

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências

**EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL  
TRANSITÓRIA SOBRE O APRENDIZADO, A  
MEMÓRIA DE TRABALHO E A EXTINÇÃO DE  
TAREFAS ESPACIAIS NO LABIRINTO AQUÁTICO  
DE MORRIS**

Luciano Palmeiro Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre, 2001

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências

**EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL  
TRANSITÓRIA SOBRE O APRENDIZADO, A  
MEMÓRIA DE TRABALHO E A EXTINÇÃO DE  
TAREFAS ESPACIAIS NO LABIRINTO AQUÁTICO  
DE MORRIS**

Dissertação de Mestrado

Luciano Palmeiro Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre, 2001

“Que a felicidade não dependa da época, nem da paisagem, nem da sorte, nem do dinheiro. Que ela possa vir com toda a simplicidade de dentro para fora, de cada um para todos.

(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho a minha esposa  
pela fundamental companhia neste  
importante período.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos Alexandre Netto pela oportunidade, atenção dispensada, carinho e amizade, com quem aprendi a fazer ciência e a quem terei sempre como exemplo de professor.

Ao curso de Pós-graduação em Neurociências, pela oportunidade enquanto aluno e aos professores do curso, pela troca de experiências.

À professora Matilde Achaval, pela acolhida no laboratório e pelos ensinamentos.

Às colegas Nice, Ionara, Analú, Verônica, Nara e Denise pela ajuda valiosa em vários momentos desta dissertação.

Ao colega Léder pela importante colaboração.

Aos bolsistas do laboratório 32 (Bioquímica) pela colaboração.

À Universidade Luterana do Brasil pelo auxílio.

Aos meus pais, meus primeiros incentivadores.

À minha esposa, minha grande companheira.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Isquemia cerebral.....	1
1.1.1 <i>Lesão hipocampal</i> .....	4
1.1.2 <i>Déficits cognitivos</i> .....	13
1.2 Extinção do comportamento.....	21
1.3 Hipótese e objetivos.....	27
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 Desenho experimental.....	28
2.2 Isquemia.....	29
2.3 Estudos comportamentais.....	31
2.4 Perfusão e histologia.....	39
2.5 Análise volumétrica.....	41
2.6 Análise estatística.....	43
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
3.1 Experimento 1.....	44
3.1.1 <i>Fase de Aquisição I</i> .....	44

3.1.2 Fase de Aquisição II.....	47
3.1.3 Fase de Aquisição III.....	50
3.1.4 Fase de Aquisição IV.....	52
3.2 Experimento 2.....	53
3.2.1 Fase de Aquisição I.....	53
3.2.2 Fase de Aquisição II.....	56
3.2.3 Fase de Aquisição III.....	58
3.3 Análise volumétrica.....	59
<b>4.6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
4.1 Testes comportamentais.....	64
4.2 Volume do ca1 do hipocampo.....	79
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos animais do experimento 2 .....	36
Figura 1 -Diagrama esquemático das sub-regiões e estratificação laminar do hipocampo esquerdo. Anatomia típica das células de CA1, CA3 e das células granulosas do giro denteado.....	5
Figura 2 - Fotomicrografia de cérebro de rato adulto delimitando esquematicamente a região do hipocampo de um hemisfério cerebral. CA1, subcampo 1 do corno de Ammon;CA2, subcampo 2 do corno de Ammon; CA3, subcampo do corno de Ammon; GD, giro denteado; H, hilo do giro denteado. Barra de calibração= 50µm.....	6
Figura 3 - Esquema mostrando o método de oclusão dos 4 vasos (4VO).....	31
Figura 4- Esquema mostrando o Labirinto Aquático, os quadrantes e os pontos de saída.....	32
Figura 5 - Esquema mostrando a sala do Labirinto Aquático de Morris.....	35
Figura 6- Esquema mostrando os locais da plataforma durante cada Fase de Aquisição do experimento 1.....	36
Figura 7- Locais da plataforma nas Fases de Aquisição do experimento 2.....	38
Figura 8 - Médias das latências durante a Fase de Aquisição 1 do.Experimento I, no labirinto aquático.....	45



Figura 9- Média ( $\pm$ erro padrão) do tempo gasto no quadrante alvo, nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição I do experimento 1, no labirinto aquático.....	46
Figura 10- Média ( $\pm$ erro padrão) dos cruzamentos no local da plataforma nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição I do experimento 1, no labirinto aquático.....	47
Figura 11- Médias das latências para encontrar a plataforma durante a Fase de Aquisição II do experimento I, no labirinto aquático.....	48
Figura 12- Média ( $\pm$ erro padrão) do tempo gasto no quadrante-alvo nos testes 1 e 2, após a fase de Aquisição II do experimento I, no labirinto aquático.....	49
Figura 13- Médias ( $\pm$ erro padrão) dos cruzamentos no local da plataforma nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição II do experimento I, no labirinto aquático.....	49
Figura 14- Média das latências para encontrar a plataforma durante a Fase de Aquisição III do experimento I, no labirinto aquático.....	50
Figura 15- Média ( $\pm$ erro padrão) do tempo gasto no quadrante alvo nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição III do experimento I, no labirinto aquático.....	51
Figura 16- Média ( $\pm$ erro padrão) dos cruzamentos no local da plataforma após a Fase de Aquisição III do experimento I, no labirinto aquático.....	52
Figura 17 – Média ( $\pm$ erro padrão) das latências para encontrar a plataforma durante a Fase de Aquisição IV do experimento I, no labirinto aquático.....	52
Figura 18- Media das latências para encontrar a plataforma na Fase de Aquisição I do experimento 2, no labirinto aquático.....	54
Figura 19- Média ( $\pm$ erro padrão) do tempo gasto no quadrante alvo, nos teste 1 e 2, após a Fase de Aquisição I do experimento 2, no labirinto aquático.....	55
Figura 20- Média ( $\pm$ erro padrão) dos cruzamentos nos teste 1 e 2, após a Fase de Aquisição I do experimento 2, no labirinto aquático.....	55
Figura 21- Latência para encontrar a plataforma na Fase de Aquisição II do experimento II, no labirinto aquático.....	56

Figura 22- Média do tempo ( $\pm$ erro padrão) gasto no quadrante alvo, nos teste 1 e 2, após a Fase de Aquisição II do experimento II, no labirinto aquático.....	57
Figura 23- Média ( $\pm$ erro padrão) dos cruzamentos no teste 1 e 2, após a Fase de Aquisição II do experimento II, no labirinto aquático.....	57
Figura 24 – Média ( $\pm$ erro padrão) das latências para encontrar a plataforma em diferentes locais a cada dia durante a Fase de aquisição III do experimento 2, no labirinto aquático.....	58
Figura 25 A- Fotomicrografia da camada piramidal da região do CA1 do hipocampo de animais do grupo controle. Observar que não houve alteração no volume desta região. Barra de calibração= 100 $\mu$ m.....	60
Figura 25 B- Fotomicrografia da camada piramidal da região do CA1 do hipocampo de animais do grupo controle cirúrgico. Observar que não houve alteração no volume desta região. Barra de calibração= 100 $\mu$ m.....	60
Figura 25 C- Fotomicrografia da camada piramidal da região do CA1 do hipocampo de animais do isquêmico 10 minutos. Observar que houve redução do volume desta região. Barra de calibração= 100 $\mu$ m.....	61
Figura 25 D- Fotomicrografia da camada piramidal da região do CA1 o hipocampo de animais do grupo isquêmico 20 minutos. Observar que houve redução significativa do volume desta região. Barra de calibração= 100 $\mu$ m .....	61
Figura 26 – Volume da região do CA1 do hipocampo nos animais do experimento II.....	62

## RESUMO

A isquemia cerebral global transitória ocorre quando o aporte sanguíneo do cérebro é substancialm e transitoriamente interrompido por vários minutos, resultando numa insidiosa e seletiva morte de neurônios piramidais do subcampo CA1 do corno de Ammon do hipocampo.

O hipocampo tem importante função no aprendizado e memória espacial, portanto o dano isquêmico em ratos levará a conseqüências comportamentais observadas em tarefas espaciais no labirinto aquático de Morris, havendo correlação entre a extensão da lesão hipocampal e o comprometimento cognitivo.

Sabendo que a lesão isquêmica no hipocampo produzirá déficit cognitivo traduzido pela dificuldade do rato de aprender, lembrar e ir para um lugar definido no espaço e, que esta lesão influenciará a capacidade destes animais de extinguirem uma tarefa anteriormente aprendida induzindo a uma resistência à extinção, o presente trabalho teve como objetivo verificar o aprendizado, a evocação e a resistência à extinção de tarefas espaciais em ratos isquêmicos submetidos à isquemia por 10 e 20 minutos.

Ratos Wistar com 3 meses de idade foram submetidos a isquemia global por oclusão dos 4 vasos (4VO). No primeiro experimento, os animais foram divididos em grupo controle e grupo isquêmico 10 minutos. No segundo experimento os animais foram divididos em grupo controle, grupo controle cirúrgico, grupo isquêmico 10 minutos e grupo isquêmico 20 minutos. Os animais foram submetidos a

testes comportamentais com fases de aquisição no labirinto aquático onde a plataforma era localizada em diferentes posições a cada fase. Ao final das fases de aquisição, os animais foram submetidos a sessões de teste, com dois testes: um para avaliar a retenção da tarefa e outro para examinar a resistência à extinção.

Após os testes comportamentais, os ratos foram sacrificados e os encéfalos perfundidos e preparados para análise volumétrica da camada piramidal de CA1 do hipocampo pelo princípio de Cavalieri.

Os resultados comportamentais demonstraram que os animais isquêmicos apresentaram um déficit no aprendizado espacial, demonstrado pelas latências maiores para localizar a plataforma durante as fases de aquisição, tanto no experimento 1 quanto no experimento 2. Quanto a extinção de tarefas, os animais isquêmicos 10 minutos apresentaram resistência à extinção com diferença significativa em relação aos animais controle. Os animais isquêmicos 20 minutos apresentaram apenas uma tendência à resistência à extinção.

Na análise volumétrica, constatou-se uma redução significativa do volume da camada piramidal do CA1 do hipocampo nos animais isquêmicos submetidos à isquemia global, redução esta que foi mais importante nos animais isquêmicos 20 minutos.

Nossos resultados confirmam nossa hipótese de que a isquemia cerebral global transitória causa lesão no setor CA1 do hipocampo provocando déficits no aprendizado espacial e resistência à extinção da tarefa no labirinto aquático, sendo esta resistência mais evidente nos animais isquêmicos 10 minutos.

# INTRODUÇÃO

## 1. ISQUEMIA CEREBRAL

O cérebro é um órgão que depende do suprimento de oxigênio e de glicose para a fosforilação oxidativa. Estes substratos são utilizados para manter, entre outros, os gradientes iônicos dos neurônios e células gliais e para manter a neurotransmissão glutamatérgica. Se o suprimento sanguíneo cerebral é interrompido por um embolismo dos vasos intracerebrais ou trombose local, o infarto cerebral se desenvolve. Com a obstrução completa destes vasos, os sintomas clínicos se desenvolvem rapidamente configurando um acidente vascular cerebral (AVC) (WITTE et al, 2000).

O acidente vascular cerebral, seguindo o infarto do miocárdio e o câncer, é a terceira causa de morbidade e mortalidade nos países ocidentais. Cerca de 85 % dos pacientes com AVC sofreram uma isquemia cerebral (WHITALL et al, 2000; WILLIAMS e JIANG, 2000).

Em 25 a 40% dos pacientes com AVC isquêmico, os sintomas neurológicos progridem nas primeiras horas (VILA et al, 2000). O AVC é a causa mais comum de incapacidade permanente nos Estados Unidos e está associado com alta incidência de déficits motores, sensoriais e cognitivos (WHITALL et al, 2000).

A isquemia é definida como um bloqueio temporário ou uma redução do fluxo sanguíneo, para um órgão, tecido ou grupamento celular (GINSBERG, 1997). A isquemia provoca diferentes conseqüências que variam de acordo com sua severidade e com a resistência que o tecido apresenta a este insulto. Em ambas situações verifica-se grande amplitude de respostas, que variam desde adaptações transitórias até estados patológicos que podem levar a morte (KATO et al, 1994).

A isquemia cerebral global acontece quando o suprimento sanguíneo do cérebro é substancialmente, porém transitoriamente, interrompido por vários minutos. A parada cardíaca é o exemplo clínico mais comum de uma isquemia cerebral seguida de recuperação em humanos (BARTUS et al, 1998; COLBOURNE et al, 1998).

Déficits neuropsicológicos podem resultar da hipóxia durante uma parada cardíaca levando a interferência na recuperação dos pacientes e afetando-os nas suas atividades de vida diária ao retornarem para suas casas. Estudos que avaliam a função cognitiva dos sobreviventes após uma parada cardíaca observaram prejuízo cognitivo em 20 a 50 % dos casos (GRUBB et al, 2000).

A interrupção do fluxo sanguíneo cerebral após uma parada cardíaca resulta em moderada ou profunda perda da memória anterógrada. Um prejuízo na habilidade de aprender novas informações é visto em 20 a 40 % dos pacientes que sobrevivem a uma parada cardíaca e, nestes pacientes, um exame após a morte identificou lesões no hipocampo junto com lesões em varias outras regiões cerebrais, sugerindo que a patologia hipocampal pode estar relacionada com a perda de memória (BLOCK e SCHWARZ, 1998). Este prejuízo cognitivo tem sido observado em indivíduos com déficit na memória associado à lesão hipocampal localizada. A degeneração específica dos neurônios CA1 hipocampais está associado com amnésia anterógrada após parada cardíaca em humanos (GRUBB et al, 2000).

A isquemia cerebral global transitória é produzida em ratos quando se oclui as grandes artérias que suprem ambos hemisférios cerebrais por 5 ou 20 minutos. Quanto maior o tempo de oclusão das artérias cerebrais, maior a severidade da isquemia que resultará em uma insidiosa e seletiva morte de neurônios cerebrais piramidais do subcampo CA1 do Corno de Ammon do hipocampo (HSU et al, 1998). Esta morte seletiva pode também ser observada em humanos que sofreram uma isquemia cerebral global devido a uma parada cardíaca (BARTUS et al, 1998).

No sistema nervoso do rato, estas células piramidais são as mais sensíveis à isquemia, seguidas pelas células da 3ª e 5ª camadas corticais, estriado, septo, CA3, tálamo, corpo geniculado medial e substância negra respectivamente

(KOGURE e KATO, 1993). Contudo, outros grupos de neurônios como as células granulares do giro denteado, possuem resistência ao insulto isquêmico (SCHMIDT-KASTNER e FREUND, 1991). Este fato é chamado de vulnerabilidade seletiva para a isquemia (DIXON, 1965).

A vulnerabilidade à isquemia cerebral varia grandemente entre as diferentes regiões do sistema nervoso central. Assim, diferentes populações de neurônios no cérebro, mostram diferente susceptibilidade ao insulto isquêmico (GAO et al, 1998). Em animais submetidos a uma isquemia transitória observou-se que três a sete dias após esta isquemia, os neurônios piramidais do CA1 do hipocampo morrem, porém os neurônios do CA3 e células granulares do giro denteado parecem não sofrer dano (PULSINELLI et al, 1982).

## **1.1 LESÃO HIPOCAMPAL**

O hipocampo é uma estrutura allocortical (por possuir menos de seis camadas) do tipo arquicortical (por apresentar uma camada de células piramidais e duas camadas plexiformes), conforme demonstrado na figura 1. A camada piramidal concentra os corpos das células piramidais e as camadas plexiformes apresentam neuropilo, que é uma densa rede de axônios e dendritos onde ocorre a maioria das sinapses (MESULAM, 1985; PETERS et al, 1991; GLOOR, 1997).



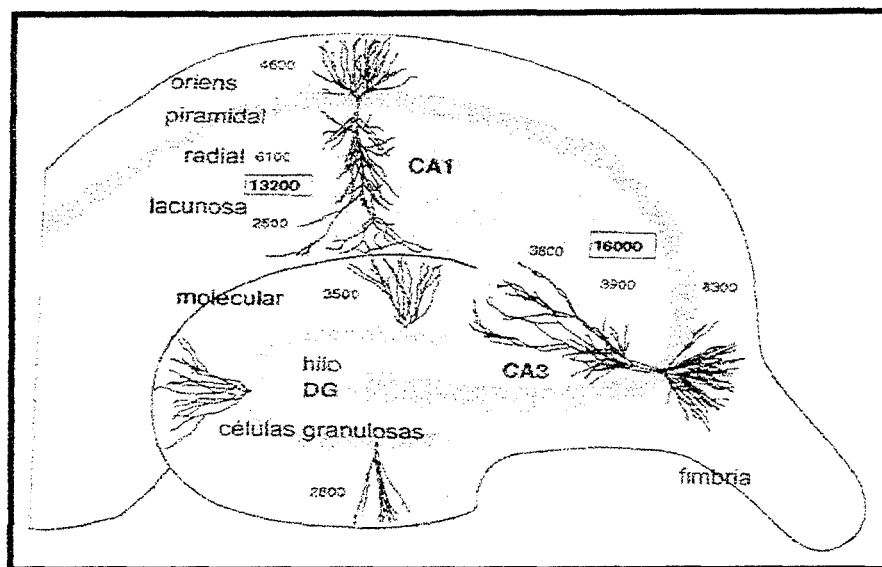


Figura 1 – Diagrama esquemático das sub-regiões e estratificação laminar do hipocampo esquerdo. Anatomia típica das células de CA1, CA3 e das células granulosas do giro denteado (Modificado de AMARAL e WITTER, 1995).

No rato, o hipocampo corresponde a 1/3 do tamanho do cérebro possuindo a forma de uma letra cê, quando observado no plano sagital (figura 2), exibindo um pólo dorsal também chamado de septal e outro pólo ventral, também chamado de caudal ou temporal (AMARAL e WITTER, 1995). Fazem parte da estrutura do hipocampo, o corno de Ammon (hipocampo propriamente dito) e o giro denteado com o hilo (LORENTE DE NÓ, 1935; GLOOR, 1997).

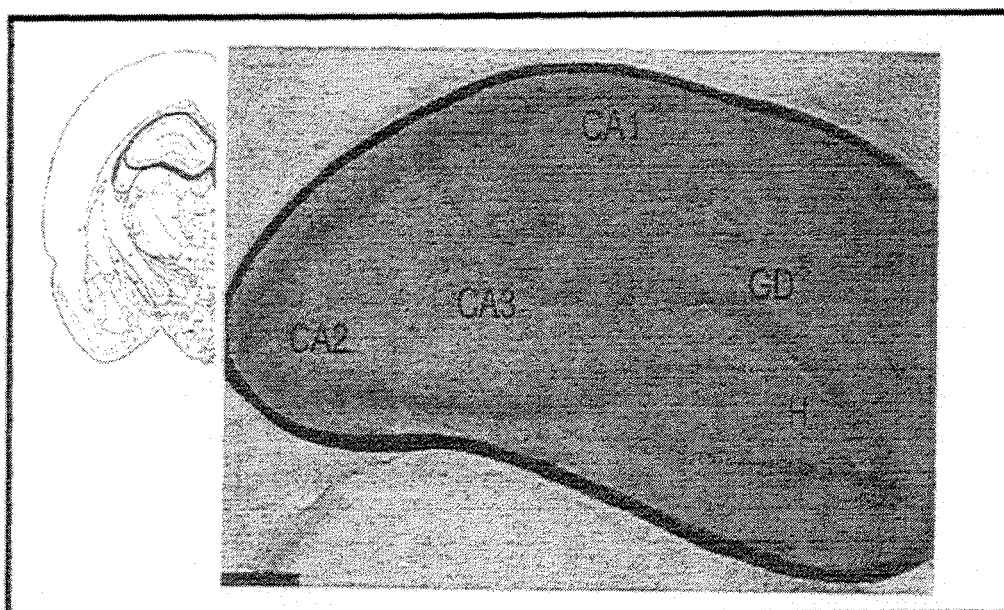


Figura 2 – Fotomicrografia de cérebro de rato adulto delimitando esquematicamente a região do hipocampo de um hemisfério cerebral. CA1, subcampo 1 do corno de Ammon; CA2, subcampo 2 do corno de Ammon; CA3, subcampo 3 do corno de Ammon; GD, giro denteado; H, hilo do giro denteado. Barra de calibração= 50  $\mu\text{m}$ .

O hipocampo desempenha uma função central no processamento do aprendizado e da memória espacial e está envolvido no processamento de memória de trabalho, de curta duração e intermediária (MORRIS et al, 1982; ZOLA-MORGAN e SQUIRE, 1986; ZOLA-MORGAN et al, 1992; NETTO et al, 1993; SAVE e POU CET, 2000; CHAN et al, 2001; MITSUSHIMA et al, 2001; NAGHDI et al, 2001). Esta estrutura, que integra a aquisição e processamento da memória e aprendizado, contém uma das mais sensíveis, bem como uma das mais resistentes populações de neurônios à isquemia global. Os neurônios piramidais do subcampo do CA1 do

hipocampo são uma população de neurônios altamente vulneráveis, entretanto as células granulares do giro denteado são neurônios primariamente resistentes a isquemia global (HSU et al, 1998).

Aproximadamente 24 a 48 horas após a isquemia, o acúmulo de perturbações metabólicas compromete significativamente a função e integridade dos neurônios piramidais no CA1 do hipocampo. Em menor extensão, a isquemia cerebral global transitória atinge um número indeterminado de neurônios em sub-regiões do neocórtex, tálamo e estriado (BARTUS et al, 1998).

Esta alteração das células piramidais hipocampais aparece inicialmente após uma isquemia transitória do prosencéfalo e o volume de lesão neuronal do hipocampo pode ser influenciado pelos glicocorticóides, pois o hipocampo contém uma das mais altas densidades de receptores de glicocorticóides no cérebro (ANTONAWICH et al, 1999).

