavioural Processes**, v. 67, p. 335–342, 2004.

COWAN, N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? **NIH Public Access**, v. 6123, n. 7, p. 323–338, 2009.

CUI, Z.; GERFEN, C.R.; YOUNG, W.S. Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. **The Journal of Comparative Neurology | Research in Systems Neuroscience**, v. 521, p.1844–1866, 2013.

DEMAREE, H.A.; EVERHART, D.E.; YOUNGSTROM, E.A.; HARRISON, D.W. Brain lateralization of emotional processing: historical roots and a future incorporating “dominance.” **Behav Cogn Neurosci Ver**, v. 4, p. 3-20, 2005.

DIAMOND, M.C.; JOHNSON, R.E.; YOUNG, D.; SINGH, S.S. Age-related morphologic differences in the rat cerebral cortex and hippocampus: male-female; right-left. **Exp Neurol**, v. 81, p. 1-13, 1983.

DERDIKMAN, D.; KNIERIM, J.J. Introduction: A Neural Systems Approach to Space, Time, and Memory in the Hippocampal Formation. In: DERDIKMAN, D.; KNIERIM, J.J. (Org.). **Space, Time and Memory in the Hippocampal Formation**. Springer, p. 1-26, 2014.

DOMÍNGUEZ, S; REY, C.C.; THERREAU, L.; FANTON, A.; MASSOTTE, D.; VERRET, L.; PISKOROWSKI, R.A.; CHEVALEYRE, V. Maturation of PNN and ErbB4 Signaling in Area CA2 during Adolescence Underlies the Emergence of PV Interneuron Plasticity and Social Memory. **Cell Rep.**, v. 29, n. 5, 2019.

EICHENBAUM, H.; OTTO, T.; COHEN, N.J. Two functional components of the hippocampal memory system. **Behav. Brain Sci.** v. 17, p. 449–517, 1994.

EICHENBAUM, H.; YONELINAS, A.P.; RANGANATH, C. The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 30, p. 123–52, 2007.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data. **Behav. Brain Res.** v. 31, p. 47–59, 1988.

ESTEVES, A.; PRADA, I.L.S.; CARVALHO, A.F. Comparação do número de corpos neuronais de áreas do córtex cerebral de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n.5, p. 332-338, 2004.

FANSELOW, M.S.; DONG, H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n.1, p. 7-19, 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. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, n. 4, p. 552–564, 1993.

FRANK, J.; LANDEIRA- FERNANDEZ, J. Rememoração, subjetividade e as bases neurais da memória autobiográfica. **Psicologia Clínica**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.35-47, 2006.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 119–30, 2005.

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

GADES, N.M.; DANNEMAN, P.J.; WIXSON, S.K.; TOLLEY, E.A. The Magnitude and Duration of the Analgesic Effect of Morphine, Butorphanol, and Buprenorphine in Rats and Mice. **Contemporary topics Laboratory Animal Sc**, v. 39, n. 2, 2000.

GAGE, G.J.; KIPKE, D.R.; SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. **Journal of Visualized Experiments**, v. 65, p. 1-9, 2012.

GAZZANIGA, M.S.; BOGEN, J.E.; SPERRY, R.W. Observations on visual perception after disconnexion of the cerebral hemispheres in man. **Brain**, v. 88, p. 221-236, 1965.

GRECH, A. M.; NAKAMURA, J. P.; HILL, R. A. The Importance of Distinguishing Allocentric and Egocentric Search Strategies in Rodent Hippocampal-Dependent Spatial Memory Paradigms: Getting More Out of Your Data. In: STUCHLIK, A. (Org.). **The Hippocampus - Plasticity and Functions**. BoD – Books on Demand, 2018, p. 105-126.

GÜNTÜRKÜN, O. et al. Asymmetry pays: Visual lateralization improves discrimination success in pigeons. **Current Biology**, v. 10, n. 17, p. 1079–1081, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HABIB, R.; NYBERT, L.; TULVING, E. . Hemispheric asymmetries of memory: the HERA model revisited. **Trends Cogn Sci**, v. 7, p. 241-245, 2003.