A isquemia global leva a uma cascata de processos fisiopatológicos que contribuem para lesão celular isquêmica. Durante o período isquêmico há uma liberação maciça de aminoácidos excitatórios, uma sobrecarga de cálcio intracelular e aumento de radicais livres que caracterizam a fase excitotóxica. A fase inflamatória também está presente após a isquemia, sendo caracterizada pela migração de neutrófilos e leucócitos para o tecido, ativação de células gliais e liberação de

substâncias citotóxicas. A apoptose, presente no período após a isquemia, envolve mudanças apoptóticas observadas nos neurônios CA1 no terceiro ou quarto dia após o insulto isquêmico (BLOCK, 1999). Estes processos fisiopatológicos iniciam-se após um intervalo do começo da isquemia e apresentam diferentes durações (BLOCK et al, 2001).

A hipótese excitotóxica da morte neuronal isquêmica está baseada nos efeitos neurotóxicos da alta concentração extracelular de glutamato liberado como resultado do aumento da atividade sináptica excitatória e relacionada com o influxo de cálcio para dentro da célula nervosa (KRISTIAN e SIESJÖ, 1998; GERASIMOV et al, 2001). Portanto, o íon cálcio é considerado um importante mediador da lesão cerebral isquêmica (KURODA et al, 1997). O evento isquêmico causa liberação de uma quantidade excessiva de neurotransmissores excitatórios no cérebro, que ativam receptores pós-sinápticos e canais de íons levando a esta elevação do cálcio intracelular. A homeostase do cálcio é comprometida entre 18 a 24 horas após a isquemia, o mesmo período em que ocorre o declínio na transmissão monossináptica dos neurônios piramidais no CA1 (BARTUS et al, 1998).

Logo após ocorrer a perturbação isquêmica, um rápido acúmulo de glutamato e aspartato ocorre no espaço intersticial do tecido cerebral isquêmico. A ativação mantida do receptor de glutamato é acompanhada por um aumento no cálcio citosólico, que sinaliza vários processos cálcio dependentes dentro da célula

piramidal. Ocorre também um aumento na amplitude dos potenciais sinápticos do CA1, indicando uma mudança no estado funcional dos neurônios piramidais, apesar de nenhuma evidencia de mudança morfológica (BARTUS et al, 1998; MARTIN et al, 2000).

Algumas evidências de lesão morfológica das células piramidais do CA1 já são vistas antes das primeiras 48 horas. A elevação do cálcio citosólico é responsável pela proteólise da calpaína e degradação de proteínas observadas durante este período crucial. Nas 48 horas após a isquemia, os neurônios piramidais tornam-se quase que não responsivos a estimulação aferente. A partir destas 48 horas, as lesões acumulam-se, contribuindo para a desintegração das células piramidais. Este acúmulo de perturbações neuronais compromete significativamente a função e a integridade dos neurônios piramidais no CA1 do hipocampo levando estes neurônios à morte nas próximas 24 a 48 horas (BARTUS et al, 1998).

A função neuronal é prejudicada imediatamente após o fluxo sanguíneo ser interrompido, porém, o desenvolvimento da lesão morfológica irreversível é dependente do tempo. Uma vez que a lesão morfológica torna-se aparente, o déficit funcional reversível inicialmente, desenvolve-se como um dano persistente (HEISS, 2000).

A isquemia global afeta a capacidade sensório-motora somente por 24 a 48 horas do insulto isquêmico, entretanto, os déficits no aprendizado e na memória são de longa duração levando a conseqüências comportamentais observadas principalmente em tarefas que examinam o aprendizado e a memória (BLOCK, 1999), confirmando a idéia de que existe uma relação entre a lesão hipocampal provocada por uma isquemia cerebral global e o déficit no aprendizado espacial (NETTO et al, 1993; BLOCK e SCHWARZ, 1997, CHAN et al., 2001).

Para reproduzir as diversas condições de isquemia humana e para o estudo da recuperação funcional após o AVC, vários modelos de isquemia em roedores têm sido utilizados para examinar os déficits sensório-motores e cognitivos em ratos (ARONOWSKI et al, 1996). Na oclusão transitória da artéria cerebral média, que reproduz o AVC focal em roedores, foi observada uma rápida recuperação motora espontânea nestes animais, porém o déficit na função cognitiva permaneceu estável (HATTORI et al, 2000).

Modelos animais de isquemia cerebral global transitória são produzidos pela oclusão, de 5 a 20 minutos, das grandes artérias, como as vertebrais e carótidas, que suprem os hemisférios cerebrais. Os modelos de isquemia global permitem assim, o estudo individualizado de populações de neurônios vulneráveis, pois é possível controlar a severidade da isquemia de acordo com o tempo de oclusão destas artérias. O dano isquêmico de 5-10 minutos é seletivo para os neurônios

piramidais de CA1 e algumas células do hilo do hipocampo. A isquemia provocada por 15-20 minutos de oclusão também inclui os neurônios de médio tamanho do estriado (PULSINELLI et al, 1982; MATSUYAMA et al, 1993; SUGIMOTO et al, 1993; BARTUS et al, 1998).

Um dos modelos de isquemia muito utilizado em estudos para induzir isquemia em ratos, é o de oclusão dos quatro vasos (Modelo 4VO) que foi desenvolvido por PULSINELLI e BRIERLEY em 1979. Neste modelo, as artérias vertebrais são permanentemente ocluídas e as carótidas são clampeadas por 10 a 30 minutos (PULSINELLI et al, 1982), produzindo lesão das células do CA1 do hipocampo dorsal associada com déficits na memória e aprendizado. Estas conseqüências da interrupção do fluxo sanguíneo cerebral em ratos provocadas por modelos de isquemia são semelhantes às conseqüências de uma isquemia cerebral no homem (NETTO et al, 1993).

A duração da isquemia por cerca de 10 minutos no rato é suficiente para induzir lesão hipocampal. O aumento do tempo de isquemia para 15 minutos produz também lesão seletiva em CA1 do hipocampo com uma perda de células piramidais estimadas em 80 a 85 % na região dorsal do CA1, 10 a 20 % de lesão nas áreas CA2 e CA3 e cerca de 10 % de lesão no córtex e estriado (NETTO et al, 1993). Uma isquemia por 20 minutos resulta no aumento da lesão neuronal no setor CA1, no qual é quase completa e acompanhada por uma marcada gliose (BLOCK et al, 2001). A

oclusão por 25 minutos pelo método de Pulsinelli produz uma grande perda celular dentro do CA1 e variavelmente em CA2 e CA3, estriado e córtex. Uma isquemia de até 30 minutos de duração produz uma extensiva lesão no subcampo CA1 do hipocampo com perda maciça dos neurônios piramidais desta região e é observada lesão também no estriado e no córtex (PULSINELLI, 1982; BLOCK, 1999; MODO et al, 2000).

VERGONI e cols (2000) observaram que três dias após o insulto isquêmico induzido por 30 minutos de isquemia, o número de células piramidais normais foi reduzido drasticamente e 86 % dos neurônios tinham uma aparência encolhida, com núcleos pinóticos e sem nucléolos, o pericário era homogêneo, amorfo e sem corpos de Nissl. O percentual de aparência normal dos neurônios variou entre 5 a 30 %, dependendo do intervalo de tempo entre o insulto isquêmico e a análise histológica. Os animais apresentaram somente 14%, 5%, 23% e 30% de neurônios normais no 3°, 10°, 15° e 65° dia após a isquemia respectivamente. Esta lesão histológica induzida pela isquemia de 30 minutos foi associada com significativos déficits duradouros na performance sensório-motora e na habilidade para o aprendizado e foi evidente após os dois meses de lesão isquêmica.



## 1.2 DÉFICITS COGNITIVOS

O aprendizado é a aquisição de nova informação ou conhecimento e a memória é a retenção desta informação aprendida. A memória de fatos ou informações armazenadas dias, meses ou anos atrás é chamada de memória de longo prazo e a memória sobre acontecimentos ocorridos em segundos ou horas atrás é chamada de memória de curto prazo. A memória também é classificada como memória declarativa (memória de fatos e eventos) e memória não declarativa (memória para habilidades, comportamentos) (ZIGMOND et al, 1999; BEAR et al, 2001).

O tipo de memória utilizada pelo rato durante a tarefa apetitiva no labirinto radial para reter informações sobre qual o braço este visitou quando procurava comida, foi chamado por OLTON e SAMUELSON (1976) de memória de trabalho (*working memory*). A memória de trabalho é considerada como a retenção de curto prazo, operacionalizada em períodos de segundos, que mantém informações *on-line* para atividades cognitivas básicas como raciocínio, compreensão e solução de problemas (BEAR et al, 2001). A memória de trabalho pode ser estudada em todos os modelos de aprendizado espacial.

Em ratos isquêmicos observamos três tipos de déficits no sistema de aprendizado e memória: déficit no aprendizado espacial demonstrado no aumento na

latência na aquisição inicial; déficit na retenção observado na pobre performance na sessão teste (*probe trial*) e déficit na memória de trabalho (*working memory*). Os animais isquêmicos mostram déficits na aquisição da memória e não no armazenamento da memória de longo prazo. Os déficits nas tarefas que examinam a memória de trabalho são traduzidos como um déficit no aprendizado mais do que um dano na memória de curto prazo (NETTO et al, 1993).

Estudos que induziram a isquemia cerebral global em ratos observaram que a isquemia global leva a déficits no aprendizado espacial (BLOCK e SCHWARZ, 1998). Ratos submetidos a 15 e 30 minutos de oclusão dos quatro vasos (4VO) mostraram um substancial grau de prejuízo no aprendizado espacial e na memória em tarefas no labirinto aquático e labirinto radial e importante perda de células do CA1, sugerindo que a perda comum de células do CA1 tem relação com déficits espaciais e que os neurônios do CA1 são importantes no aprendizado espacial (AUER et al, 1989; NUNN et al, 1991; NETTO et al, 1993). Os déficits apresentados pelos animais isquêmicos são consistentes com um prejuízo moderado na memória de curto prazo, contribuindo para um déficit na aquisição do aprendizado e, portanto, a lesão hipocampal produzida pela isquemia interfere na habilidade para processar a informação relacional (NETTO et al, 1993).

O labirinto aquático de Morris (*Morris water maze*) é composto por um tanque circular cheio de água com uma plataforma submersa onde o rato pode

escalar a plataforma para emergir da água e evitar a necessidade de nadar. É dividido em quatro quadrantes virtuais de igual superfície, com diferentes pontos de saída do animal durante as sessões de treino. O ponto de partida é modificado e o local da plataforma é alterado em cada fase ou dia de treino. A latência de escape (tempo para o animal localizar a plataforma) é usada para avaliar a aquisição da tarefa do *water maze* e a velocidade do nado, nesta tarefa, é utilizada para avaliar o comprometimento motor dos ratos (MORRIS, 1984; PUURUNEN et al, 1997)

O labirinto aquático possui a plataforma localizada no centro de um dos quatro quadrantes, submersa a 1 centímetro da superfície da água. A temperatura da água deve permanecer em torno de 22 a 23°C. O tanque é localizado em uma sala que possui em suas paredes algumas dicas espaciais externas, que são visíveis de dentro do tanque e que podem ser utilizados pelos ratos para a localização espacial (MORRIS et al, 1982; IKEDA et al, 2001). Este teste avalia a habilidade do rato em aprender a ir a um local definido no espaço somente por sua posição relativa a uma dica localizada fora do labirinto, distalmente (MORRIS, 1984; VERGONI et al, 2000).

A versão clássica do labirinto aquático é a tarefa mais usada para estudar o aprendizado espacial, onde o rato tem que achar a plataforma submersa usando dicas fora do labirinto na ausência destas dentro do labirinto (DE BRUIN et al, 1997). É largamente utilizado como um paradigma de investigação da associação

espacial de aprendizado e memória, cujas associações aparentemente dependem de dicas visuais distais (ROBINSON et al, 2001).

Os testes comportamentais no labirinto aquático possibilitam a avaliação da performance do aprendizado e memória de roedores submetidos à isquemia. Assim, déficits cognitivos em roedores podem ser demonstrados utilizando o Labirinto Aquático, pois este foi desenvolvido para testar a habilidade do rato em aprender, lembrar e ir para um lugar definido no espaço (BLOCK, 1999).

Na tarefa simples do labirinto aquático (*simple task*), o rato é colocado no tanque em vários lugares diferentes, em posições iniciais diversas próximas da parede e deve nadar para localizar a plataforma submersa em uma posição fixada. Durante o treinamento, as sessões de treino iniciam quando o animal é colocado posicionado de frente para a parede do tanque, imerso na água a fim de localizar a plataforma. Se o rato não encontra a plataforma submersa dentro de 60 segundos, é colocado sobre esta, permanecendo um período, sendo depois removido. Cada rato recebe quatro treinos consecutivos a cada dia, iniciando cada vez em um ponto de saída diferente (MORRIS, 1984; BLOCK, 1999; VERGONI et al, 2000). Os ratos em condições normais após uma série de treinos, tornam-se progressivamente melhores para achar a plataforma e, rapidamente, aprendem a nadar em direção à plataforma mesmo saindo de posições diferentes da posição em que foram colocados inicialmente (PRUSKY et al, 2000).

Quando colocados no tanque, os ratos fazem uma escolha instantânea após a liberação na água e depois desta escolha, a maioria dos animais preferem iniciar nadando ao longo da parede do tanque explorando-o a fim de localizar a plataforma e, ocasionalmente, atravessando-o. Na primeira fase dos treinos, as latências de escape são elevadas, com os animais geralmente não conseguindo localizar a plataforma dentro do tempo estabelecido. À medida que os treinos se sucedem, estas diminuem e os animais adquirem a habilidade de encontrar a plataforma, sugerindo que a estratégia de navegação foi usada baseada na experiência prévia com a localização da plataforma anteriormente (DE BRUIN et al, 1997; ROBINSON et al, 2001).

Animais treinados para encontrar comida no labirinto radial em um estudo realizado por DEVAN e McDONALD (2001) não foram afetados pelo reforço parcial (onde a recompensa é dada somente em um dos treinos), entretanto os animais treinados para escapar da água falharam em 50 % para aprender a localização da plataforma submersa. Estes achados sugerem que o reforço pode afetar diferentemente a performance espacial em dois paradigmas de aprendizado.

A latência de escape, a velocidade e a distância percorrida pelo rato no nado são parâmetros das tentativas de escape que fornecem informações sobre a habilidade de aprendizado e performance motora. Na sessão teste (*probe trial*), que é realizado após o término das sessões de tentativas de escape, onde a plataforma é

retirada e ao rato é permitido nadar livremente, a memória espacial é testada. O número de vezes que o animal cruza o local onde estava a plataforma e a quantidade de tempo gasto no quadrante onde estava a plataforma é parâmetro de aferição de memória espacial (MORRIS, 1984; BLOCK, 1999).

Os testes comportamentais no labirinto aquático para examinar a habilidade de aprendizado e memória em roedores, possuem vantagens como a facilidade na execução e interpretação dos mesmos. Além disto, possibilitam diferenciar entre o processamento cognitivo (memória e aprendizado) e a performance motora (BLOCK, 1999). Apesar do labirinto aquático ser uma tarefa estressante por utilizar uma motivação de escape aversiva, leva o animal a um rápido aprendizado, sendo utilizado para examinar a memória de referência de longo prazo nestes animais (IKEDA et al, 2001).

A atividade local das células hipocâmpais é mais facilmente controlada quando as tarefas no labirinto aquático possuem um ponto de referência distal do que uma referência proximal, sugerindo que a posição dos pontos de referência no ambiente é importante para o envolvimento no processamento espacial neste tipo de tarefa (SAVE e POUCKET, 2000).

A lesão celular no setor CA1 do hipocampo varia entre 10 a 90 % nos animais isquêmicos, dependendo do modelo animal de isquemia global e a duração

da isquemia, porém animais que apresentaram déficits no labirinto aquático de Morris, possuíam lesão neuronal no setor CA1 de no mínimo 60 %. Para uma adequada performance em tarefas de aprendizado espacial um mínimo de 25 % aproximadamente de neurônios piramidais de CA1 íntegros, sem lesão, são necessários (BLOCK, 1999).

Vários estudos já demonstraram que ratos com uma isquemia global induzida pelo modelo 4VO apresentam déficit de aprendizado espacial e lesão neuronal. Nestes trabalhos observou-se que animais com 15 minutos de isquemia apresentaram déficit cognitivo e lesão neuronal maior que 75 % (HAGAN e BEAUGHARD, 1990) e que animais submetidos a uma isquemia de 20 minutos, exibiram déficits e lesões celulares maiores que 90 % (JASPERS et al, 1990). Assim, concluiu-se que tempos variados de isquemia como, 10, 15 e 20 minutos, produzem de 70 a 90 % de lesão neuronal levando os animais a apresentarem déficits de aprendizado (NELSON et al, 1997).

Foi observado também lesão cerebral com infarto generalizado envolvendo regiões como o córtex sensório-motor, estriado e hipocampo em 61 % dos ratos submetidos a hipóxia-isquemia aos 7 dias de vida. Estes animais estudados por IKEDA e cols. (2001) demonstraram prejuízo definitivo no aprendizado em quatro diferentes tarefas, entre elas o labirinto aquático de Morris.

NETTO e cols., (1993), observaram que os ratos isquêmicos mostram um déficit duradouro no aprendizado espacial no labirinto aquático por sofrerem um prejuízo na memória de trabalho (*working memory*) e que cada déficit é sensível à dificuldade da tarefa.

Um fator que influencia no aparecimento do déficit cognitivo após uma isquemia é o intervalo entre a indução da isquemia e o início dos testes comportamentais no labirinto aquático. (BLOCK, 1999). O déficit em tarefas simples no labirinto aquático após a isquemia cerebral global pelo modelo de 4VO pode ser demonstrado por um intervalo entre 1 e 20 semanas após o insulto isquêmico, mostrando-nos que os déficits cognitivos produzidos pela isquemia são duradouros nos roedores (JASPERS et al, 1990; BLOCK e SCHWARZ, 1998).

Lesões bilaterais do hipocampo produzidas estereotaxicamente em ratos neonatos também resultaram em déficits na memória espacial no labirinto aquático através da infância, adolescência e período adulto (ALTEMUS e ALMLI, 1997).

O comportamento em tarefas no labirinto aquático de Morris parece ser mais sensível à lesão por isquemia global e o déficit de aprendizado neste tipo de tarefa é evidente mesmo quando somente metade da área CA1 do hipocampo está lesada (WHISHAW et al, 1994).



O hipocampo e o córtex parietal estão envolvidos diferentemente no processamento de pontos de referências proximal e distal durante a navegação espacial. Ratos com lesão no hipocampo apresentaram déficits nas condições de referência proximal e distal, porém os ratos com lesão no córtex parietal apresentaram déficit somente na condição de referência proximal. Ratos com lesão hipocampal não apresentam prejuízo nas tarefas espaciais quando o animal pode localizar-se por um sinal no labirinto aquático. Assim, o hipocampo poderia não estar envolvido quando o animal pode contar com um sinal diretamente associado ao objetivo e quando utiliza a estratégia visual contribuindo desta maneira para o processamento de aprendizado espacial quando existem pontos de referências proximais e distais no labirinto aquático durante a tentativa de escape. Este processamento do aprendizado espacial com pontos de referência distais é principalmente mediado pelo hipocampo, pois os ratos com lesão hipocampal apresentam prejuízo em condições distais no labirinto aquático (SAVE e POUCKET, 2000).

## **1.2 EXTINÇÃO DO COMPORTAMENTO**

Quando ratos são treinados para adquirirem uma resposta de corrida (correr em uma pista reta) com recompensa de comida e esta recompensa é subseqüentemente descontinuada por omissão da comida, ocorre a extinção da resposta de corrida aprendida durante a fase de aquisição da resposta (RAWLINS et

al, 1985; SINDEN et al, 1988; YEE, 2000). A extinção de tarefas em ratos é, portanto um fenômeno que ocorre em animais que foram submetidos inicialmente ao aprendizado de uma tarefa (fase de aquisição inicial) e que, após a retenção da resposta aprendida, são submetidos a uma nova condição de treino para extinguir o aprendizado inicial. Estes animais possuem então a capacidade de extinguir o aprendizado da primeira tarefa para aprender a segunda tarefa, apresentando pouca resistência a extinguir a primeira tarefa e demonstrando um bom aprendizado da segunda tarefa à qual são submetidos (PORT et al, 1996).

Em estudos sobre extinção, os animais aprendem uma tarefa em treinos consecutivos durante um período de dias até atingirem a performance desejada (fase de aquisição) e, um dia ou mais depois de terminada esta fase, são submetidos a uma sessão de teste com condições diferentes com o objetivo de extinguir a performance aprendida anteriormente (PORT et al, 1996).

Se a aquisição acontece com um reforço contínuo (“continuous reinforcement schedule”), ou seja, cada resposta durante todos os treinos é recompensada, a extinção ocorre mais rapidamente do que se a aquisição ocorre com um reforço parcial (“partial reinforcement schedule”), ou seja, a recompensa é dada somente em um dos treinos. O aumento da resistência à extinção produzida pelo reforço é conhecido como o efeito de extinção do reforço parcial (RAWLINS et al, 1985; SINDEN et al, 1988; YEE, 2000). Assim, a resistência à extinção é o grau no

qual uma resposta operante persiste mesmo quando uma interrupção na operacionalização da tarefa é introduzida (COHEN, 1998).

O efeito de extinção é suscetível a lesões aspirativas da formação hipocampal (SINDEN et al, 1988). Estas lesões eliminam o efeito de extinção do reforço parcial provocando o aumento da resistência à extinção em animais treinados sob a condição de reforço contínuo e diminui a resistência à extinção em animais treinados sob o reforço parcial, ou seja, animais com lesão hipocampal apresentam resistência a extinguir um aprendizado anterior (RAWLINS et al, 1980).

O tempo entre a primeira e a segunda tarefa influenciará na resistência à extinção, assim como o período de treino influenciará no aprendizado. Quanto maior o período entre as tarefas e maior o período de treino da primeira tarefa, mais difícil a extinção da mesma e maior a resistência à extinção (PORT et al, 1996). Para estes autores, a resistência à extinção aumenta durante o período de treinamento devido à exposição adicional as condições de aprendizado da tarefa durante a nova fase de aquisição a que os animais são submetidos.

A persistência das respostas na extinção aumenta com a interrupção do reforço prévio à extinção (BYRNE et al, 1998), ou seja, se os animais forem submetidos a muitas sessões de treino para uma tarefa antes da sessão de extinção,

a resposta à extinção da tarefa aprendida será menor, sugerindo uma resistência à extinção desta tarefa.

O intervalo entre os treinos interfere no efeito da extinção. Quando o intervalo entre os treinos é de cerca de 5 minutos, a lesão hipocampal torna deficitário o efeito de extinção, reduzindo a resistência à extinção em animais treinados sob a condição de reforço parcial. Quando este intervalo entre a recompensa e a não recompensa, é reduzido substancialmente, sendo inferior a 5 minutos, o efeito da extinção do reforço parcial é resistente à lesão hipocampal, ou seja, os animais não extinguem o aprendizado (RAWLINS et al, 1985). Estudos anteriores, porém relatam que a lesão hipocampal aumenta a resistência à extinção quando os intervalos entre os treinos são de 10 minutos (JARRARD e WICKELGREN, 1964; JARRARD e ISAACSON, 1965; RAWLINS et al, 1985).

Em um estudo dos efeitos da cocaína, da anfetamina e do agonista receptor de dopamina D1 sobre a extinção do medo, em ratos Wistar, os animais foram submetidos a sessões de aquisição onde experimentavam choque (fase de aquisição do medo) e um dia após o término desta fase de aquisição foram submetidos a um teste de extinção do medo, onde nas mesmas condições do treino não recebiam o choque (fase de extinção do medo). Foi observado que a extinção de uma reação emocional condicionada é relativamente específica ao ambiente na qual é adquirida e uma reação de medo aprendida e extinta em um contexto é restaurada

quando acontece o teste comportamental em um contexto diferente (BOROWSKI e KOKKINIDIS, 1998).

Ratos com lesão hipocampal não mostraram déficit de aprendizado aversivo condicionado em relação aos animais controle, mas apresentaram uma sensibilidade aumentada à inibição latente. Ratos hipocampectomizados adquirem um teste de preferência condicionada, porém falham em mostrar alguma evidência de extinção (REILLY et al, 1997).

Nestes estudos citados anteriormente, os animais eram submetidos a uma hipocampectomia provocando lesão hipocampal que interferiu na extinção de tarefas. Outras condições podem estar também interferindo neste fenômeno da extinção em ratos e, sobretudo, na resistência à extinção. A isquemia global em ratos como condição que os leva a déficits no aprendizado espacial, pode ser uma condição que interfira diretamente na extinção e, conseqüentemente na resistência á extinção de tarefas de aprendizado espacial.

A isquemia cerebral global em ratos assemelha-se às condições de isquemia por uma parada cardíaca em humanos. Esta isquemia levará estes indivíduos a importantes déficits cognitivos, interferindo no aprendizado de tarefas que comprometerão a recuperação funcional dos mesmos.

Também em indivíduos após o acidente vascular cerebral, déficits cognitivos podem surgir, e a redução da atenção e da capacidade de aprender nestes pacientes pode ser um problema durante a reabilitação e deve ser levada em conta na elaboração de programas de reabilitação (DURWARD et al, 2000).

O paciente que sofreu o acidente vascular cerebral pode apresentar déficit na memória à curto prazo, afetando a capacidade de reaprender tarefas de movimento funcional (WADE et al, 1985). Assim, para um resultado eficaz durante a reabilitação, ADA e cols., (1990) sugerem que as instruções devem ser simples e repetitivas, com pistas visuais e verbais e que as tarefas sejam realizadas diariamente.

Em nossa prática clínica observamos que os indivíduos após uma isquemia por acidente vascular cerebral demonstram dificuldade no aprendizado de um movimento ou uma atividade funcional ao serem submetidos ao aprendizado de diferentes movimentos ou tarefas em uma mesma terapia. Eles apresentam condições de aprender uma tarefa, porém se forem submetidos ao aprendizado de uma nova tarefa logo após a aquisição desta primeira, apresentam dificuldade. Talvez, este fato possa ser explicado pela resistência a extinção apresentada por estes indivíduos.

A resposta para esta situação observada durante a fase de recuperação de vários indivíduos após um insulto isquêmico levou-nos ao interesse de pesquisar a possível interferência da isquemia cerebral na resistência a extinção de tarefas às quais eles são submetidos durante seu tratamento.

### **1.3 HIPÓTESE E OBJETIVOS**

Neste trabalho submetemos ratos ao modelo de 4VO para produzir uma isquemia global e lesão neuronal em região do CA1 do hipocampo, a fim de obter déficits no aprendizado espacial e, utilizando as tarefas no labirinto aquático de Morris, verificar a memória de trabalho e a resistência à extinção de tarefas de aprendizado espacial em ratos isquêmicos submetidos à isquemia por 10 e 20 minutos.

Nossa hipótese é de que ratos isquêmicos apresentam déficit de aprendizado e resistência à extinção em tarefas de navegação espacial no labirinto aquático de Morris.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos adultos Wistar, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, mantidos em caixas de "plexiglass" com assoalho recoberto por serragem, alojados em número de 5 animais por caixa, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais recebiam água e ração padronizada *ad libitum* e permaneciam em ambiente climatizado (25°).

### 2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram realizados durante este estudo dois experimentos comportamentais (Experimento 1 e Experimento 2) visando avaliar o aprendizado espacial.



No experimento 1, realizado para determinar as condições ideais de treinamento para o estudo comportamental do experimento 2, os animais foram divididos em dois grupos de animais: a) grupo controle e b) grupo isquêmico (animais submetidos a isquemia global transitória por 10 minutos). No segundo experimento, os animais foram divididos em quatro grupos: a) grupo controle; b) grupo controle cirúrgico (ou "sham", animais submetidos ao procedimento cirúrgico de eletrocoagulação das artérias vertebrais sem o procedimento isquêmico); c) grupo isquêmico-10 minutos (animais submetidos a isquemia global transitória por 10 minutos) e, d) grupo isquêmico-20 minutos (animais submetidos a isquemia global transitória por 20 minutos). Ao total foram utilizados 68 ratos.

Após o estudo comportamental, utilizando o labirinto aquático de Morris, os animais foram perfundidos, os cérebros cortados e as lâminas coradas para realização das análises morfológica e volumétrica.

## **2.2 ISQUEMIA**

Ambos grupos de animais isquêmicos foram submetidos a isquemia cerebral global transitória. A isquemia cerebral foi produzida nos animais deste estudo utilizando o modelo proposto por PULSINELLI e cols (1982) de oclusão dos quatro vasos (modelo de 4VO) com modificações segundo NETTO e cols (1993). Este método reduz o fluxo sanguíneo cerebral para menos de 3 %.

O procedimento de isquemia cerebral foi realizado em duas etapas. No primeiro dia, o animal era anestesiado com halotano 2-4 % (em ar ambiente) e posicionado em aparelho estereotáxico, para realização de uma incisão na linha média da nuca para se ter acesso ao forâmen alar da primeira vértebra cervical do rato. Através deste foramen foi introduzida a agulha do eletrocautério para aplicação de corrente para eletrocoagular as artérias vertebrais, obstruindo assim permanentemente o fluxo sanguíneo. A seguir, foi realizada uma incisão na linha média da face anterior do pescoço do animal e as artérias carótidas comuns foram isoladas através da colocação, ao redor destas artérias, de um fio de silicone acoplado a um botão de mesmo material, no qual foi dado um nó. No dia seguinte a este procedimento, os animais foram contidos manualmente, sem uso de fármacos e foi realizada a manobra de oclusão das artérias carótidas utilizando um cone de plástico com uma ranhura na extremidade de maior diâmetro para comprimir, durante 10 ou 20 minutos, o botão contra as artérias carótidas (figura 3). Deste modo, os animais perdiam o reflexo de endireitamento; aqueles que não apresentaram a ausência deste reflexo em dois minutos ou que apresentaram convulsões durante o período isquêmico ou de reperfusão, foram descartados. Concluído o episódio isquêmico, os fios de silicone foram liberados.

O experimento 1 foi realizado com 15 animais, divididos em 08 animais no grupo controle e 07, no grupo isquêmico.

## Método de Oclusão dos Quatro Vasos

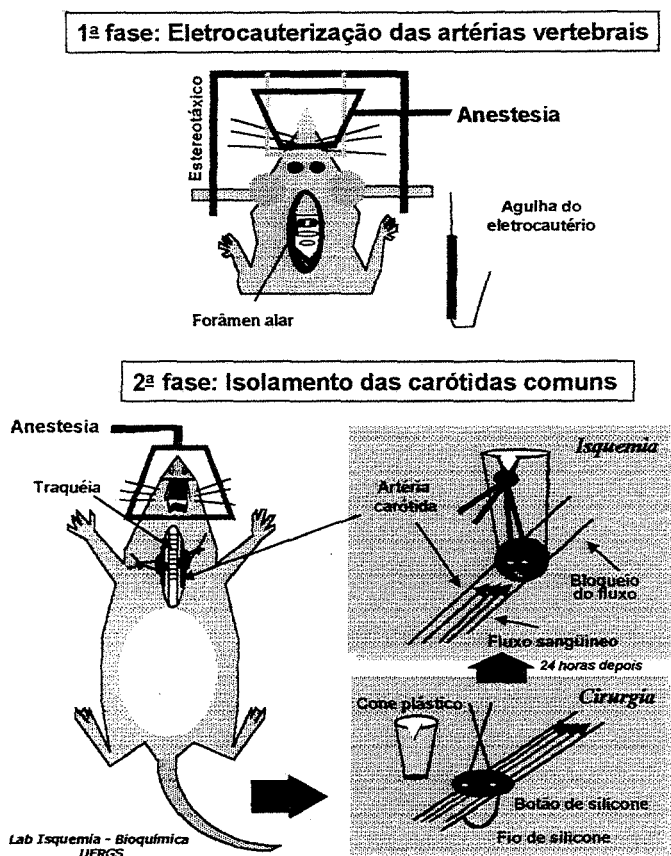


Figura 3- Esquema mostrando o método de oclusão dos 4 vasos (4VO).

## 2.3 ESTUDOS COMPORTAMENTAIS

Neste experimento, submetemos os animais a sessões de treino (Fases de Aquisição) no **Labirinto Aquático de Morris** (MORRIS, 1984) e a sessões de teste (*Probe Trials*). Na Fase de Aquisição, os animais eram colocados em um tanque

circular com uma plataforma submersa a 1 cm abaixo do nível da água, durante o tempo máximo de um minuto e era observada a latência do animal para achar a plataforma. Se o animal não encontrasse a plataforma após o tempo máximo previsto, o mesmo era colocado sobre a plataforma durante 10 segundos, sendo depois secado e colocado novamente na caixa com os outros animais.

O tanque foi dividido em quatro quadrantes virtuais (quadrantes 1, 2, 3 e 4) com quatro pontos de saída (N- norte, S- sul, O- oeste, L-leste). O quadrante 1 estava localizado entre os pontos de saída "S" e "L"; o quadrante 2, entre os pontos "L" e "N"; o quadrante 3, entre "N" e "O" e, o quadrante 4, entre os pontos de saída "O" e "S", conforme a figura 4. Em cada dia de treino, os ratos tinham quatro tentativas (4 "trials"/dia), com dez minutos de intervalo entre cada tentativa para encontrar a plataforma, tendo como posição inicial de saída um ponto diferente do tanque. A seqüência dos pontos de saída era modificada diariamente.

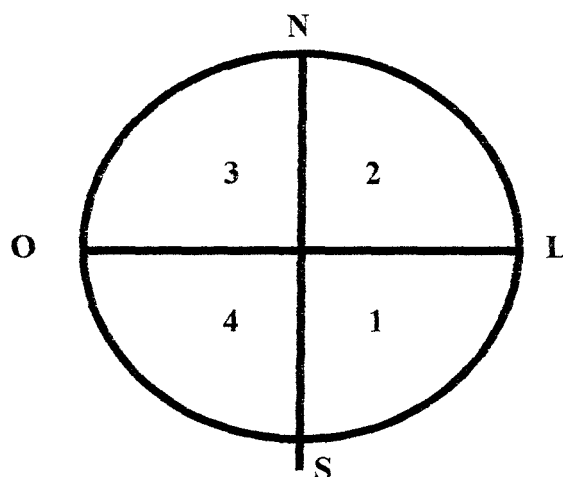


Figura 4- Esquema mostrando o Labirinto Aquático, os quadrantes e os pontos de saída.

A temperatura da água do tanque era mantida entre os 24 e 26 °C. Em todos os dias de treino eram colocados 300 mililitros de leite na água para deixá-la turva, a fim de dificultar a visualização da plataforma pelos animais. Depois de colocar o animal na água, o experimentador se posicionava na sala, próximo ao ponto "S", onde ficava cronometrando o tempo que o animal levaria para encontrar a plataforma. Nas paredes da sala foram colocados três cartazes pequenos, coloridos (dois na parede próxima ao ponto "N" e um na parede próxima ao ponto "L"). (figura 5)

A duração de cada fase de aquisição foi diferente de acordo com a média da latência alcançada pelos animais em cada dia de treino e no final de cada uma destas fases, sendo o valor igual ou inferior a 10 segundos de latência para achar a plataforma como média dos treinos (*trials*), o valor considerado como referência. Após 24 horas da última sessão de treino, todos os animais foram submetidos a sessões de teste (teste 1 e 2) sem a plataforma (*probe trial*) com intervalo mínimo de 10 minutos entre ambas.

Durante o teste, com duração de 60 segundos, foi observado o número de cruzamentos realizados pelos animais no local onde estava a plataforma durante a fase de aquisição e, o tempo gasto pelos animais no quadrante onde, anteriormente, estava localizada a plataforma submersa. Todas as sessões de teste foram gravadas em vídeo e, posteriormente, analisadas.

A Fase de Aquisição I foi composta por 6 dias de treino onde a plataforma foi posicionada no quadrante 2, entre os pontos "L" e "N", próxima à parede. A sessão de teste foi realizada 24 horas depois de terminada a última tentativa de escape, com a posição de saída no ponto "N". No dia 1, a seqüência de saída foi N-S-O-L; no dia 2, L-S-N-O; no dia 3, S-O-L-N; no dia 4, O-L-S-N; no dia 5, N-L-S-O e, no dia 6, a seqüência foi L-N-O-S.

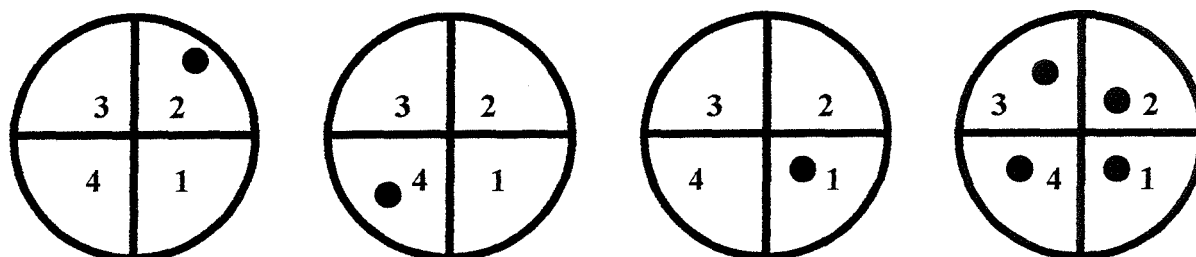
Após quatro dias da sessão teste (*probe trial I*), foi iniciada a Fase de Aquisição II que consistiu de apenas três dias. Nesta fase, a plataforma estava localizada no quadrante 4, entre os pontos "O" e "S", próximo ao centro dos quadrantes. A seqüência de saída no dia 1 foi O-S-N-L; no dia 2, S-L-O-N e no dia 3, L-N-O-S. Novamente, 24 horas após, a sessão de teste (*probe trial II*) foi realizada, com a posição de saída para a sessão teste no ponto "O".

Na Fase de Aquisição III, que iniciou após dez dias de intervalo, os animais foram submetidos novamente a três dias de treino, com a plataforma localizada no meio do quadrante 1, entre os pontos "S" e "L", tendo como seqüência de saída O-L-S-N, L-N-O-S e N-S-O-L, nos respectivos dias. Após esta fase, os ratos foram submetidos a nova sessão de teste (*probe trial III*). O local de saída para este teste foi no ponto "S".



Figura 5: Esquema mostrando a sala do Labirinto Aquático de Morris.

A Fase de Aquisição IV, na qual estudamos a memória de trabalho, iniciou após 10 dias de intervalo e foi composta de 4 dias de treino, onde a cada dia a plataforma era colocada em uma posição diferente. No dia 1 foi posicionada no quadrante 3, entre os pontos "N" e "O", próximo ao centro dos quadrantes e a seqüência de saída foi S-L-N-O; no dia 2, no quadrante 1, entre os pontos "S" e "L", no centro do quadrante e a seqüência de saída foi N-L-O-S; no dia 3, no quadrante 2, entre "L" e "N", no meio do quadrante tendo como seqüência de saída O-S-L-N e, no dia 4, no quadrante 4, entre os pontos "O" e "S", no meio do quadrante sendo a seqüência de saída O-S-L-N (figura 6).



Fase de Aquisição I

Fase de Aquisição II

Fase de Aquisição III

Fase de Aquisição IV

Figura 6- Esquema mostrando os locais da plataforma durante cada Fase de Aquisição do experimento 1

No experimento 2 foram realizados os testes comportamentais semelhantes aos realizados durante o experimento 1. O grupo controle desta fase foi composto por 13 animais; o grupo controle cirúrgico por 15 animais; o grupo isquêmico-10 minutos foi composto por 12 animais e o grupo isquêmico-20 minutos por 13 animais, totalizando 53 animais.

GRUPOS	CONTROLE	SHAM	ISQ-10	ISQ-20	TOTAL
GRUPO I	3	5	3	5	16
GRUPO II	3	3	4	2	12
GRUPO III	3	2	3	3	11
GRUPO IV	4	5	2	3	14
<b>TOTAL</b>	13	15	12	13	53

Tabela 1 – Distribuição dos animais do experimento 2.



Estes animais foram alojados em caixas, conforme o grupo a que pertenciam, com comida e água à vontade, com ciclo claro-escuro de 12 horas. As cirurgias dos animais dos grupos isquêmicos 10 e 20 minutos e do grupo controle cirúrgico foram realizadas em períodos diferentes, formando assim quatro grupos de acordo com a data do procedimento cirúrgico (tabela 1). Cada um dos quatro grupos foi composto de animais de cada grupo cirúrgico, facilitando assim também o manejo e treinamento dos animais durante os treinos e testes. O grupo I e o grupo II tiveram suas fases de aquisição e as sessões de teste realizadas no mesmo período.

Nos animais que sofreram isquemia cerebral global transitória, a fase de aquisição I iniciou 21 dias após o insulto isquêmico. Os procedimentos durante as fases de aquisição e as sessões de teste (*probe trials*) desta fase experimental também foram semelhantes aos da fase experimental 1, porém nesta, foram realizadas apenas três fases de aquisição e duas sessões de teste.

A fase de aquisição I do experimento 2 contou com 5 dias de treino, onde os animais eram colocados no tanque com a plataforma submersa, localizada no quadrante 4 entre os pontos "O" e "S", no meio dos quadrantes, afim de localizá-la como no experimento anterior. No dia 1 do treino a seqüência de saída foi L-O-N-S; no dia 2, foi N-L-S-O; no dia 3, S-N-O-L; no dia 4, O-S-L-N e, no dia 5, L-O-N-S. Após 24 horas do término do último trial, os animais eram colocados no ponto de saída "S", para realizarem a sessão de teste (*probe trial 1*).

A fase de aquisição II iniciou após 9 dias da sessão de teste e contou com 4 dias de treino com 4 tentativas/dia. Nesta fase, a plataforma estava localizada no quadrante 1, entre os pontos "S" e "L", no meio destes pontos, próximo à parede. A seqüências dos locais de saída em cada dia, respectivamente, foram as seguintes: O-L-S-N; S-L-N-O; L-N-O-S e N-O-S-L. A sessão de teste (*probe trial* II) foi realizada 24 horas após ter sido finalizada esta fase de aquisição, tendo como local de saída para o teste, o ponto "O".

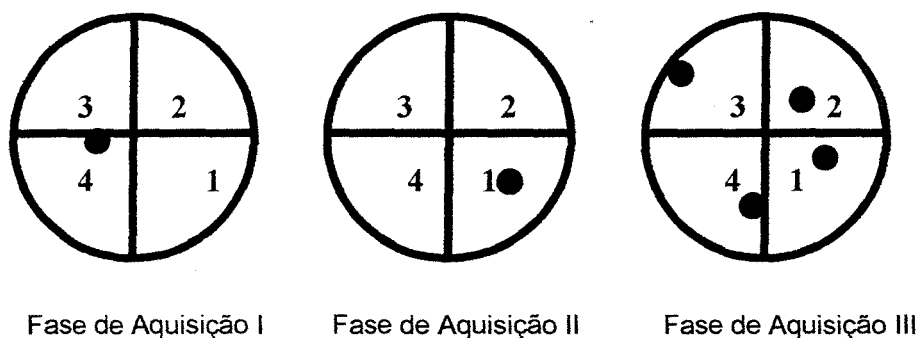


Figura 7- Locais da plataforma nas Fases de Aquisição do experimento 2.

Após 10 dias do término da sessão de teste (*probe trial* II), iniciou-se a fase de aquisição III, que consistiu de 4 dias de treino, sendo que em cada um destes, a plataforma era colocada em local diferente. Esta fase, semelhante a Fase de Aquisição IV da fase experimental 1, foi realizada para se avaliar a memória de trabalho dos animais estudados.