HALES, J.B.; OCAMPO, A.C.; BROADBENT, N.J.; CLARK, R.E. Hippocampal Infusion of Zeta Inhibitory Peptide Impairs Recent, but Not Remote, Recognition Memory in Rats. **Neural Plasticity**, 2015.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v.18, n.3, p. 385-403, 1934.

HANNESSON, D. K.; VACCA, G.; HOWLAND, J. G.; PHILLIPS, A. G. Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. **Behavioural Brain Research**, v.153, p. 273–285, 2004.

HANSEN et al. Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the male rat **Brain Research**, v. 239, n.1, p. 213-132, 1982.

HERMIT, M. B. et al. 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.

HITTI, F.L.; SIEGELBAUM, S.A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. **Nature**, v. 508, p. 88–92, 2014.

HOCK, B.J.; BUNSEY, M.D. Differential Effects of Dorsal and Ventral Hippocampal Lesions. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 17, p. 7027-7032, 1998

HOGUE, J.; KESNER, R.P. Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, p. 225–231, 2007.

HOU, G.; YANG, X.; YUAN, T-F. Hippocampal Asymmetry: Differences in Structures and Functions. **Neurochem Res**, v. 38, p. 453–460, 2013.

IGLÓI, K.; DOELLER, C.F.; BERTHOZ, A.; RONDIREIG, L.; BURGESS, N. Lateralized human hippocampal activity predicts navigation based on sequence or place memory. **PNAS**, v. 107, n. 32, p. 14466-14471, 2010.

ILLINGWORTH, S.; BISHOP, D.V. Atypical cerebral lateralisation in adults with compensated developmental dyslexia demonstrated using functional transcranial Doppler ultrasound. **Brain Lang**, v. 111, p. 61-65, 2009.

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

KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 143, p. 169–177, 2005.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH, A.J. **Princípios de neurociências**. 5.ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KAPLAN, R. F.; MEADOWS, M.-E.; VERFAELLIE, M.; KWAN, E.; EHRENBERG, B. L.; BROMFIELD, E. B.; COHEN, R. A. Lateralization of memory for the visual attributes of objects. **Neurology**, v. 44, n. 6, p. 1069, 1994.

KAWAKAMI, R.; SHINOHARA, Y.; KATO, Y.; SUGIYAMA, H.; SHIGEMOTO, R.; ITO, I. Asymmetrical allocation of NMDA receptor epsilon2 subunits in hippocampal circuitry. **Science**, v. 300, p. 990-994, 2003.

KELES, A.I.; YILDIRIM, M.; GEDIKLI O.; C. S.; OLAKOGLU, S.; KAYA, H.; BAS, O.; SÖNMEZ, O.F.; ODACI, E. The effects of a continuous 1-h a day 900-MHz electromagnetic field applied throughout early and mid-adolescence on hippocampus morphology and learning behavior in late adolescent male rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 2018.

KERGER, H.; SALTZMAN, D. J.; GONZALES, A. et al. Microvascular oxygen delivery and intestinal oxygenation during sodium pentobarbital anesthesia. **Anesthesiology**, v.86, p.372-386, 1997.

KIRBY, E.D., JENSEN, K., GOOSENS, K.A., KAUFER, D. Stereotaxic Surgery for Excitotoxic Lesion of Specific Brain Areas in the Adult Rat. **J. Vis. Exp.**, v.65, p.1-6, 2012.

KLUR, S.; MULLER, C.; VASCONCELOS, A.P.; 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, n. 9, p. 800-816, 2009.

KOSAKI, Y.; PEARCE, J.M.; MCGREGOR, A. The response strategy and the place strategy in a plus-maze have different sensitivities to devaluation of expected outcome. **Hippocampus**, v. 28, p. 484-496, 2018.

KOUVAROS, P.; PAPATHEODOROPOULOS, C. Prominent differences in sharp waves, ripples and complex spike bursts between the dorsal and the ventral rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 352, p. 131-143, 2017.