No dia 1 da fase de aquisição III do experimento 2, a plataforma ficou localizada no quadrante 3, entre "N" e "O", próxima à parede, tendo como seqüência de saída S-L-N-O; no dia 2, a plataforma foi localizada no quadrante 2, entre "L" e "N", próximo ao centro dos quadrantes, tendo como seqüência L-O-S-N; no dia 3, a plataforma ficou localizada no quadrante 4, entre "O" e "S", próximo à parede e próximo ao ponto "S", com seqüência de saída O-S-N-L e, no dia 4, a plataforma estava no quadrante 1, entre "S" e "L", próximo ao centro dos quadrantes., com locais de saída de N-L-S-O (figura 7).

## **2.4 PERFUSÃO E HISTOLOGIA**

Após terminadas as fases de aquisição e as sessões de teste das duas fases experimentais, 6 animais do experimento 1 (2 do grupo isquêmico 10 minutos e 4 do grupo controle) e 20 animais do experimento 2 (5 animais de cada grupo) foram aleatoriamente selecionados e perfundidos a fim de se retirar os encéfalos, para realização da análise morfológica.

Para a perfusão e preparação dos encéfalos, os animais foram anestesiados com solução de hidrato de cloral, 35 %, por via intra-peritoneal, sendo posicionados após a anestesia, na maca cirúrgica onde foram imobilizados. A via de perfusão foi a transcardíaca. Uma vez anestesiados os animais, procedia-se uma

toracotomia que expunha o coração e os grandes vasos para a cateterização da aorta ascendente, através do coração.

Para a cateterização da aorta, utilizou-se um cateter metálico introduzido através do *apex cordis* até o início da aorta ascendente, que permanecia conectado a uma bomba de perfusão peristáltica para a administração das soluções de 150 ml de salina (NaCl 0,9 %) e após, 150 ml de formaldeído. Foi administrado heparina junto a solução salina para evitar a formação de coágulos no espaço intravascular. O clampeamento da aorta descendente e a auriculotomia direita permitiam a otimização da perfusão e a drenagem das soluções administradas.

Após a perfusão os encéfalos foram removidos e armazenados em vidros com solução contendo paraformaldeído 10% por aproximadamente um mês. Os encéfalos foram identificados a partir do experimento e grupo ao qual pertenciam.

Os encéfalos após serem retirados do formaldeído foram cortados em secções coronais de 100  $\mu\text{m}$  em vibrátomo Leica e montados em lâminas histológicas, em cortes seriados, para serem corados. Foi empregada coloração de hematoxilina e eosina (HE) para a identificação dos elementos celulares.

## 2.5 ANÁLISE VOLUMÉTRICA

Para a análise volumétrica foi utilizado o princípio de Cavalieri (HOWARD e REED, 1998) a fim de determinar o volume de referência da região do CA1 do hipocampo dos animais do grupo controle e controle cirúrgico e o volume de lesão isquêmica nos animais isquêmicos. As secções do encéfalo contendo o hipocampo foram observadas sob um microscópio Nikon Eclipse E600. As imagens obtidas no microscópio foram capturadas por uma câmera de vídeo CCD (Pro-Series High Performance) acoplada a um *software* de análise de imagens (Image Pro-Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) instalado em um microcomputador Pentium 266 MMX (processador Intel).

Iniciou-se a análise volumétrica a partir da lâmina onde o hipocampo podia ser visualizado. O primeiro corte a ser analisado o volume da camada piramidal de CA1 foi então escolhido randomicamente e os demais cortes foram uniformemente amostrados, no sentido rostral caudal, sendo a distância entre cada corte analisado de 300  $\mu\text{m}$ .

Assim, para determinar o volume da região de CA1 do hipocampo a partir do princípio de Cavalieri, foram utilizados aproximadamente 17 cortes histológicos por encéfalo. A imagem obtida de cada corte selecionado foi digitalizada com o auxílio do *software* Image Pro Plus 4.1. Sobre a imagem do hipocampo foi sobreposto um sistema

de cruces (HOWARD e REED, 1998). Este sistema de cruces estava contido em um quadrado com os lados medindo 210  $\mu\text{m}$ , totalizando uma área de 44100  $\mu\text{m}^2$ . O número de cruces que se sobrepunham à camada piramidal da região do CA1 do corno de Ammon do hipocampo em cada hemisfério foi contado. Somente foram contadas como sobrepondo a camada piramidal do CA1, as cruces que tinham seu quadrante superior direito em contato com a região analisada.

O somatório de todos os volumes observados em cada corte histológico constituiu uma estimativa bastante precisa do volume de CA1 do hipocampo (V). Esta análise volumétrica seguiu o protocolo utilizado por MAIER e WEST (2001). A fórmula para o cálculo do volume está descrita abaixo:

$$V = T \cdot \frac{a}{p} \cdot \sum P, \text{ sendo}$$

V= volume total da camada CA1 do hipocampo

T= distância entre cada corte analisado

$\frac{a}{p}$  = área bidimensional do CA1 (distância entre cada cruz)

$\sum P$  (somatório de P)=número de pontos contados sobrepondo a camada piramidal de CA1

## 2.5 ANALISE ESTATÍSTICA

A partir dos resultados dos testes comportamentais no Labirinto Aquático de Morris, os dados paramétricos (diferença sessão de teste 1 e sessão de teste 2 no número de cruzamentos e no tempo gasto no quadrante-alvo e as latências para localizar a plataforma entre os animais dos diferentes grupos) foram expressos como  $\text{media} \pm \text{erro padrão (EP)}$ . As comparações foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste de raio múltiplo de Duncan, quando indicado (BLISS, 1967; DOWNE e HEATH, 1970) ou pelo teste "t" de Student (no experimento 1).

Para análise estatística dos resultados referentes à análise volumétrica da região do CA1 do corno de Ammon do hipocampo foi utilizado uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste de Tukey.

As diferenças foram consideradas significativas sempre que  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS para Windows 6.0.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 EXPERIMENTO 1**

#### **3.1.1 FASE DE AQUISIÇÃO I**

Analisando o desempenho dos animais dos grupos controle e isquêmicos-10 minutos, durante a fase de aquisição I, podemos observar que houve diferença entre os grupos quanto à latência para encontrar a plataforma do primeiro para o sexto dia de treino. A média do grupo controle no primeiro dia de treino foi de 49,0 segundos e do grupo isquêmico foi de 44,9 segundos; no último dia de treino (dia 6), a latência para encontrar a plataforma foi de 9,6 segundos, para o grupo controle, e de 24,2 segundos para o grupo isquêmico-10 minutos.

Assim, podemos verificar que a média das latências entre os grupos variou do primeiro para o sexto dia tanto no grupo controle quanto no grupo isquêmico, demonstrando aprendizado da tarefa (Figura 8).



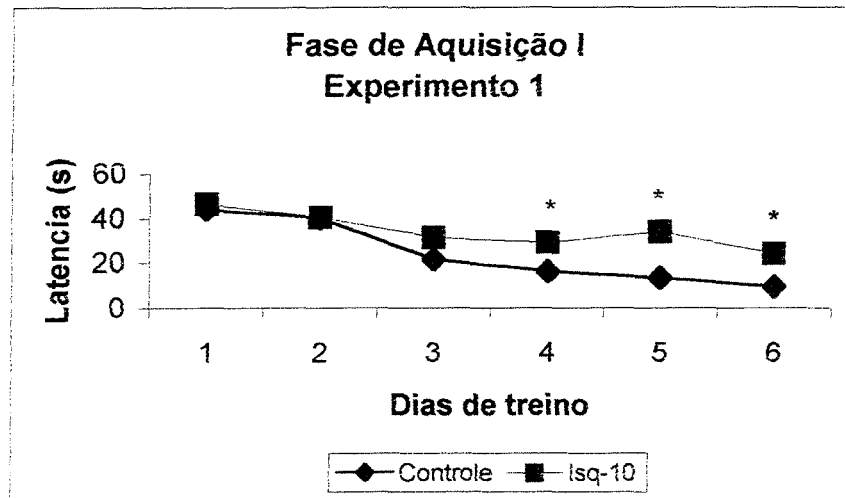


Figura 8 - Médias das latências durante a Fase de Aquisição 1 do experimento I, no labirinto aquático.

\* Diferença significativa entre os dois grupos,  $p \leq 0,05$ , teste t.

Observamos também que o tempo requerido pelos animais isquêmicos para encontrar a plataforma foi maior do que o dos animais controle tendo apresentado, do quarto ao sexto dia, diferença significativa entre eles (teste t para amostras independentes,  $p \leq 0,05$  nos dias 4, 5 e 6), demonstrando que os animais do grupo isquêmico apresentaram déficit no aprendizado espacial.

Os resultados da sessão de teste I (*probe trial I*) são mostrados nas figuras 9 e 10.

A análise da sessão de teste I, realizado após a fase de aquisição I, demonstra que houve diferença significativa ( $p = 0,002$ ) quanto ao tempo gasto no quadrante-alvo, no teste 1 comparado com o teste 2, no grupo controle (figura 9).

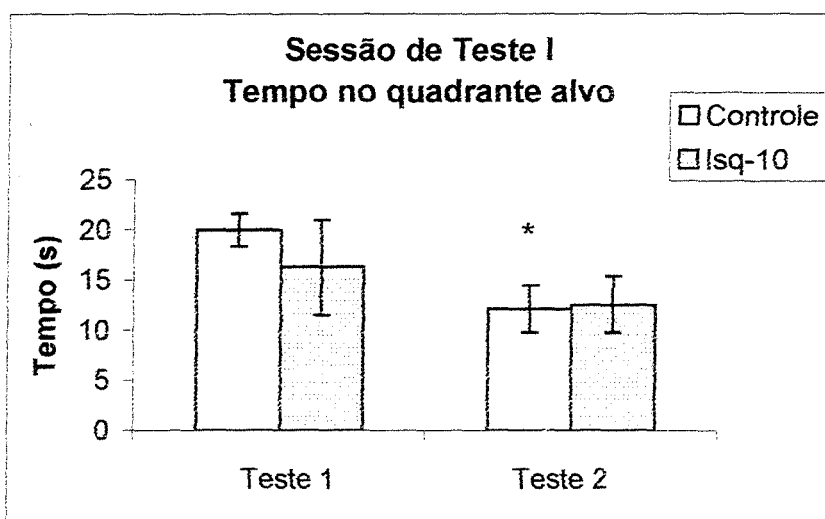


Figura 9- Média ( $\pm$  erro padrão) do tempo gasto no quadrante alvo, nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição I do experimento 1, no labirinto aquático.

\* Diferença significativa entre o teste 1 e teste 2 do grupo controle,  $p \leq 0,01$ , teste t.

Os animais do grupo controle permaneceram 20,0 segundos no primeiro teste e 12,1 no segundo teste. Os animais isquêmicos ficaram 16,2 segundos no primeiro teste e 12,5 no segundo. Isto nos mostra que tanto os animais do grupo controle, quanto isquêmicos, permaneceram menos tempo no quadrante onde anteriormente havia a plataforma, porém a diferença significativa no grupo controle evidencia uma extinção do aprendizado nos animais deste grupo.

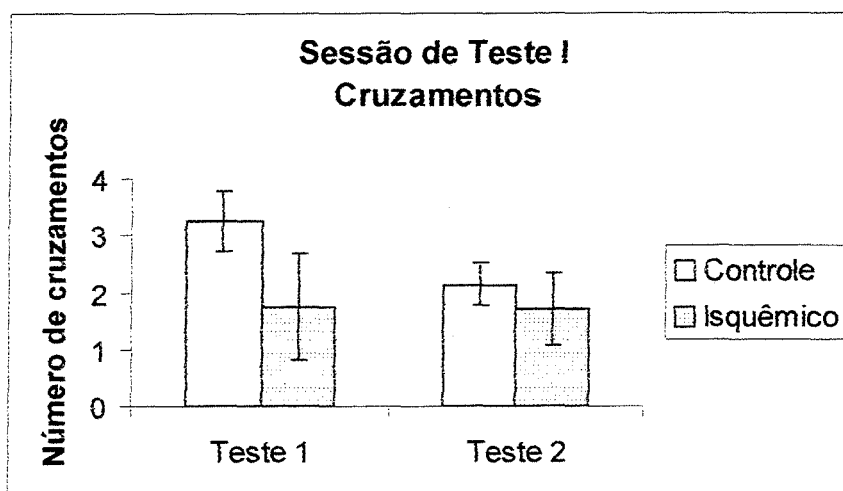


Figura 10- Média ( $\pm$  erro padrão) dos cruzamentos no local da plataforma nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição I do experimento 1, no labirinto aquático.

Quanto à média dos cruzamentos realizados pelos animais, não houve diferença significativa entre os grupos no dois testes. No teste 1, a média de cruzamentos dos animais do grupo controle foi de 3,2 e no teste 2, foi de 1,7. No grupo isquêmico a media foi de 2,1 e 1,7 cruzamentos nos testes, respectivamente (figura 10).

### 3.1.2 FASE DE AQUISIÇÃO II

Os resultados da latência para encontrar a plataforma submersa durante a fase de aquisição II são mostrados na figura 11. Nesta fase, a posição da plataforma

foi modificada. Podemos observar que não houve diferença significativa entre o desempenho dos animais controles e dos isquêmicos.

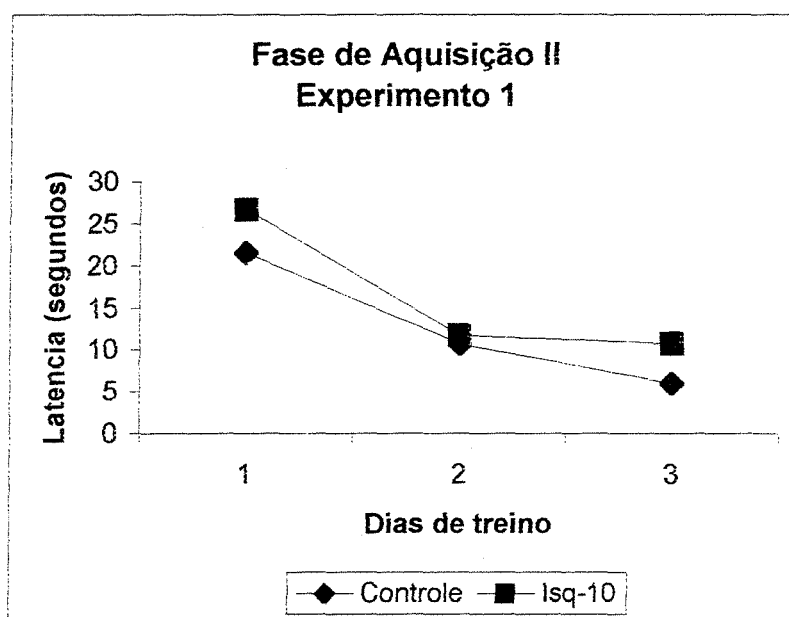


Figura 11- Médias das latências para encontrar a plataforma durante a Fase de Aquisição II do experimento I, no labirinto aquático.

A partir dos resultados da sessão de teste II (*probe trial II*), observou-se que não houve diferença significativa entre o tempo gasto pelos animais no teste 1 comparado ao teste 2 nesta sessão de teste no quadrante alvo tanto nos animais controle quanto nos isquêmicos (figura 12).

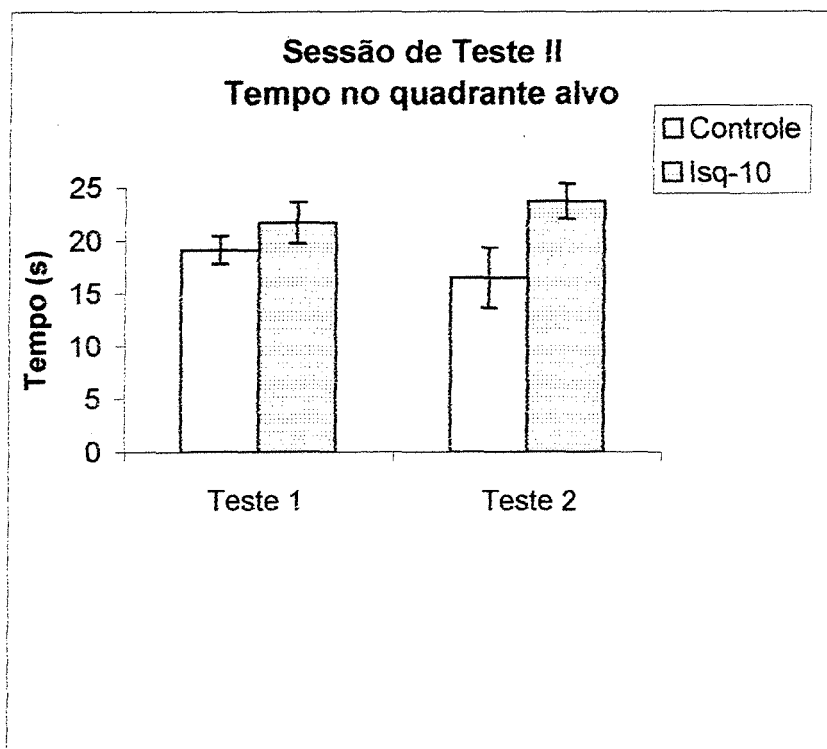


Figura 12- Média ( $\pm$  erro padrão) do tempo gasto no quadrante-alvo nos testes 1 e 2, após a fase de Aquisição II do experimento I, no labirinto aquático.

Quanto ao número de cruzamentos realizados também não houve diferença entre os grupos de animais isquêmicos e animais controle (figura 13).

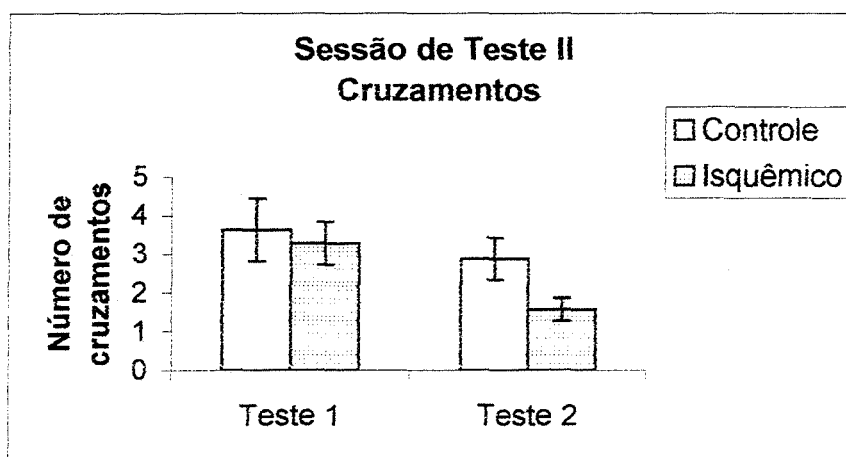


Figura 13- Médias ( $\pm$  erro padrão) dos cruzamentos no local da plataforma nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição II do experimento I, no labirinto aquático.

### 3.1.3 FASE DE AQUISIÇÃO III

A figura 14 apresenta as médias dos animais controle e isquêmicos na fase de aquisição III. Nesta fase houve diferença significativa entre os grupos quanto à latência para localizar a plataforma ( $p \leq 0,05$ ). A média dos animais do grupo controle foi de 10,9 segundos no primeiro dia de treino e 6,5 no último dia, enquanto que os animais controles apresentaram 24,5 segundos de latência no primeiro dia e, 15,4 no último.

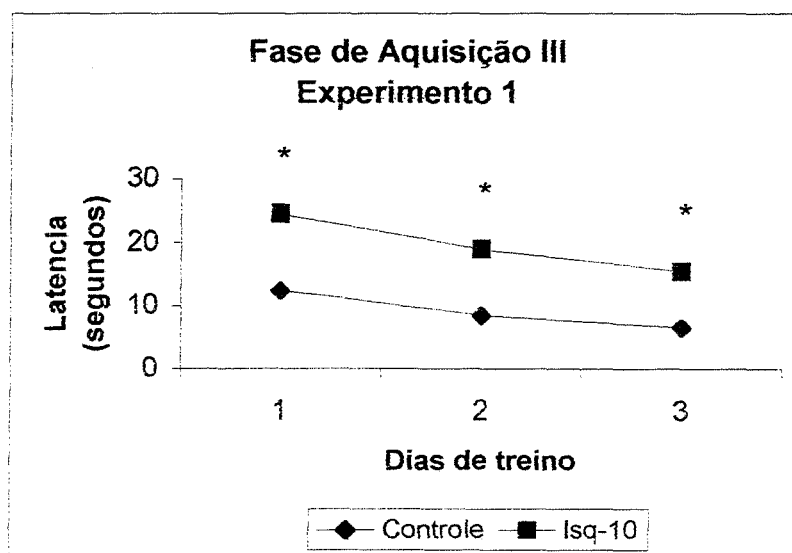


Figura 14- Média das latências para encontrar a plataforma durante a Fase de Aquisição III do experimento I, no labirinto aquático.

\* Diferença significativa entre os dois grupos,  $p \leq 0,05$ , teste t.

Os resultados da sessão de teste III (probe trial III) podem ser observados nas figuras 15 e 16. Quanto ao tempo gasto no quadrante-alvo, após a fase de

aquisição III, ambos os grupos não apresentaram diferença significativa nas latências, na sessão de teste III (figura 15).

Quanto ao número de cruzamentos observamos que não houve diferença significativa no número de cruzamentos no teste 1 e teste 2 da sessão de teste III dos animais do grupo controle, porém houve um aumento do número de cruzamentos nos animais isquêmicos do teste 1 para o teste 2 (figura 16).

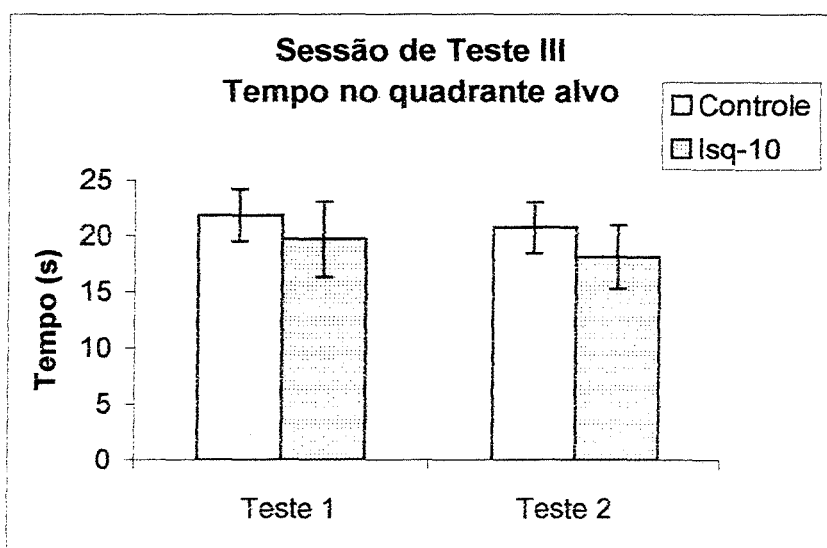


Figura 15- Média ( $\pm$  erro padrão) do tempo gasto no quadrante alvo nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição III do experimento I, no labirinto aquático.

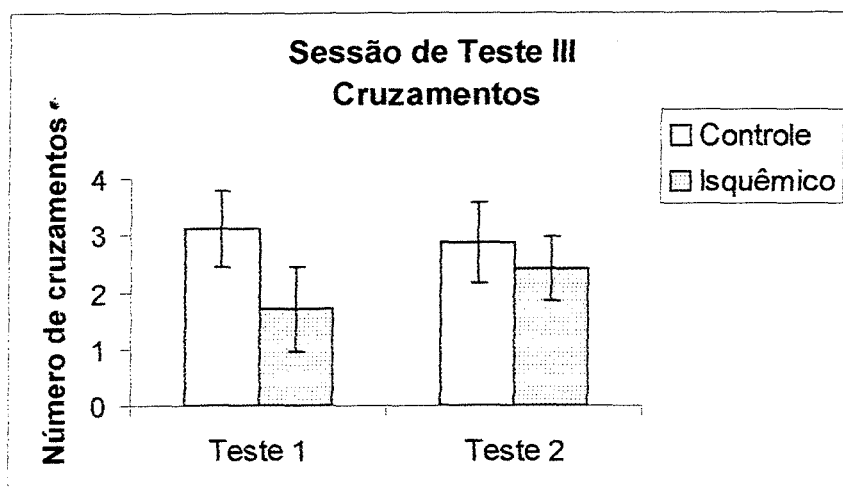


Figura 16- Média ( $\pm$  erro padrão) dos cruzamentos no local da plataforma após a Fase de Aquisição III do experimento I, no Labirinto Aquático.

### 3.1.4 FASE DE AQUISIÇÃO IV

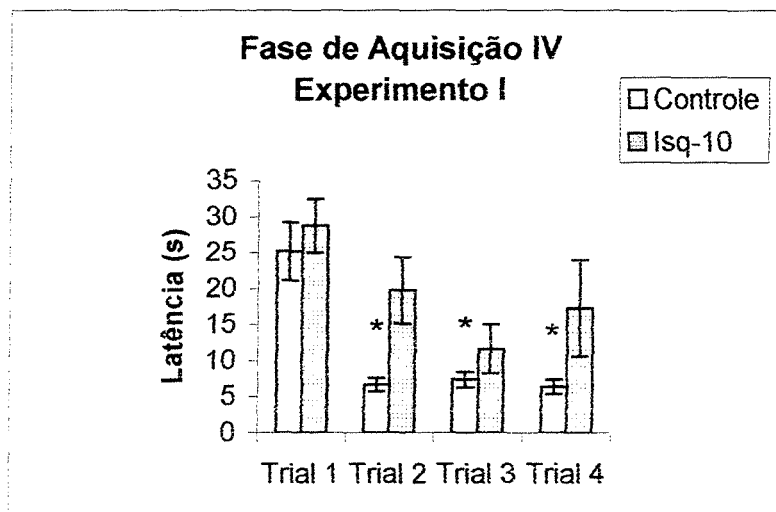


Figura 17 – Média ( $\pm$  erro padrão) das latências para encontrar a plataforma durante a Fase de Aquisição IV do experimento I, no labirinto aquático.

\*Diferença significativa em relação ao "trial" 1 do grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t.



Os resultados da fase de aquisição IV estão expressos na figura 17, onde as médias foram obtidas a partir das latências dos animais isquêmicos e animais controle em cada um das quatro tentativas (*trials*) nos quatro dias desta fase de aquisição. Observou-se que no grupo de animais controle houve uma diferença significativa no tempo gasto para alcançar a plataforma da primeira para a segunda tentativa (*trial*) ( $p \leq 0,05$ ), tendo a média diminuída de 24,0 para 6,9 segundos neste grupo. No grupo isquêmico a diferença entre o tempo gasto na primeira tentativa comparada com a segunda não foi significativa.

## **3.2 EXPERIMENTO 2**

### **3.2.1 FASE DE AQUISIÇÃO I**

Analisando o desempenho dos animais durante a fase de aquisição I deste experimento, podemos observar que houve diferença significativa entre os grupos controle (grupos controle e controle cirúrgico) comparados ao grupo isquêmico 10 minutos quanto à latência para encontrar a plataforma ( $p \leq 0.05$ ) do segundo até o quinto dia de treino (Figura 18).

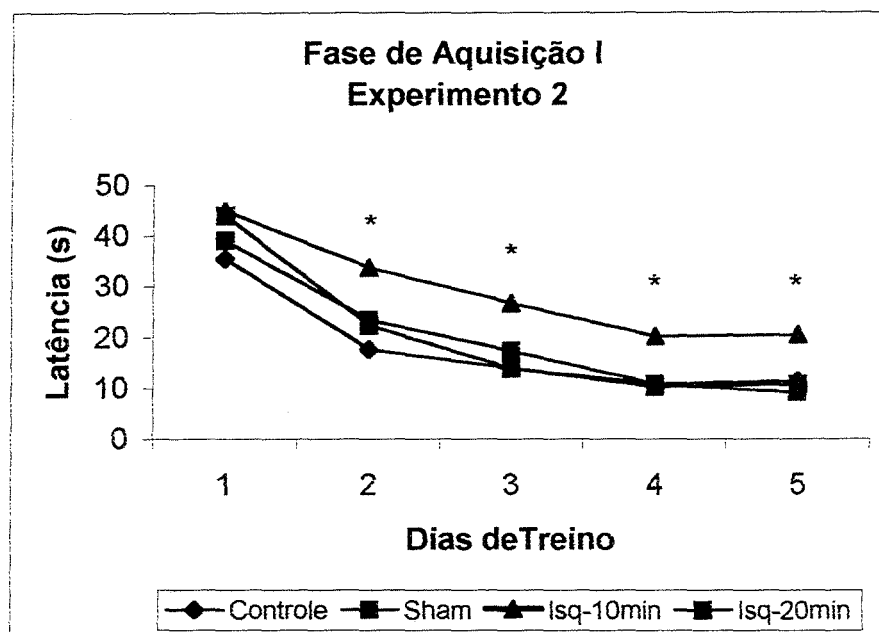


Figura 18- Media das latências para encontrar a plataforma na Fase de Aquisição I do experimento 2, no labirinto aquático.

\* Diferença significativa em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Duncan.

A análise da sessão de teste I (*probe trial* I) do experimento 2, realizado após a fase de aquisição I, demonstra que não houve diferença significativa quanto ao tempo gasto no quadrante-alvo no teste 1 comparado ao teste 2, nos quatro grupos (figuras 19). Quanto ao número de cruzamentos, houve diferença significativa no grupo controle, do primeiro para o segundo teste ( $p \leq 0,05$ ), havendo uma diminuição do número de cruzamentos, demonstrando extinção do aprendizado. (figura 20).

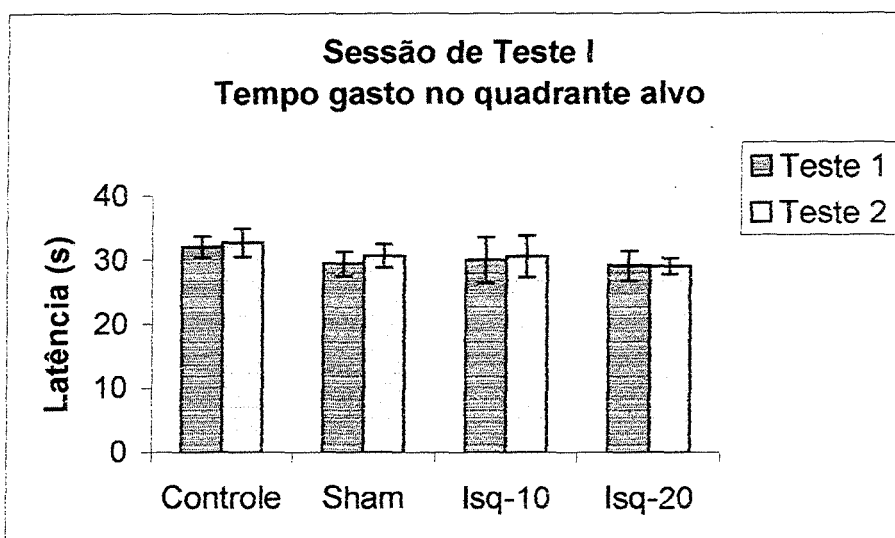


Figura 19- Média ( $\pm$  erro padrão) do tempo gasto no quadrante alvo, nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição I do experimento 2, no labirinto aquático.

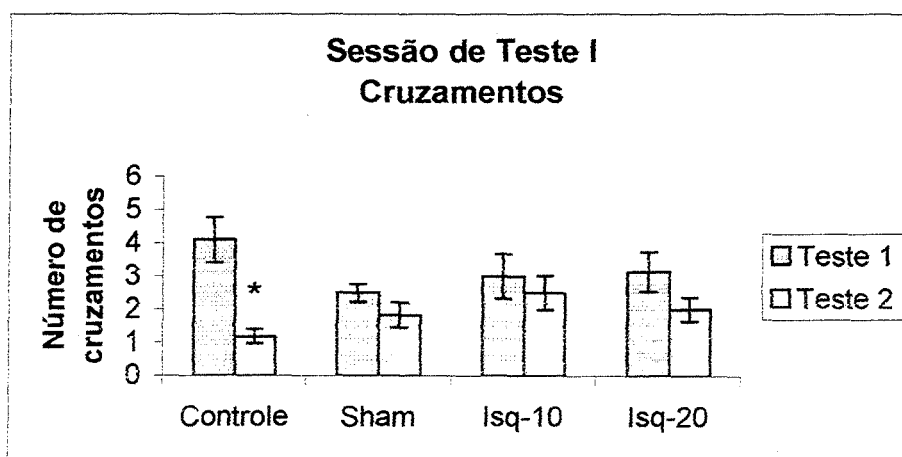


Figura 20- Média ( $\pm$  erro padrão) dos cruzamentos nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição I do experimento 2, no labirinto aquático.

\* Diferença significativa no grupo controle do teste 1 para o teste 2,  $p \leq 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Duncan.

### 3.2.2 FASE DE AQUISIÇÃO II

Os resultados da latência para encontrar a plataforma durante a fase de aquisição II do experimento 2 são mostrados na figura 21. A partir dos resultados, se observa que houve diferença significativa entre o desempenho dos animais do grupo controle e dos isquêmicos 10 minutos nos dias 1 e 4 de treino ( $p \leq 0,05$ ), não havendo diferenças entre o grupo controle e o grupo de animais isquêmicos 20 minutos.

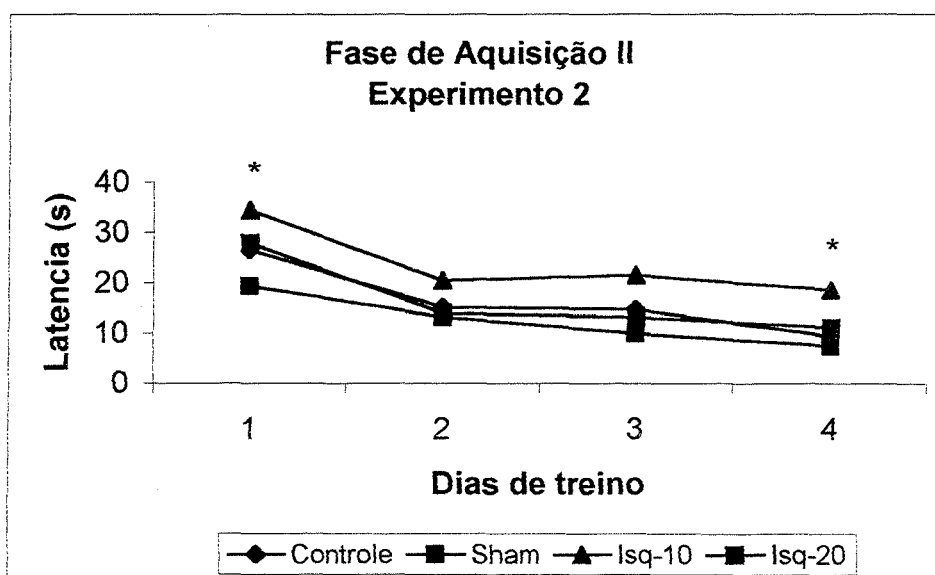


Figura 21- Latência para encontrar a plataforma na Fase de Aquisição II do experimento II, no Labirinto Aquático.

\* Diferença significativa entre o grupo controle e o isq-10 no primeiro e quarto dia de treino,  $p \leq 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Duncan.

A partir dos resultados da sessão de teste II (*probe trial II*) deste experimento (figura 22), observou-se que não houve diferença significativa entre o tempo gasto pelos animais, nesta sessão de teste, no quadrante alvo. Quanto ao

número de cruzamentos realizados também não houve diferença entre os grupos de animais controle, controle cirúrgico, isquêmicos 10 e isquêmicos 20 minutos (figura 23).

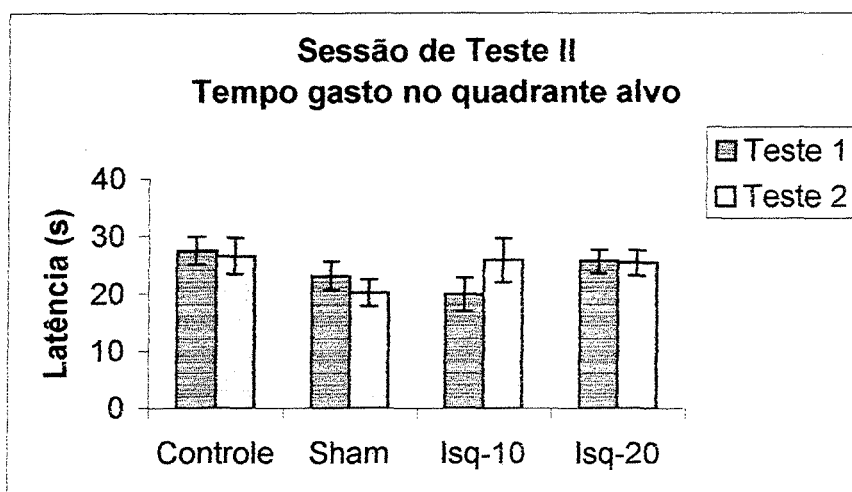


Figura 22- Média ( $\pm$  erro padrão) do tempo gasto no quadrante alvo, nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição II do experimento II, no labirinto aquático.

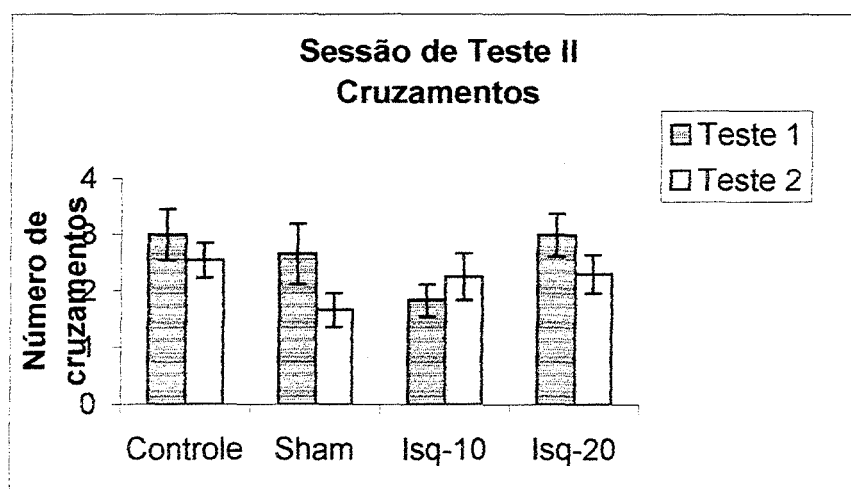


Figura 23- Média ( $\pm$  erro padrão) dos cruzamentos nos testes 1 e 2, após a Fase de Aquisição II do experimento II, no labirinto aquático.

### 3.2.3 FASE DE AQUISIÇÃO III

Os resultados da fase de aquisição III estão expressos na figura 24, onde as médias foram obtidas a partir das latências dos animais dos diferentes grupos em cada uma das quatro tentativas ("trials") dos quatro dias de aquisição. Observou-se que houve diferença significativa entre as latências dos animais controle e controle cirúrgico da primeira para a segunda tentativa ( $p \leq 0,05$ ). Não houve diferença entre os animais isquêmicos 10 comparados com os isquêmicos 20 minutos quanto à latência quando comparados a primeira com a segunda tentativa.

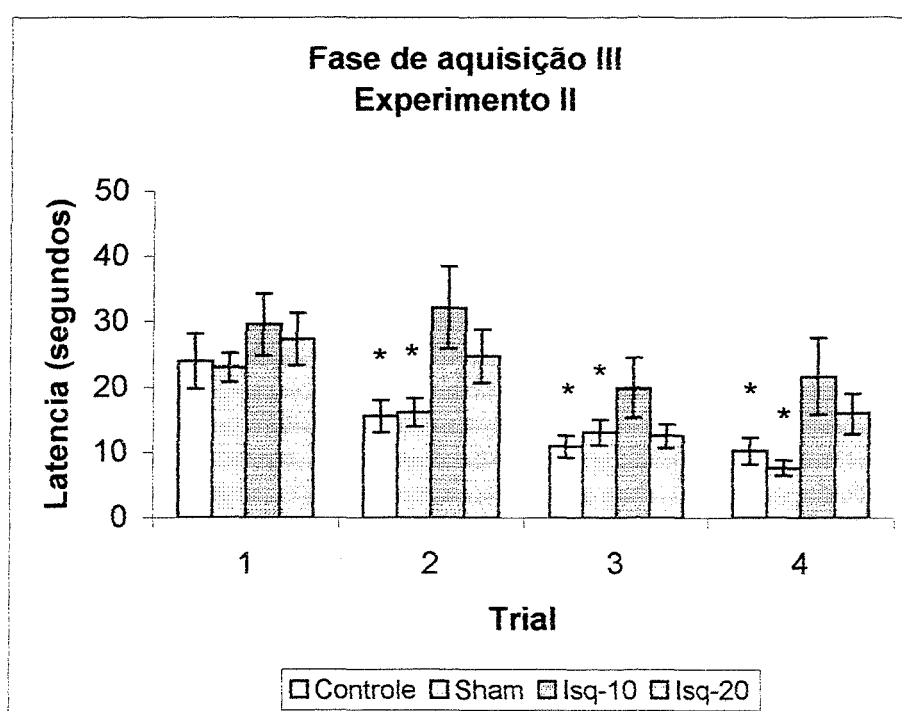


Figura 24 – Média ( $\pm$  erro padrão) das latências para encontrar a plataforma em diferentes locais a cada dia durante a Fase de aquisição III do experimento 2, no labirinto aquático.

\* Diferença significativa em relação ao trial 1 do grupo controle e controle cirúrgico,  $p \leq 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Duncan.

### 3.3 ANÁLISE VOLUMÉTRICA

Para a análise volumétrica foi avaliado somente o volume da região do subcampo CA1 do Corno de Ammon do hipocampo por ser esta região mais vulnerável a lesão por isquemia global em ratos (PULSINELLI et al, 1982; NETTO et al, 1993; HSU et al, 1998).

Os dados demonstrados a seguir são resultados da análise do volume do CA1 do hipocampo nos encéfalos analisados dos animais do grupo controle, controle cirúrgico, isquêmico 10 minutos e isquêmico 20 minutos estudados no experimento 2. A figura 25 (A, B, C e D) apresenta cortes representativos corados pela técnica de hematoxilina e eosina do hipocampo de ratos adultos dos respectivos grupos analisados neste estudo, os quais foram submetidas à análise estereológica pelo método baseado no princípio de Cavalieri (HOWARD e REED, 1998). Pode-se observar na figura 25 (C e D) alterações morfológicas no CA1 do hipocampo com redução do volume desta região em animais dos grupos submetidos à isquemia cerebral global por 10 e 20 minutos pelo modelo de 4VO.