LANGSTON, R.F.; STEVENSON, C.H.; WILSON, C.L.; SAUNDERS, I.; WOOD, E.R. The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. **Behav Brain Res**, v. 215, n.2, p. 275-291, 2010.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531-2537, 2013.

LI, J.S.; CHAO, Y-S. Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, p. 192-198, 2008.

LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. **J. Psychol. Neurol.** v. 46, p. 113-177, 1934.

MANDLER, G. Recognizing: the judgment of previous occurrence. **Psychol.**, v. 87, p. 252–271, 1980.

MARKOWSKA, A.; BAKKE, H.K.; WALTHER, B. URSIN, H. Comparison of Electrolytic and Ibotenic Acid Lesions in the Lateral Hypothalamus. **Brain Research**, v. 328, p. 313–323, 1985.

MARKOWSKA, A.; LUKASZEWSKA, I. Open-field behavior in rats with frontomedial cortical, neostriatal or hippocampal lesions. **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 41, p. 197–210, 1981.

MCDONALD, R. J.; WHITE, N. M. Parallel information processing in the water maze: Evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. **Behavioral Neural of Biology**, v. 61, p. 260–270, 1994.

MCGREW, W. C.; MARCHANT, L. F. Laterality of hand use pays off in foraging success for wild chimpanzees. **Primates**, v. 40, n. 3, p. 509–513, 1999.

MORENO-CASTILLA, P.; GUZMAN-RAMOS, K.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Object Recognition and Object Location Recognition Memory – The Role of Dopamine and Noradrenaline. In: ENNACEUR, A.; SILVA, M.A. de S. (Org.). **Handbook of Behavioral Neuroscience**. San Diego: Elsevier, 2018, p. 403–413.

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

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

MORRIS, R.G.M.; SCHENK, F.; TWEEDIE, F.; JARRARD, L.E. Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. **Eur J Neurosci.**, v.2, n.12, p. 1016–1028, 1990.

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. **Learn Mem.**v. 9, p. 49–57, 2002.

NORMAN, K.A. How hippocampus and cortex contribute to recognition memory: Revisiting the Complementary Learning Systems model. **Hippocampus**, v. 20, n.11, p. 1217–1227, 2010.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The Hippocampus as a Cognitive Map**. Oxford: Clarendon Press, 1978.

OVALLE, W.K.; NAHIRNEY, P.C. **Netter bases da histologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

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, n. 22, p. 12881–6, 26 out. 1999.

PACKARD, M. G.; MCGAUGH, J. L. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 65, n.1, 65–72, 1996.

PASCUAL, A.; HUANG, K.L.; NEVEU, J.; PRÉAT, T. Brain asymmetry and long-term memory. **Nature**, v. 427, p. 605–606, 2004.

PAUL, C.-M.; GIORDANO, M.; SANTAMARÍA, A. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. **Behavioural Brain Research**, v.203, p.151–164, nov. 2009.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6° edição ed. New York: Academic Press, 1986.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. **Access Online via Elsevier**, 2006.

PIERCE, R.C.; REEDER, D.C.; HICKS, J.; MORGAN, Z.R.; KALIVAS, P.W. Ibotenic acid lesions of the dorsal prefrontal cortex disrupt the expression of behavioral sensitization to cocaine. **Neuroscience**, v. 82, n. 4, p. 1103–1114, 1998.

POE, G.R.; TEED, R.G.W.; INSEL, N.; WHITE, R.; McNAUGHTON, B.L.; BARNES, C.A. Partial Hippocampal Inactivation: Effects on Spatial Memory Performance in Aged and Young Rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 5, p. 940-949, 2000.

POTHUIZEN, H.H.; ZHANG, W.N.; JONGEN-RELO, A.L.; FELDON, 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. **Eur J Neurosci**. v. 19, p. 705–712, 2004.