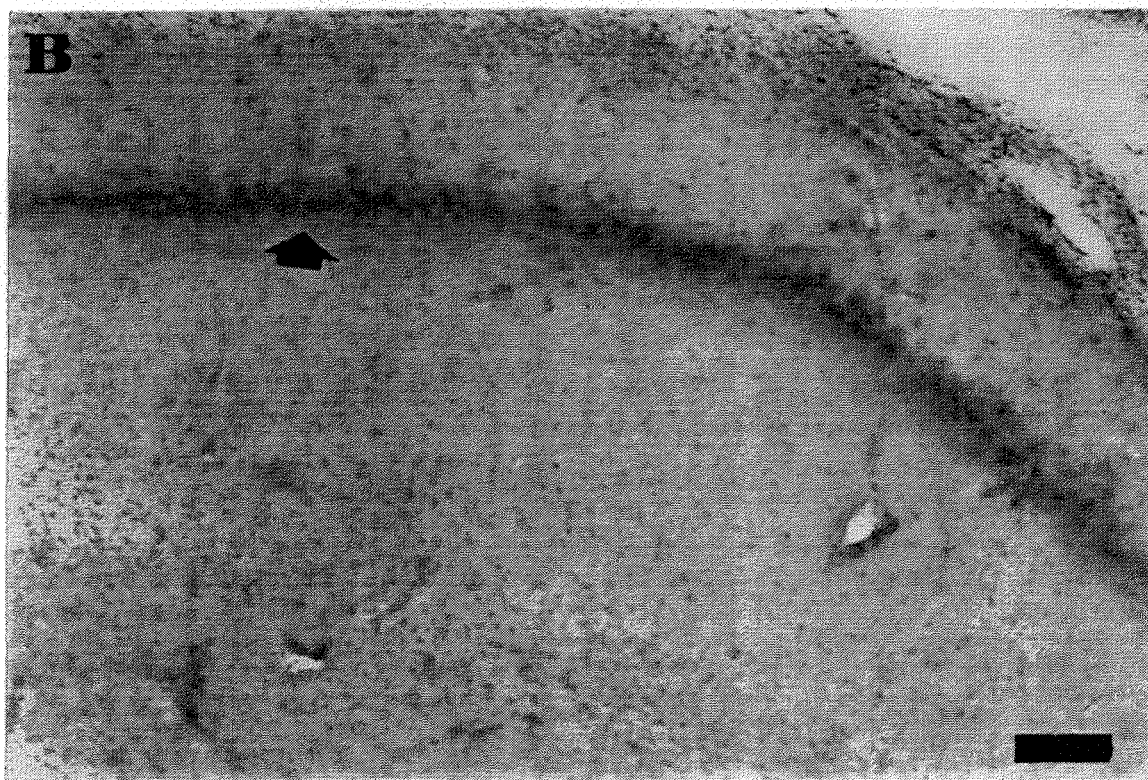
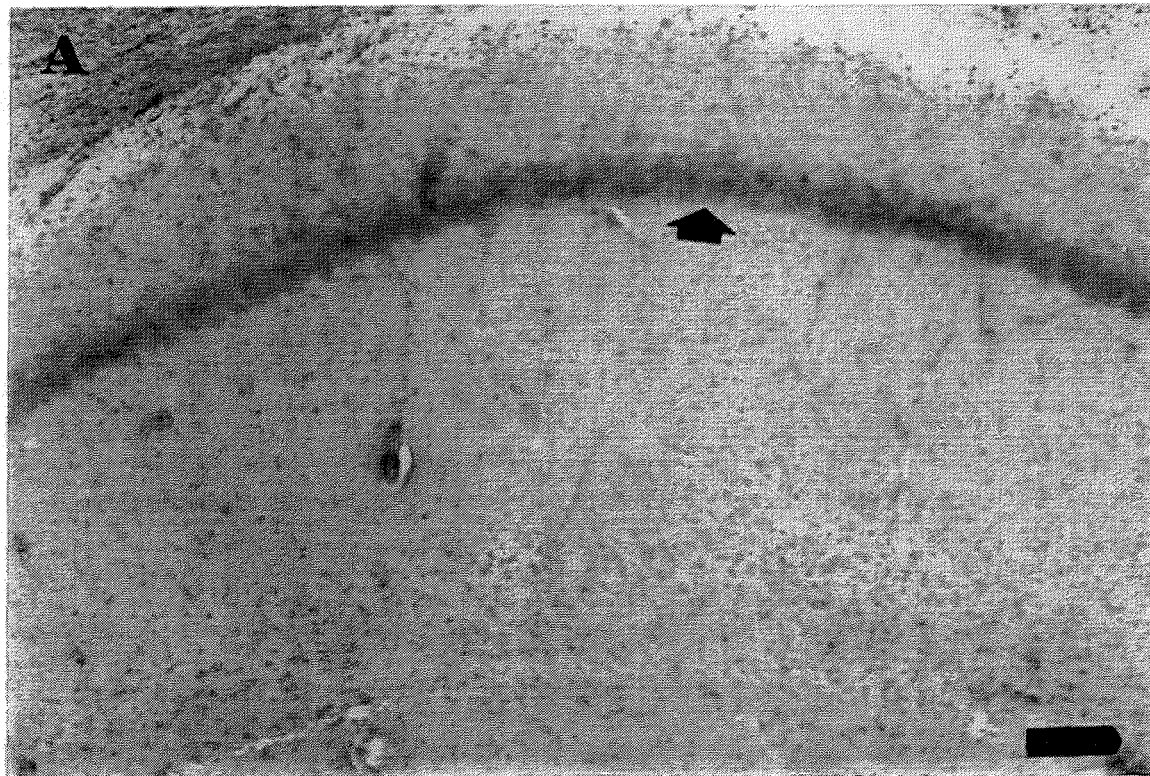
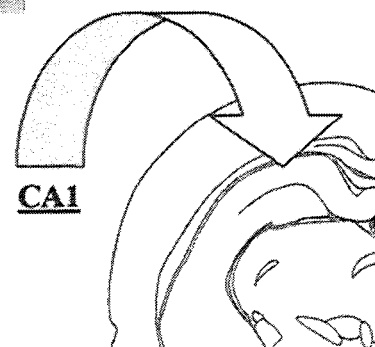


Figura 25 A- Fotomicrografia da camada piramidal da região do CA1 do Hipocampo de animais do grupo controle. Observar que não houve alteração no volume desta região. Barra de calibração= 100  $\mu$ m.

B- Fotomicrografia da camada piramidal da região do CA1 do Hipocampo de animais do grupo controle cirúrgico. Observar que não houve alteração no volume desta região. Barra de calibração= 100  $\mu$ m.





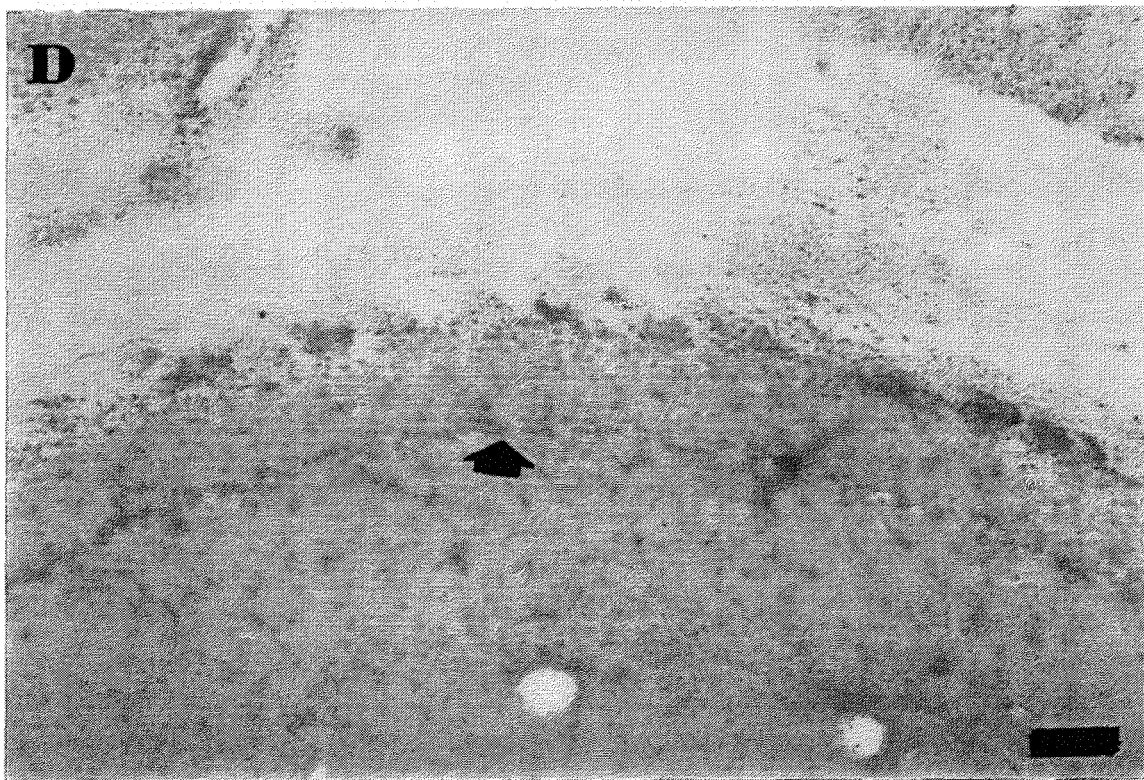
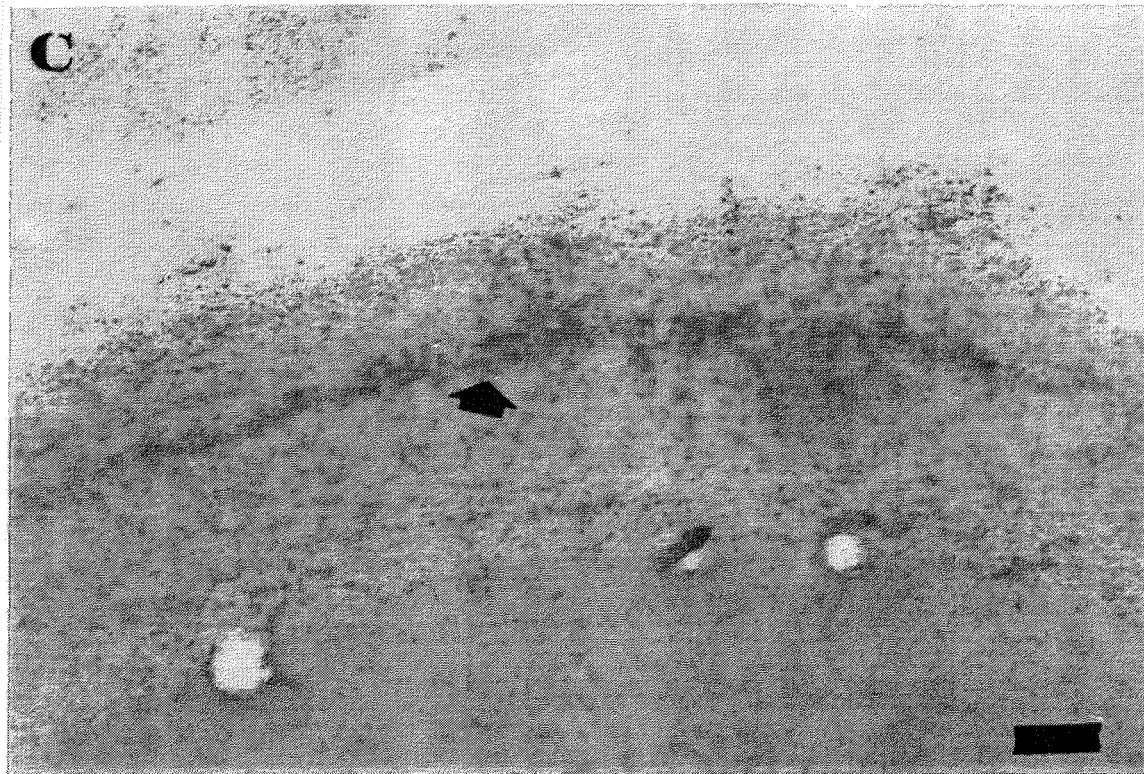
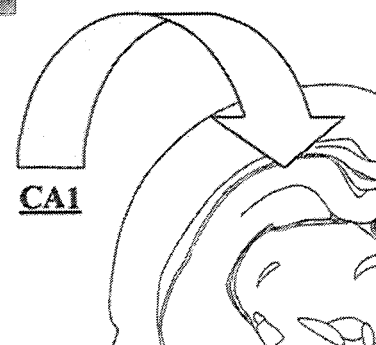


Figura 25 C- Fotomicrografia da camada piramidal da região do CA1 do Hipocampo de animais do isquêmico 10 minutos. Observar que houve redução do volume desta região. Barra de calibração= 100  $\mu$ m.

D- Fotomicrografia da camada piramidal da região do CA1 do Hipocampo de animais do grupo isquêmico 20 minutos. Observar que houve redução significativa do volume desta região. Barra de calibração= 100  $\mu$ m.



Os resultados da análise volumétrica realizada são mostrados na figura

26.

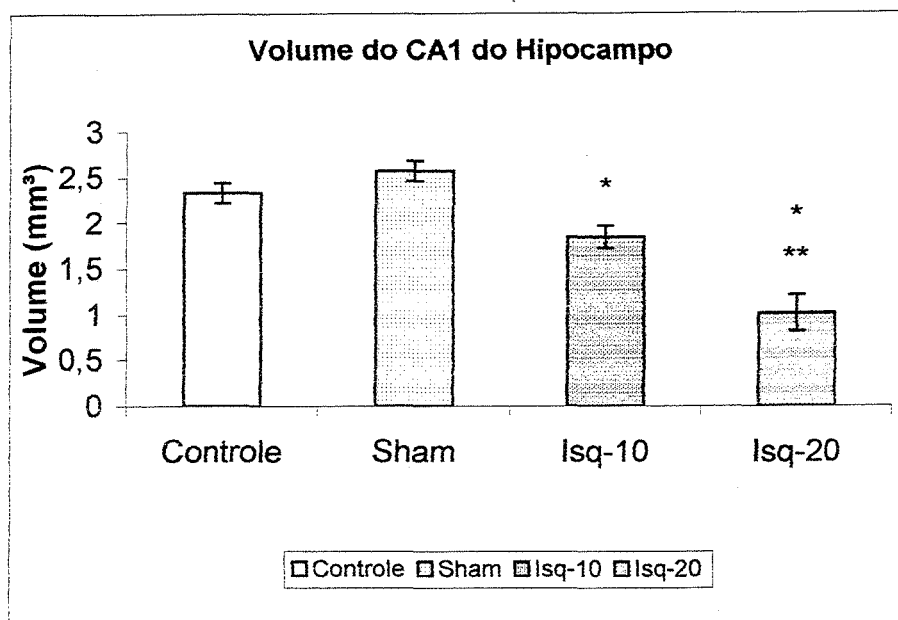


Figura 26 – Volume da região do CA1 do hipocampo nos animais do experimento II.

\* Diferença significativa em relação aos grupos controle e sham,  $p \leq 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Tukey.

\*\* Diferença significativa em relação ao grupo isq-10 minutos,  $p \leq 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Tukey.

A partir da análise do volume pelo princípio de Cavalieri pudemos observar que não houve diferença significativa entre o volume da região do CA1 do hipocampo dos grupos controle e controle cirúrgico como esperado, pelo fato destes animais não terem sido submetidos a um insulto isquêmico durante este estudo.

Quando comparado o volume do CA1 hipocampal dos animais do grupo controle (controle + controle cirúrgico) com os animais submetidos a uma isquemia cerebral global por 10 minutos houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), tendo os animais isquêmicos apresentado uma redução do volume desta região provocada pela isquemia global.

A análise volumétrica entre os animais isquêmicos submetidos a diferentes tempos de isquemia neste estudo (10 e 20 minutos) demonstrou diferença significativa entre estes grupos ( $p \leq 0,05$ ). Estas diferenças confirmam que a isquemia global provoca uma lesão isquêmica em região do CA1 do hipocampo e que o volume desta lesão isquêmica aumenta conforme aumenta o tempo de oclusão das artérias cerebrais realizado no modelo de isquemia cerebral global estudado neste trabalho.

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS**

A isquemia global leva a conseqüências comportamentais as quais são vistas principalmente em tarefas que examinam o aprendizado e a memória. A capacidade sensório-motora é afetada somente por 24 a 48 horas, entretanto, os déficits no aprendizado e memória são de longa duração (BLOCK, 1999).

O labirinto aquático de Morris é um método padrão para a investigação do aprendizado espacial em roedores (MORRIS, 1984; NETTO et al., 1993; BLOCK E SCHWARZ, 1998). Estes animais em condições normais, sob uma série de treinos para localizar a plataforma, nos quais são liberados de locais variados a cada treino, tornam-se progressivamente melhores para achar a plataforma e rapidamente aprendem a nadar em direção à plataforma mesmo saindo de qualquer posição em que sejam colocados inicialmente (PRUSKY et al, 2000; ROBINSON et al, 2001).

No presente trabalho, os animais foram submetidos a uma tarefa de aprendizado espacial no labirinto aquático com fases de aquisição onde deveriam localizar uma plataforma submersa em um dos quadrantes do tanque e, a uma sessão de teste, onde eram testados quanto à retenção do aprendizado e a resistência à extinção do aprendizado espacial. Os animais foram divididos em grupos controle e grupo isquêmico.

Na fase de aquisição I do experimento 1, os animais estudados apresentaram uma diminuição da latência para encontrar a plataforma submersa entre os dias 1 e 6 de treino, demonstrando que houve aprendizado destes no decorrer dos treinos tanto no grupo controle quanto no grupo isquêmico 10 minutos (figura 6). Esta diminuição da latência para encontrar a plataforma é um parâmetro observado na fase de aquisição que indica a habilidade dos animais em aprender a tarefa proposta e determina o aprendizado espacial de ratos no Labirinto Aquático de Morris (MORRIS, 1984).

Estes resultados confirmam o que foi proposto por BLOCK (1999) e DE BRUIN et al (1997) que estabelece que tanto os animais do grupo controle quanto os animais isquêmicos são hábeis em encontrar a plataforma durante as tentativas de escape e que, com o aumento do número de treinos, a latência de escape diminui em ambos os grupos, demonstrando assim habilidade destes animais em aprender esta tarefa. Para DEVAN e McDONALD (2001), os ratos adquirem simultaneamente informações sobre as dicas (quando a plataforma é visível) e o lugar no qual a

plataforma estava localizada (quando a plataforma é invisível) durante o treinamento, possibilitando o aprendizado espacial.

Os ratos podem aprender a tarefa no labirinto aquático em poucos dias, mas os ratos com lesão hipocampal permanecem deficientes nesta tarefa (DE BRUIN et al, 1997). Durante as fases de aquisição II e III do experimento 1, observamos que, mesmo com a diminuição da latência para localizar a plataforma apresentada pelos animais controle e isquêmicos, o que demonstra o aprendizado da tarefa ao longo dos treinos a que foram submetidos nestas fases de aquisição, os animais do grupo controle apresentaram um melhor desempenho, comparado ao grupo submetido à isquemia cerebral global transitória por 10 minutos (figura 14).

Os animais isquêmicos, apesar de aprenderem a tarefa proposta, apresentaram déficit no aprendizado espacial, demonstrado pela maior latência para encontrar a plataforma submersa ao contrário dos animais do grupo controle que apresentaram latências menores com diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre estes grupos. Estes achados também já foram observados por outros grupos que estudaram a isquemia e o déficit no aprendizado espacial como HAGAN e BEAUGHARD (1990), GREEN e cols. (1997), BLOCK e SCHWARTZ (1998) e BLOCK (1999).

Assim, nossos resultados confirmam que a isquemia cerebral global transitória leva a um déficit no aprendizado espacial.

Ratos com lesão hipocampal demonstram déficit no aprendizado espacial em comparação aos animais controle, uma vez que eles nadam repetidamente ao longo da parede do tanque ou atravessam o tanque ao acaso e não apresentam preferência pelo quadrante alvo (SAVE e POU CET, 2000). Este comportamento dos animais isquêmicos pode explicar o aumento na latência de escape em relação à latência apresentada pelos animais controles no nosso experimento. Estes autores também referem que ratos com lesão hipocampal apresentam déficit quando em condições de referência distal no labirinto aquático e, menos déficit em condições proximais. Em nosso estudo, os animais foram submetidos a condições de aprendizado com referências distais no labirinto aquático uma vez que a plataforma não era visível e somente nas paredes da sala onde se encontrava o labirinto aquático havia dicas externas, podendo justificar assim nossos resultados com os animais isquêmicos.

MIZUMORI e cols. (1995) observaram que ratos isquêmicos depois de treinados no labirinto radial aprenderam a tarefa de aprendizado espacial igualmente aos animais controles cirúrgicos, indicando que estes animais isquêmicos recuperam a habilidade do aprendizado espacial previamente deficitária.

Evidências encontradas por STEELE e MORRIS (1999) sugerem que os ratos podem realizar perfeitamente uma tarefa espacial quando estão amplamente familiarizados com o tanque e quando submetidos a pequenos intervalos entre os

treinos. Este fato também explica como, mesmo os animais com lesão isquêmica do nosso experimento, apresentaram o aprendizado das tarefas do labirinto aquático.

Para a análise da retenção do aprendizado da tarefa espacial e para examinar a resistência à extinção dos animais isquêmicos proposta neste trabalho, foram realizados dois testes (teste 1 e teste 2) em cada sessão de teste, sem a plataforma. O teste 1 para avaliar a retenção dos animais quanto à localizar o local onde havia anteriormente a plataforma submersa, e o teste 2, para examinar a resistência à extinção deste aprendizado. Durante a sessão de teste, além do tempo gasto pelos animais no quadrante alvo onde estava anteriormente a plataforma, outra medida de memória é o número de cruzamentos no local da plataforma (BLOCK, 1999).

Como resposta ao aprendizado, esperava-se em nosso estudo que no teste 1, os animais que retiveram a informação gatassem mais tempo no quadrante alvo e realizassem um maior número de cruzamentos no local da plataforma, porém no teste 2, os animais deveriam diminuir tanto o tempo gasto no quadrante quanto o número de cruzamentos, evidenciando assim, o aprendizado e a extinção da tarefa.