POTVIN, O.; ALLEN, K.; THIBAUDEAU, G.; DORE', F.Y.; GOULET, S. Performance on Spatial Working Memory Tasks After Dorsal or Ventral Hippocampal Lesions and Adjacent Damage to the Subiculum. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 2, 413–422, 2006.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p. 3–33, 2003.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.I.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A-S.; MCNAMARA, J.O.; WHITE, L.E. **Neuroscience**. 4th ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, 2008.

RAINS, D.G. Sistemas de memoria. In: _____. (Org.). **Principios de neuropsicología humana**. 1 ed. Mexico: Mc Graw Hill, 2004. p. 241–86.

RESCORLA, R.A.; HOLLAND, P.C. Behavioral studies of associative learning in animals. **Annual Review of Psychology**, v. 33, p. 265-308, 1982.

RIAZ, S.; SCHUMACHER, A.; SIVAGURUNATHAN, S.; VAN DER MEER, M.; ITO, R. Ventral, but not dorsal, hippocampus inactivation impairs reward memory expression

and retrieval in contexts defined by proximal cues. **Hippocampus**, v. 27, p. 822–836, 2017.

ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J.; MARSTON, H.M.; WILKINSON, J.; JONES, G.H.; K.J. Comparative effects of ibotenic acid- and quisqualic acid-induced lesions of the substantia innominata on attentional function in the rat" further implications for the role of the cholinergic neurons of the nucleus basalis in cognitive processes. **Behavioural Brain Research**, v. 35, p. 221-240, 1989.

RODGERS, L. Advantages and disadvantages of lateralization. In: RODGERS, L.; ANDREW, R. J. (Eds.). **Comparative vertebrate lateralization**. 1^aed. Cambridge: Cambridge University Press. p. 126–153, 2002.

ROGERS, L. J.; ZUCCA, P.; VALLORTIGARA, G. Advantages of having a lateralized brain. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 271, n. 6, p. 420-2, 2004.

ROSSATO, J. I., BEVILAQUA, L. R.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. **Learning & Memory**, v. 13, p. 431-440, 2006.

SALAS, C.; BROGLIO, C.; DURÁN, E.; GÓMEZ, A.; OCAÑA, F.M.; JIMÉNEZ-MOYA, F.; RODRÍGUEZ, F. Neuropsychology of Learning and Memory in Teleost Fish. **Mary Ann Liebert Inc**, v.3, n.2, p. 157-171. 2006.

SANTIAGO, R.M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M.M.S; DOMBROWSKI, P.A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A.B.F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 1104–1114, 2010.

SARAMAGO, J. **O caderno**. 1^aed. Editora Companhia das Letras, 224 p., 2009.

SCHWARCZ, R.; HOKFELT, T.; FUXE, K.; JONSSON, G.; GOLDSTEIN, M.; TERENIUS, L. Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: A morphological and neurochemical study. **Experimental Brain Research**, v. 37, n. 2, p. 199–216, 1979.

SEKINO, Y., OBATA, K., TANIFUJI, M., MIZUNO, M. & MURAYAMA, J. Delayed signal propagation via CA2 in rat hippocampal slices revealed by optical recording. **J. Neurophysiol.**, v. 78, p. 1662–1668, 1997.

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sciences**, v.87, p.521-536, sep. 2010.

SHINOHARA, Y.; HOSOYA, A.; YAHAGI, K.; FERECSCO, A.S.; YAGUCHI, K.; SI'K, A.; ITAKURA, M.; TAKAHASHI, M.; HIRASE, H. Hippocampal CA3 and CA2 have distinct bilateral innervation patterns to CA1 in rodents. **European Journal of Neurosc**, v. 35, p. 702-710, 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. **PNAS**, v.111, n.42, p. 15238-15243, 2014.

SVENDEN, P.; CARTER, A.M. Influence of injectable anaesthetic combinations on blood gas tensions and acid-base status in laboratory rats. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.57, p.1-7, 1985.

STUPIEN, G.; FLORIAN, E.; ROULLET, P. Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, p. 32–41, 2003.

SWEATT, J.D. Hippocampal function in cognition. **Psychopharmacology (Berl)**, V. 174, n.1, p. 99-110, 2004.