Durante as sessões de teste, observamos que houve esta tendência dos animais do grupo controle de diminuir, do primeiro para o segundo teste, o tempo gasto no quadrante alvo e de cruzarem menos no local onde anteriormente estava



localizada a plataforma (figuras 9, 10, 12, 13, 15 e 16). Os animais submetidos à isquemia, porém apresentaram uma tendência a manter ou aumentar o número de cruzamentos e de diminuir o tempo gasto no quadrante alvo. Com estes resultados, podemos sugerir que os animais controle aprenderam a tarefa proposta, evidenciado pelos resultados no teste 1 e, que extinguiram o aprendizado desta tarefa no teste 2, e que os animais isquêmicos submetidos a isquemia por 10 minutos apresentaram um déficit no aprendizado e uma tendência à resistência à extinção durante o teste 2 da sessão de teste.

Os achados com os animais isquêmicos estão de acordo com BLOCK (1999), que refere que os isquêmicos durante as sessões de teste gastam significativamente menos tempo no quadrante onde estava anteriormente a plataforma e gastam também mais tempo nos outros quadrantes e que cruzam menos sobre o local da plataforma.

Durante a fase de aquisição IV do experimento 1, a plataforma foi colocada em um local diferente a cada dia de treino, a fim de avaliarmos a capacidade dos animais de aprenderem a cada treino uma nova posição da plataforma, avaliando desta maneira, a memória de trabalho (*working memory*) destes animais.

Foram analisadas, portanto as médias das latências entre a primeira e a segunda tentativa de escape (*trials*) (figura 17), a fim de observarmos se os animais

conseguiram aprender a cada dia, da primeira para a segunda tentativa, que a plataforma havia sido trocada de localização a cada dia de treino, testando assim a memória de trabalho nestes animais. Observamos que os animais do grupo controle diminuíram significativamente a latência da primeira para a segunda tentativa a cada dia de treino ( $p \leq 0,05$ ), sugerindo aprendizado espacial e memória de trabalho preservada nestes. Os animais isquêmicos, porém não apresentaram redução significativa nas latências entre a primeira e a segunda tentativa, demonstrando tanto déficit no aprendizado espacial quanto na memória de trabalho. Segundo NETTO e cols. (1993), a memória de trabalho pode ser testada no labirinto aquático de Morris neste tipo de tarefa proposta nesta fase de aquisição e em seu trabalho observaram que os animais isquêmicos sofrem prejuízo neste tipo de memória. Em nossos resultados, os animais isquêmicos não diminuíram significativamente a latência de escape entre uma tentativa e outra sugerindo também um prejuízo na memória de trabalho.

Analisando os resultados dos animais dos grupos controle, controle cirúrgico, isquêmicos-10 minutos e isquêmicos-20 minutos durante a fase de aquisição I do experimento 2 pudemos observar, assim como no experimento 1, que todos os grupos apresentaram uma diminuição da latência para localizar a plataforma ao longo dos treinos, indicando o aprendizado espacial destes animais (figura 18).

Ao final desta fase, a diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) demonstrada entre os grupos controle e controle cirúrgico em comparação com os animais isquêmicos submetidos à isquemia global por 10 minutos, confirma os achados de que a lesão hipocampal provocada pela isquemia cerebral global utilizada neste estudo provoca um déficit no aprendizado espacial em tarefas no labirinto aquático de Morris, conforme observado também por BLOCK (1999) que refere que os animais isquêmicos requerem mais tempo para encontrar a plataforma e que este aumento na latência apresentado pelos animais isquêmicos levam a interpretação de que a isquemia global provoca a um déficit no aprendizado espacial e, que este déficit está relacionado com a lesão seletiva em região de CA1 do hipocampo.

Outros estudos como os de NUNN e cols. (1994), NELSON e cols. (1997) e BLOCK e SCHWARZ (1998) utilizando o modelo de 4VO para reproduzir isquemia global por 5, 10, 15, 20 e 30 minutos e tarefas no labirinto aquático, observaram também que os animais isquêmicos aprenderam a tarefa proposta porém evidenciando um déficit no aprendizado espacial.

A latência aumentada dos ratos isquêmicos pode ser explicada pela correlação existente entre a quantidade de nado ao longo das paredes do tanque e a lesão neuronal hipocampal. Esta estratégia é utilizada por estes animais como forma de resolver esta tarefa, ou seja, demoram mais tempo nadando ao redor do tanque antes de atravessarem o tanque a fim de localizarem a plataforma, diferente dos

animais controle ou controle cirúrgico (BLOCK e SCHWARZ, 1998). Durante as fases de aquisição e sessões de teste dos experimentos realizados neste estudo, podemos também observar esta tendência dos animais isquêmicos de nadarem inicialmente ao longo das paredes do tanque para somente depois começarem a cruzar o labirinto aquático na tentativa de localizarem a plataforma.

Durante a fase de aquisição II deste experimento, observou-se que os animais que foram submetidos à isquemia global por 10 minutos quando comparados com os animais do grupo controle apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) no tempo gasto para encontrar a plataforma no primeiro e quarto dia de treinos (figura 21) assim como na fase de aquisição I, demonstrando novamente o déficit causado pela lesão isquêmica nestes animais. Nesta fase, os animais do grupo cirúrgico mantiveram sua performance semelhante aos animais do grupo controle de acordo com os resultados também encontrados por BLOCK e SCHWARZ (1998) que demonstrou que estes animais assim como os animais do grupo controle não apresentaram lesão neuronal e, portanto não poderiam exibir déficits no aprendizado espacial no labirinto aquático de Morris.

Os animais do grupo isquêmico 20 minutos, quando comparados aos do grupo controle não apresentaram diferença significativa ao final dos treinos durante a fase de aquisição II. Estes animais, ao final do quarto dia de treino, apresentaram latências semelhantes aos animais do grupo controle e controle cirúrgico. Estes

resultados diferem dos resultados encontrados por JASPERS e cols. (1990) e NELSON e cols. (1997) que observaram déficit no labirinto aquático após submeterem ratos a uma isquemia global por 20 minutos. KIYOTA e cols. (1991), porém, submetendo ratos a uma isquemia pelo modelo de 4VO de 5 e 20 minutos também não observaram déficit no aprendizado espacial destes animais.

Este resultado pode ser explicado por BLOCK e SCHWARZ (1998), que referem que os animais isquêmicos apesar de apresentarem uma latência de escape maior, estes aprendem esta tarefa e, que a diferença entre os grupo controle e o isquêmico é maior no início dos testes comportamentais no labirinto aquático e que esta diferença diminui com o aumento do número de treinos. Para EICHENBAUM e cols. (1994), se os ratos isquêmicos iniciarem as sessões de treino sempre da mesma posição, eles podem aprender a localizar a plataforma tão eficientemente quanto os animais do grupo controle. Este procedimento não foi realizado durante o nosso estudo, porém os ratos foram treinados para achar a plataforma em um mesmo local durante, no mínimo, quatro dias com quatro tentativas cada e, como esta já era a segunda fase de aquisição a que estes animais estavam sendo submetidos, podemos pensar que tanto os animais isquêmicos quanto os sem lesão neuronal estavam familiarizados com este tipo de tarefa e com o ambiente do labirinto aquático, podendo este fato explicar o porque do bom desempenho dos animais isquêmicos 20 minutos nesta fase.

De acordo com MODO e cols. (2000), em seu estudo com animais submetidos à isquemia pelo modelo de 4VO por 15 e 25 minutos, efeitos quanto ao aprendizado espacial entre os grupos isquêmicos e controle não foram significativos, sugerindo que a lesão isquêmica hipocampal interrompe o aprendizado da discriminação condicional, porém não da tarefa simples no labirinto aquático de Morris.

Nas sessões de teste realizadas após as fases de aquisição I e II do experimento 2, somente na sessão de teste I houve diferença significativa quanto aos cruzamentos no teste 1 e 2 dos animais controles ( $p \leq 0,05$ ). Nas demais sessões de teste, não foram observadas significativas diferenças entre os grupos controle, controle cirúrgico, isquêmico 10 minutos e isquêmico 20 minutos, tanto no tempo gasto no quadrante alvo quanto no número de cruzamentos no local da plataforma (figuras 19, 20, 22 e 23). Quanto ao tempo gasto no quadrante alvo durante o primeiro teste que avaliava a retenção do aprendizado espacial houve uma tendência dos animais do grupo controle em apresentarem maior latência em relação aos isquêmicos e um maior número quanto aos cruzamentos, sugerindo um melhor desempenho no labirinto aquático destes animais. Já no segundo teste, que avaliava a resistência à extinção, houve uma tendência dos animais do grupo controle e controle cirúrgico de diminuir suas latências e, dos animais isquêmicos em aumentarem as latências ou permanecerem iguais ao teste anterior, sugerindo uma resistência à extinção conforme esperado.

BLOCK (1999), refere que durante a sessão de teste os ratos controle gastam 50% do tempo dentro do quadrante onde estava anteriormente a plataforma (quadrante alvo) sugerindo que os mesmos lembravam da localização em que estava a plataforma durante os treinos e, que os ratos isquêmicos, gastam significativamente menos tempo no quadrante alvo e mais tempo nos outros quadrantes, demonstrando assim, o déficit no aprendizado espacial.

Quanto ao número de cruzamentos no local da plataforma, outro parâmetro para avaliar o aprendizado dos animais submetidos a tarefas de aprendizado espacial no labirinto aquático, a tendência foi de um maior número de cruzamentos dos animais controles e controles cirúrgicos em relação aos isquêmicos 10 minutos durante o primeiro teste, evidenciando retenção da tarefa espacial e, de diminuir os cruzamentos nos grupo controle e aumentar ou permanecer semelhante o número de cruzamentos no grupo dos animais isquêmicos, quando comparado o segundo teste com o primeiro.

Esta diminuição do número de cruzamentos pelos animais controle e controle cirúrgico indica a capacidade destes animais de extinguirem o aprendizado anteriormente adquirido e, o aumento do número de cruzamentos evidenciado pelos isquêmicos 10 minutos, sugere uma resistência à extinção do aprendizado desta tarefa espacial no labirinto aquático. Durante o segundo teste, os animais controles e os controles cirúrgicos diminuíram o número de cruzamentos e, os animais isquêmicos 10

minutos aumentaram o número de cruzamentos, confirmando o que foi observado por BLOCK (1999) de que os animais isquêmicos cruzam menos sobre o local onde se localizava a plataforma anteriormente.

Estes achados durante as sessões de teste do experimento 2 estão de acordo com os resultados encontrados por HAGAN e BEAUGHARD (1990), JASPERS e cols. (1990), NUNN e cols. (1994), NELSON e cols. (1997) E BLOCK e SCHWARTZ (1998) que observaram déficit no aprendizado espacial em animais submetidos a diferentes tempos de isquemia cerebral global.

Em nossos resultados, porém, observamos que os animais submetidos à isquemia global por 20 minutos apresentaram um melhor desempenho durante as fases de aquisição e sessões de teste no experimento 2, comparados com os animais submetidos ao tempo de 10 minutos. Estes achados estão de acordo com BLOCK e SCHWARTZ (1998) que em seus estudos submeteram ratos a uma isquemia global pelo modelo de 4VO, observando que esta isquemia afetava de 20 a 30 % dos neurônios do estriado mas que não era suficiente para induzir a déficits no aprendizado espacial e por NUNN e cols. (1994), que não encontrou relação entre a lesão neuronal no estriado e a latência de escape durante os treinos para localizar a plataforma submersa.



A partir dos resultados da fase de aquisição III do experimento 2, onde se avaliou também a resistência à extinção e a memória de trabalho dos animais do grupo controle, controle cirúrgico e dos isquêmicos 10 e 20 minutos em condições semelhantes ao experimento 1, ao analisar as médias das latências destes grupos em cada uma das tentativas durante os quatro dias de treino que consistiram esta fase, observou-se que os animais do grupo controle e controle cirúrgico apresentaram latências menores a partir da segunda tentativa de escape, assim como durante a terceira e quarta tentativas e que os isquêmicos tenderam a latências maiores durante os treinos (figura 24). Estas latências foram significativas ( $p \leq 0,05$ ) quando comparadas as dos animais do grupo que foram submetidos à isquemia por 10 minutos, sugerindo que estes animais apresentaram um déficit na memória de trabalho.

O hipocampo dorsal está envolvido em muitas tarefas espaciais e conforme MARUKI e cols. (2001) sugerem, ele também está envolvido na memória de trabalho. Isto leva-nos a concluir que uma lesão hipocampal causada por uma isquemia global causará um dano neste tipo de memória em ratos submetidos à isquemia, explicando assim os nossos resultados encontrados tanto na fase de aquisição IV do experimento 1 quanto na fase de aquisição III do experimento 2.

Os animais do grupo isquêmico 20 minutos, porém, apesar de uma tendência a apresentarem latências maiores comparados com os animais controles na fase de aquisição III, não tiveram diferença significativa, sugerindo que a isquemia

global produzida pelo modelo de 4VO por 20 minutos não induziu a um prejuízo na memória de trabalho destes animais. Isto talvez pelo mesmo motivo explicado por BLOCK e SCHWARTZ (1998) de que este tempo de isquemia causa uma morte neuronal não localizada somente em região de CA1 do hipocampo como na isquemia global de 10 minutos, mas que envolve uma lesão neuronal no estriado e que isto possibilita a utilização de outras estratégias para solucionar a tarefa no labirinto aquático.

Quanto ao aprendizado espacial observou-se que os animais controle e controle cirúrgico em ambos os experimentos evidenciaram um bom desempenho caracterizado pela performance normal na tarefa no labirinto aquático e, que os animais isquêmicos (10 e 20 minutos) apresentaram um prejuízo neste tipo de aprendizado, confirmando resultados anteriores e afirmando a relação da isquemia cerebral global com o hipocampo e deste com o aprendizado espacial.

Quanto à resistência à extinção de tarefas no labirinto aquático de Morris, observamos que os animais submetidos a uma isquemia cerebral global através do modelo de 4VO por 10 minutos, tanto no experimento 1 quanto no experimento 2, apresentaram uma resistência à extinção evidenciada pela tendência a maior tempo gasto no quadrante alvo e maior número de cruzamentos durante o segundo teste da sessão de teste comparado aos animais controle. Esta resistência, porém, não foi observada nos animais submetidos à isquemia global por 20 minutos.

## 4.2 VOLUME DO CA1 DO HIPOCAMPO

O hipocampo é formado pelo corno de Ammon (hipocampo propriamente dito) e o giro denteado com o hilo (MESULAM, 1985). Foi dividido por Lorent de Nó em três campos denominados CA1, CA2 e CA3. O corno de Ammon é formado pelas camadas oriens, piramidal, radial, lacunoso e molecular (AMARAL e WITTER, 1995)

Os neurônios piramidais do subcampo CA1 do hipocampo são altamente vulneráveis à isquemia cerebral global (HSU et al, 1998). Esta vulnerabilidade seletiva de CA1 faz com que animais após uma isquemia global apresentem uma perda de 80 a 85 % das células piramidais na região dorsal do CA1 e de 90 a 100 % de lesão no hipocampo dorsal (AUER et al, 1989; NETTO et al, 1993; OLSEN et al, 1994).

Como o hipocampo possui uma importante função no aprendizado e memória espacial, a lesão em região de CA1 leva a um déficit no aprendizado espacial (MORRIS et al, 1982).

Os resultados da análise do volume da camada piramidal de CA1 do hipocampo demonstraram que o modelo 4VO de isquemia cerebral global transitória provocou uma alteração no volume desta região específica (figura 25 C e D) o que não ocorreu no CA1 dos animais controles e controles cirúrgicos (figura 25 A e B). Os animais submetidos à isquemia por 20 minutos apresentaram uma redução significativa

do volume quando comparados aos animais submetidos a 10 minutos de isquemia ( $p \leq 0,05$ ) e uma importante redução ( $p \leq 0,01$ ), quando comparados aos animais controle e controle cirúrgico, que não sofreram o dano isquêmico (figura 23), possibilitando-nos sugerir que existe relação entre o tempo de oclusão das artérias cerebrais e o volume de lesão.

Estes achados estão de acordo com os resultados de NUNN e cols. (1991) que observaram lesão em células de CA1 após oclusão das artérias pelo modelo de 4VO em ratos por 15 e 30 minutos e com os de BLOCK e SCHWARZ (1998) que observaram que os animais isquêmicos apresentaram de 40 a 100 % de lesão neuronal em CA1 e que este déficit no aprendizado nestes animais isquêmicos tornam-se aparentes quando a lesão nesta região excede a 75 % da área.

Os valores de referência do volume da região do CA1 hipocampal de animais sem lesão isquêmica foram baseados nos resultados de MAIER e WEST (2001) que estimaram o volume desta região através do princípio de Cavalieri. Estes autores referem que o volume normal de referência do CA1 do hipocampo varia entre 1,9 e 2,1 mm<sup>3</sup>.

Nossos resultados da análise volumétrica dos animais sem lesão hipocampal se aproximaram dos resultados de MAIER e WEST (2001), tendo sido encontrados, neste estudo, um volume médio em torno de 2,45 mm<sup>3</sup> de volume da

região do CA1 hipocampal quando analisados os animais controle e os animais do grupo controle cirúrgico. Os animais submetidos à isquemia de 10 minutos e 20 minutos em nossos experimentos apresentaram média do volume de  $1,8 \text{ mm}^3$  e  $1,01 \text{ mm}^3$ , respectivamente, demonstrando redução do volume da região analisada, quando comparados com os animais controle.

A partir destes achados, esperávamos que tanto os animais submetidos a 10 minutos de isquemia, quanto os submetidos a 20 minutos em nosso trabalho, apresentassem déficit no aprendizado em todas as fases de aquisição e sessões de teste durante os experimentos realizados, o que não se confirmou.

Os animais isquêmicos 10 minutos estudados, apresentaram redução significativa do volume de CA1 por lesão isquêmica no hipocampo comparado aos animais controle. Durante os testes comportamentais realizados no experimento 1 e 2, demonstraram déficit no aprendizado espacial evidenciado por latências maiores durante as fases de aquisição e maior tempo gasto no quadrante alvo na sessão teste, estando nossos resultados de acordo com NUNN e cols. (1991) e NELSON e cols. (1997), que referem que é observada a lesão neuronal em hipocampo e déficit do aprendizado espacial no labirinto aquático após submeter ratos à 10 minutos de isquemia pelo modelo 4VO.

Estes nossos resultados confirmam que a lesão nas células piramidais da região de CA1 do hipocampo, provocada pelo modelo de isquemia utilizado neste trabalho, causa um déficit no aprendizado espacial de animais isquêmicos, conforme encontrado por NETTO e col. (1993) que estabeleceu uma relação entre a lesão de CA1 e o déficit no aprendizado espacial e por NELSON e cols. (1997) que observaram a relação da lesão isquêmica no CA1 com a latência de escape no Labirinto Aquático de Morris.

Já os animais isquêmicos 20 minutos, que apresentaram importante redução no volume de CA1 comparado com os animais controle ( $p \leq 0,001$ ) e com os animais 10 minutos ( $p \leq 0,01$ ), durante o experimento 2, não demonstraram importante déficit no aprendizado espacial durante as fases de aquisição e nas sessões de teste. Este achado contraria o proposto por MOSER e cols. (1993) e BLOCK (1999) sobre a correlação entre a lesão hipocampal e o déficit no aprendizado espacial e, entre o aumento do volume da lesão e o aumento do deste déficit e contrariando também nossa hipótese de que com o aumento do tempo de isquemia os animais submetidos aos 20 minutos de oclusão demonstrariam maior déficit nas tarefas do labirinto aquático.

O volume de lesão de menos de 20 % resulta em um déficit na memória espacial e, o aumento do volume de lesão leva a um aumento no déficit da memória espacial (MOSER et al, 1993). A duração da isquemia por 10 e 15 minutos induz a

lesão em CA1 e por 20 minutos, resulta em lesão em quase todo o setor de CA1 do hipocampo (PULSINELLI et al, 1982). O tamanho da lesão em CA1 varia entre 10 a 90 % nos animais isquêmicos e os animais com déficit no aprendizado de tarefas no labirinto aquático possuem lesão neuronal em CA1 de no mínimo 60 % (BLOCK, 1999).

Uma isquemia global por 20 minutos afeta cerca de 20 a 30 % de neurônios estriatais e esta lesão neuronal no estriado não é suficiente para induzir um déficit no aprendizado espacial. Lesão neuronal em córtex e tálamo também são observadas após a isquemia global, porém estas lesões são menos pronunciadas do que a lesão do hipocampo e estriado (BLOCK e SCHWARZ, 1998).

PUURUNEN e cols. (1997), em seu estudo sobre a influência do ambiente enriquecido e a administração de antagonista de receptor adrenérgico observaram que os ratos isquêmicos aprendem a localizar a plataforma no labirinto aquático, mesmo tendo demonstrado no exame anatômico do tecido cerebral uma extensiva lesão no hipocampo, especialmente em CA1 e que, os ratos isquêmicos não aprendem o mapa espacial por dicas distantes, mas por adotarem um tipo de estratégia taxonômica, que é efetiva para o aprendizado desta versão de tarefa no labirinto aquático. O aprendizado desta estratégia pode ser dependente de áreas cerebrais extra-hipocampais, envolvidas no aprendizado motor, como o córtex frontal e estriado. Isto pode nos esclarecer por que mesmo os animais submetidos a uma isquemia

cerebral por 20 minutos neste experimento, apresentaram um bom desempenho quanto ao aprendizado espacial.

Quando os ratos em nosso experimento receberam a recompensa do escape localizando a plataforma submersa ou sendo colocados sobre ela durante toda a fase de aquisição, os animais estavam sendo treinados sob a condição de reforço contínuo. Ratos treinados sob esta condição possuem uma tendência a não apresentarem resistência à extinção conforme referem FELDON e cols. (1985), SINDEN e cols. (1988) e YEE (2000). Em nosso estudo, a extinção da tarefa seria observada se os animais aprendessem no segundo teste (teste 2) que a plataforma não estava mais submersa em um dos quadrantes e gatassem mais tempo procurando localiza-la em outro quadrante. Segundo estes autores, animais com lesão hipocampal, como os animais do nosso estudo que apresentaram redução do volume da camada piramidal de CA1 do hipocampo por isquemia, apresentam uma tendência em aumentar a resistência à extinção do aprendizado inicial quando submetidos a condição de treinamento com reforço contínuo, em comparação aos animais do grupo controle.