THOMAS, M.; WOODGATE, D. Effect of Atropine on Bradycardia and Hypotension in Acute myocardial infarction. **Brit. Heart J.**, v. 28, p. 409-413, 1966.

THOMPSON, W. G.; GUILFORD, M. O.; HICKS, L. H. Effects of caudate and cortical lesions on place and response learning in rats. **Physiol. Psychol.** v. 8, p. 473–479, 1980.

TULVIN, E. Multiple memory systems and consciousness. **Hum. Neurobiol**, v. 6, p. 67-80, 1987.

TZAKIS, N.; HOLAHAN, M.R. Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. **Front Behav Neurosci.** v. 13, p. 233, 2019.

VANGUILDER, H.D.; FREEMAN, W.M. The hippocampal neuroproteome with aging and cognitive decline: past progress and future directions. **Front Aging Neurosci**, v. 3, n. 8, 2011.

WAGA, I.C. **Memória relacional espacial e não-espacial associada ao forrageamento em macacos-prego (*Cebus spp.*) mantidos em cativeiro.** 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

WIENER, J.; SHETTLEWORTH, S.J.; BINGMAN, V.P.; CHENG, K.; HEALY, S.D.; JACOBS, L.F.; JEFFERY, K.J.; MALLOT, H.A.; MENZEL, R.; NEWCOMBE, N.S. Animal Navigation – A Synthesis. In: MENZEL, R.; FISHER, J. (Org.). **Animal Thinking**. Cambridge: MIT Press, 2011. p. 1-33.

WITTER, M. P.; AMARAL, D. G. Hippocampal Formation. In: PAXINOS, G. (Org.). **The Rat Nervous System**. Elsevier Inc., p. 635-704, 2004.

WOLBERS, T.; HEGARTY, M. What determines our navigational abilities? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 14, n. 3, p. 138–146, 2010.

WOOLARD, A.A.; HECKERS, S. Anatomical and functional correlates of human hippocampal volume asymmetry. **Psychiatry Res**, v. 201, p. 48–53, 2012.

Apêndice A - Protocolo de coloração das lâminas histológicas. Adaptado de Esteves e colaboradores (2004).

Coloração de Nissl – Cresil Violeta

Cresil violeta pó 0,1g
 Água destilada.....100ml
 Ácido acético glacial.....10 gotas (0,3ml)
 Misturar bem e filtrar.

Procedimento:

- Desparafinar os cortes em banhos de xilol por 10 minutos.
- Hidratação dos cortes em álcool absoluto I e II, álcool 95%, álcool 70% e álcool 50% por 1 minuto cada.
- Enxaguar em água destilada rapidamente.
- Aquecer o cresil violeta em estufa a 60°C por 10 minutos, na cuba onde serão colocadas as lâminas.
- Colocar poucas lâminas de cada vez (5 no máximo) no corante de 10 a 20 minutos (observar a coloração adequada).

Para diferenciação e montagem:

- Álcool 95% com 6 gotas de ácido acético: colocar as lâminas para diferenciação da cor, 5 a 10 segundos ou até alcançar a cor adequada. Olhar em microscópio. Este processo deve ser rápido para não ressecar os cortes. Não descorar demais nesta etapa porque haverá descoloração nas próximas etapas.
- Álcool 95% puro: deixar as lâminas por alguns segundos observando sempre a coloração.
- Álcool 100% 3 vezes: para desidratar. Mesmo procedimento e cuidado que o anterior.

Os próximos passos devem ser realizados na capela:

- Levar a última cuba de álcool 100% para capela para montagem da lâmina.
- Secar bem a lâmina com papel absorvente, sem esfregar e colocar na cuba com xilol. Deixar poucos segundos para não desidratar demais. Passar sempre uma lâmina de cada vez para o xilol, as demais deixar no álcool. Usar Bálsamo do Canadá para confecção final das lâminas. Pingar de 2 a 3 gotas sobre a lâmina e montar com lamínula. Deixar secar por 2 a 3 dias.