Como os nossos animais durante todas as fases de aquisição tinham como recompensa à tentativa de escape, ou seja, tinham a possibilidade de localizarem a plataforma ou serem colocados sobre ela, podemos considerar que esta condição de aprendizado no labirinto aquático de Morris é uma condição de reforço contínuo.



Se a aquisição acontece com um reforço contínuo onde cada resposta é recompensada, a extinção ocorre mais rapidamente do que se a aquisição ocorre com um reforço parcial quando a recompensa é dada somente em só um dos treinos (SINDEN et al, 1988). A persistência das respostas na extinção aumenta com a intermitência do reforço prévio à extinção (BYRNE et al, 1998). Assim, se os animais forem muito treinados para uma tarefa antes da extinção da tarefa aprendida, a resposta à extinção será menor, sugerindo uma resistência à extinção desta tarefa. Portanto, os animais controles em nossos experimentos tinham uma tendência a extinguirem mais rapidamente o aprendido, o que foi confirmado através dos resultados encontrados. Já os animais isquêmicos, devido à lesão em hipocampo possuíam uma tendência a não extinguirem a tarefa aprendida apresentando resistência à extinção.

A lesão celular em hipocampo por injeção intracerebral de ibotenato provoca aumento da resistência à extinção em animais treinados com reforço contínuo e reforço parcial. Os animais eram treinados para correrem em uma pista reta e como recompensa recebiam comida. Os resultados demonstraram que a média da velocidade de corrida durante a fase de aquisição aumentava tanto nos animais com lesões hipocampais quanto nos controles cirúrgicos, porém na fase de extinção, os animais lesados tendiam a manter a média da velocidade, demonstrando resistência à extinguir o aprendido inicial. Assim, a lesão hipocampal causou um aumento geral na resistência à extinção nestes animais (JARRARD et al, 1986). No nosso estudo

também foi encontrada esta relação da lesão hipocampal com a resistência à extinção quando considerados os resultados apresentados pelos animais isquêmicos submetidos a 10 minutos de isquemia.

Quanto à extinção do aprendizado de tarefas espaciais, a nossa hipótese era que uma lesão maior provocada por uma isquemia de 20 minutos provocaria maior resistência à extinção comparado aos animais com 10 minutos de oclusão, que apresentariam menor volume de lesão.

Este fato, porém, não foi observado. Os animais isquêmicos 10 minutos que exibiram déficit durante a fase de aquisição (latências maiores para encontrar a plataforma) apresentaram resistência à extinção da tarefa aprendida estando de acordo com FELDON e cols. (1985) que refere que lesões hipocampais levam a significativo aumento da resistência à extinção em relação ao grupo controle cirúrgico após um treinamento com reforço contínuo na fase de aquisição da tarefa. Porém os animais isquêmicos 20 minutos, não apresentaram um importante déficit na fase de aquisição e na fase de retenção, como também não apresentaram déficit para a extinção da tarefa.

Uma análise morfológica para observarmos lesão isquêmica em áreas extra-hipocampais e uma análise do volume destas regiões poderia talvez nos explicar por que os animais submetidos a uma isquemia cerebral global transitória por 20 minutos pelo modelo de 4 VO, ao contrário dos animais submetidos à 10 minutos de

isquemia, não demonstraram importante prejuízo no aprendizado espacial, na memória de trabalho e na extinção deste aprendizado.

## 5. CONCLUSÕES

- a) A isquemia cerebral global transitória provocada por oclusão das artérias cerebrais por 10 minutos, causou déficit cognitivo nos animais isquêmicos estudados tanto no experimento 1 quanto no experimento 2, na tarefa espacial do labirinto aquático de Morris, demonstrado pelas latências maiores durante as fases de aquisição (fases de aquisição I, III e IV do experimento 1 e fases I, II e III do experimento 2) comparado aos animais controles e pelo tempo menor no teste de retenção (teste 1) na sessão de teste.
  
- b) A isquemia cerebral global transitória provocada por oclusão das artérias cerebrais por 20 minutos, não causou déficit cognitivo nos animais isquêmicos (no experimento 2), demonstrado pelas latências semelhantes destes animais em relação aos animais dos grupos controle e controle cirúrgico (fases de aquisição I, II e III do experimento 2). Assim, neste estudo podemos sugerir que o aumento do tempo de isquemia de 10 para 20

minutos não provocou o aumento do déficit no aprendizado espacial no labirinto aquático de Morris.

- c) A isquemia cerebral global transitória por 10 e 20 minutos provocou um déficit na memória de trabalho dos animais isquêmicos observado nas latências quando comparadas a primeira tentativa com a segunda nas fases de aquisição IV (experimento 1) e III (experimento 2).
- d) Os animais controles e controles cirúrgicos demonstraram retenção da tarefa espacial durante o teste 1 nas sessões de teste e extinção do aprendizado durante o teste 2, nos experimentos 1 e 2, não demonstrando resistência à extinção de tarefas espaciais no labirinto aquático de Morris;
- e) Os animais do grupo isquêmico 10 minutos, nos experimentos 1 e 2, apresentaram uma tendência a gastar mais tempo no quadrante alvo e maior número de cruzamentos no teste 2, evidenciando uma resistência à extinção da tarefa espacial no labirinto aquático de Morris;
- f) Os animais do grupo isquêmico 20 minutos não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos controles e controles cirúrgicos durante o teste 2 das sessões de teste que examinaram a extinção, não evidenciando resistência à extinção;

- g) A análise volumétrica da camada piramidal de CA1 do hipocampo pelo princípio de Cavalieri, indicou uma redução do volume nos grupos isquêmicos, comparado aos animais do grupo controle.
- h) Os animais submetidos à isquemia cerebral global por 20 minutos demonstraram diferença significativa em relação aos animais isquêmicos 10 minutos quanto ao volume de lesão sugerindo que quanto maior o tempo de isquemia pelo modelo de oclusão dos quatro vasos (4VO), maior o volume de lesão seletiva em CA1 do hipocampo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADA, L.; CANNING, C.; WESTWOOD, P. The patient as an active learner. In: ADA, L.; CANNING, C.; (eds.) **Key issues in neurological physiotherapy** . Oxford: Butterwoth Heineman: 99-124, 1990.
2. ALTEMUS, K. L.; ALMLI, C. R. Neonatal hippocampal damage in rats: long-term spatial memory déficits and associations with magnitude of hippocampal damage. **Hippocampus**, 7: 403-415, 1997.
3. AMARAL, D. G.; WITTER, M. P.; **Hippocampal formation. The rat nervous system**. G. Paxinos. Sidney, Academic Press. 21: 46-55, 1995.
4. ANTONAWICH, F. J.; MILLER, G. RIGSBY, D. C. et al. Regulation of ischemic cell death by glucocorticoids and adrenocorticotropic hormone. **Neuroscience**, 88: 319-325, 1999.
5. ARONOWSKI, J.; SAMWAYS, E.; STRONG, R.; RHOADES, H. M.; GROTTA, J. C. An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: analisys of behavioral deficit. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 16 (4): 705-713, 1996.
6. AUER, R. N.; JENSEN, M. L.; WHISHAW, I. Q. Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half the CA1 sector of hippocampus. **J. Neuroscience**, 9: 87-114, 1989.
7. BARTUS, R. T.; DEAN, R. L; MENNERICK, S.; EVELETH, D.; LYNCH, G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. **Brain Research**, 790: 1-13, 1998.
8. BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neuroscience – Exploring the brain**. 2 ed. Pennsylvania: Lippincott Willimas e Wilkins, 2001.

9. BLISS, C. I. **Statistics in Biology and Medicine**. New York: McGraw-Hill: 247-257, 1967.
10. BLOCK, F. Global ischemia and behavioural deficits. **Progress in Neurobiology**, 58: 279-295, 1999.
11. BLOCK, F.; BOZDAG, I.; NOLDEN-KOCH, M. Inflammation contributes to the postponed ischemic neuronal damage following treatment with a glutamate antagonist in rats. **Neuroscience Letters**, 298: 103-106, 2001.
12. BLOCK, F.; SCHWARZ, M. Correlation between hippocampal neuronal damage and spatial learning deficit due to global ischemia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 56: 755-761, 1997.
13. BLOCK, F.; SCHWARZ, M. Global ischemic neuronal damage relates to behavioural deficits: a pharmacological approach. **Neuroscience**, 82: 791-803, 1998.
14. BOROWSKI, T. B.; KOKKINIDIS, L. The effects of cocaine, amphetamine, and the dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 on fear extinction as measured with potentiated startle: implications for psychomotor stimulant psychosis. **Behavioral Neuroscience**, 112: 952-965, 1998.
15. BYRNE, T.; SUTPHIN, G.; POLING, A. Acquisition, extinction and reacquisition of responding with delayed and immediate reinforcement. **Behavioural Processes**, 43: 97-101, 1998.
16. CHAN, K. H.; MORELL, J. R.; JARRARD, L. E.; DAVIDSON, T. L. Reconsideration of role of the hippocampus in learned inhibition. **Behavioural Brain Research**, 119: 111-130, 2001.
17. COHEN, S. L. Behavioral momentum: effects on the temporal separation of rates of reinforcement. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, 69: 29-47, 1998.
18. COLBOURNE, F.; ROLAND, A.; GARNETTE, S. Behavioral testing does not exacerbate ischemic CA1 damage in Gerbils. **Stroke**, 29: 1967-1970, 1998.
19. DE BRUIN, J. P. C.; SWINKELS, W. A. M.; DE BRABANDER, J. M. Response learning of rats in a Morris water maze: involvement of the medial prefrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, 85: 47-55, 1997.



20. DEVAN, B. D.; McDONALD, R. J. A cautionary note on interpreting the effects of partial reinforcement on place learning performance in water maze. **Behavioural Brain Research**, 119: 213-216, 2001.
21. DIXON, K. C. Ischaemia and the neuron. **Neurohistochemistry**. C. W. M. Adams. Amsterdam, Elsevier: 558-598, 1965.
22. DOWNE, N. M.; HEATH, R. W. **Basics Statistic Methods**. New York: Harper & Row: 234-276, 1970.
23. DURWARD, B.; BAER, G.; WADE, J. Acidente vascular cerebral. In: **Cash – Neurologia para fisioterapeutas**. STOKES, M. São Paulo: Premier, 2000.
24. EICHENBAUM, H.; OTTO, T.; COHEN, N. J. Two functional components of hippocampal memory system. **Behavioural Brain Science**, 17: 449-518, 1994.
25. FELDON, J.; RAWLINS, J. N. P.; GRAY, J. A. Fornix-fimbria section and the partial reinforcement extinction effect. **Experimental Brain Research**, 58: 435-439, 1985.
26. GAO, T. M.; HOWARD, E. M.; XU, Z. C. Transient neurophysiological changes in CA3 neurons and dentate granule cells after severe forebrain ischemia in vivo. **Journal of Neurophysiology**, 80: 2860-2869, 1998.
27. GERASIMOV, V. D.; ARTEMENKO, D. P.; KRISHTAL, O. A. Preconditioning by motor activity protects rat hippocampal CA1 neurons against prolonged ischemia. **Brain Research**, 888: 326-329, 2001.
28. GINSBERG, M. D. In: **Animals models of global and focal cerebral ischemia. Primer on cerebrovascular diseases**. WELCH, K. M. A.; CAPLAN, L. R.; REIS, D. J.; SIESJÖ, B. K.; WEIR, B. New York, Academic Press: 272-275, 1997.
29. GLOOR, P. **The hippocampal system. The temporal lobe and limbic system**. New York, Oxford University Press: 325-590, 1997.
30. GREEN, E. J.; PAZOS, A. J.; DIETRICH, W. D.; McGABE, P. M.; SCHNEIDERMANN, N.; LIN, B.; BUSTO, R.; GLOBUS, M. Y. T.; GINSBERG, M. D. combined postischemic hypothermia and delayed MK-801 treatment attenuates neurobehavioral deficits associated with transient global ischemia in rats. **Brain Research**, 702: 145-152, 1995.
31. GRUBB, N. R.; FOX, K. A. A.; SMITH, K.; BEST, J.; BLANE, A.; EBMEIER, K. P.; GLABUS, M. F.; O'CARROLL, R. E. Memory impairment in out-of-hospital

- cardiac arrest survivors is associated with global reduction in brain volume, not focal hippocampal injury. **Stroke**, 31: 1509-1514, 2000.
32. HAGAN, J. J.; BEAUGHARD, M. The effects of forebrain ischemia on spatial learning. **Behavioural Brain Research**, 41: 151-160, 1990.
  33. HATTORI, K.; LEE, H.; HURN, P.; CRAIN, B. J.; TRAYSTMAN, R. J.; DEVRIES, C. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. **Stroke**, 31: 1939-1944, 2000.
  34. HEISS, W. D. Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 20: 1276-1293, 2000.
  35. HOLMES, G. L.; SARKISIAN, M.; BEN-ARI, Y et al. Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats. **The Journal of Comparative Neurology**, 404: 537-553, 1999.
  36. HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased Stereology**. New York, Springer: 39-45, 1998.
  37. HSU, J. C.; ZHANG, Y.; TAKAGI, N.; GURD, J. W.; WALLACE, M. C.; ZHANG, L.; EUBANKS, J. H. Decreased expression and functionality of NMDA receptor complexes persist in the CA1, but not in the dentate gyrus after transient cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 18(7): 768-775, 1998.
  38. IKEDA, T.; MISHIMA, K.; YOSHIKAWA, T.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M.; XIA, Y. X.; IKENOUE, T. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. **Behavioural Brain Research**, 118: 17-25, 2001.
  39. JARRARD, L. E.; WICKELGREN, W. O. Effects of hippocampal ablation and intertribal on runway acquisition. **Journal of Compared Physiology and Psychology**, 57: 442-444, 1964.
  40. JARRARD, L. E.; ISAACSON, R. L. Runway response perseveration in the hippocampectomised rat: determined by extinction variables. **Nature**, 207: 109-110, 1965.
  41. JARRARD, L. E., FELDON, J.; RAWLINS, J. N. P., SINDEN, J. D.; GRAY, J. A. The effects of intrahippocampal ibotenate on resistance to extinction after continuous or partial reinforcement. **Experimental Brain Research**, 61: 519-530, 1986.

42. JASPERS, R. M. A.; BLOCK, F.; HEIM, C.; SONTAG, K. H. Spatial learning is affected by transient occlusion common carotid arteries (2VO): comparison of behavioural and histopathological changes after 2VO and four-vessel-occlusion in rats. **Neuroscience Letters**, 117: 149-153, 1990.
43. KATO, H.; KOGURE, K.; ARAKI, T.; LIU, X. H.; ITOYAMA, Y. Induction of NADPH-diaphorase activity in the hippocampus in a rat model of cerebral ischemia and ischemic tolerance. **Brain Research**, 625(1): 71-75, 1994.
44. KIYOTA, Y.; MIYAMOTO, M.; NAGAOKA, A. Relationship between brain damage and memory impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia. **Brain Research**, 538: 295-302, 1991.
45. KOGURE, K. KATO, H. Altered gene expression in cerebral ischemia. **Stroke**, 24(12): 2121-2127, 1993.
46. KRISTIAN, T.; SIESJÖ, B. K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, 29: 705-718, 1998.
47. KURODA, S.; NAKAI, A.; KRISTIAN, T.; SIESJÖ, B. K. The calmodulin antagonist trifluoperazine in transient focal brain ischemia in rats. **Stroke**, 28: 2539-2544, 1997.
48. LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the Ammonic System. **Journal fur Psychologie un Neurologie**, 46: 113-177, 1935.
49. MAIER, S. E.; WEST, J. R. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in rat. **Alcohol**, 23: 49-57, 2001.
50. MARUKI, K.; IZAKI, Y.; HORI, K.; NOMURA, M.; YAMAUCHI, T. Effects of rat ventral and dorsal hippocampus temporal inactivation on delayed alternation task. **Brain Research**, 895: 273-276, 2001.
51. MARTIN, L. J.; SIEBER, F. E.; TRAYSTMAN, R. J. Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations in metabotropic glutamate receptor signaling pathways. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 20: 153-167, 2000.
52. MATSUYAMA, T. TSUCHIYAMA, M., NAKAMURA, H.; MATSUMOTO, M.; SUGITA, M. Hilar somatostatin neurons are more vulnerable to an ischemic insult

than CA1 pyramidal neurons. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 13(2): 229-234, 1993.

53. MESULAM, M. M. **Principles of behavioral neurology. Patterns in behavioral neuroanatomy: associations areas, the limbic system, and hemispheric specialization.** Philadelphia, F. A. Davis Company. 26: 1-70, 1985.
54. MITSUSHIMA, D.; FUNABASHI, T.; SHINOHARA, K.; KIMURA, F. Impairment of maze learning in rats by restricting environmental space. **Neuroscience Letters**, 297: 73-76, 2001.
55. MIZUMORI, S. J. Y.; GARCIA, P. A.; RAJA, M. A.; VOLPE, B. T. Spatial and locomotion-related neural representation in rat hippocampus following long-term survival from ischemia. **Behavioural Neuroscience**, 109: 1081-1094, 1995.
56. MODO, M.; SOWINSKI, P.; HODGES, H. Conditional discrimination learning in rats with global ischaemic brain damage. **Behavioural Brain Research** 111(1-2): 213-221, 2000.
57. MOSER, E.; MOSER, M. B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **Journal of Neuroscience**, 13: 3916-3925, 1993.
58. MORRIS, R. G. M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N. P. O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297: 681-683, 1982.
59. MORRIS, R. G. M. Development of water-maze procedure for studying spatial learning in rat. **Journal of Neuroscience Methodology**, 11: 47-60, 1984.
60. NAGHDI, N.; NAFISY, N.; MAJLESSI, N. The effects of intrahippocampal testosterone and flutamide on spatial localization in the Morris water maze. **Brain Research**, 897: 44-51, 2001.
61. NELSON, A.; LEBESSI, A.; SOWINSKI, P.; HODGES, H. Comparison of effects of global ischemia on spatial learning in the standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance. **Behavioural Brain Research**, 85: 93-116, 1997.
62. NETTO, C. A.; HODGES, H.; SINDEN, J. D. et al. Foetal grafts from hippocampal regio superior alleviate ischaemic-induced behavioural deficits. **Behavioural Brain Research**, 58: 107-112, 1993.

63. NUNN, J. A.; LEPEILLET, E. NETTO, C. A.; SOWINSKI, P.; HODGES, H.; GRAY, J. A.; MELDRUM, B. CA1 cell loss produces deficits in learning and memory in water maze regardless of additional intra-and extra-hippocampal damage. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 11: S338, 1991.
64. NUNN, J. A.; LePEILLET, E; NETTO, C. A.; HODGES, H.; GRAY, J. A.; MELDRUM, B. S. Global ischemia: hippocampal pathology and spatial deficits in water maze. **Behavioural Brain Research**, 62: 41-54, 1994.
65. OLSEN, G. M.; SCHEEL-KRÜGER, J.; MOLLER, A.; JENSEN, L. H. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. **Behavioural Neuroscience**, 108: 681-690, 1994.
66. PETERS, A.; PALAY, S. WEBSTER, D. H. **The neuronal cell body. The finestructure of the Nervous System**. Oxford, Oxford Press: 14-69, 1991.
67. PORT, R. L.; MURPHY, H. A.; MAGEE, R. A. Age-related impairment in instrumental conditioning is restricted to initial acquisition. **Experimental Aging Research**, 22: 73-81, 1996.
68. PRUSKY, G. T.; WEST, P. W. R.; DOUGLAS, R. M. Reduced visual acuity impairs place but not cued learning in the morris water task. **Behavioural Brain Research**, 116: 135-140, 2000.
69. PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in unanesthetized rat. **Stroke**, 10 (3): 267-272, 1979.
70. PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in model of transient forebrain ischemia. **Annals of Neurology**, 11: 491-98, 1982.
71. PUURUNEN, K.; SIRVIO, J.; KOISTINAHO, J. MIETTINEN, R.; ANTTI, H.; RIEKKENEN, P.; SIVENIUIS, J. Studies on the influence of enriched-environment housing combined with systemic administration of an alpha sub 2-adrenergic antagonist on spatial learning and hyperactivity after global ischemia in rats. **Stroke**, 28: 623-31, 1997.
72. RAWLINS, J. N. P.; FELDON, J.; GRAY, J. A. The effects of hippocampectomy and of fimbria section upon the partial reinforcement extinction effect in rats. **Experimental Research Brain**, 38: 273-283, 1980.

73. RAWLINS, J. N. P.; FELDON, J.; URSIN, H.; GRAY, J. A. Resistance to extinction after schedules of partial delay or partial reinforcement in rats with hippocampal lesions. **Experimental Brain Research**, 59: 273-281, 1985.
74. REILLY, S.; HARLEY, C.; REVUSKY, S. Ibotenate lesions of the hippocampus enhance latent inhibition in conditioned taste aversion and increase resistance to extinction in conditioned taste preference. **Behavioural Neuroscience**, 107(6): 996-1004, 1997.
75. ROBINSON, I.; BRIDGE, H.; RIEDEL, G. Visual discrimination learning in the water maze: a novel test for visual acuity. **Behavioural Brain Research**, 119: 77-84, 2001.
76. SAVE, E.; POU CET, B. Involvement of the hippocampus and associative parietal cortex in the use of proximal and distal landmarks for navigation. **Behavioural Brain Research**, 109: 195-206, 2000.
77. SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, 40(3): 599-636, 1991.
78. SINDEN, J.D.; JARRARD, L. E.; GRAY, J. A. The effects of intra-subicular ibotenate on resistance to extinction after continuous or partial reinforcement. **Experimental Brain Research**, 73: 315-319, 1988.
79. STEELE, R.; MORRIS, R. G. M. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-Antagonist D-AP5. **Hippocampus**, Pp. 118-136, 1999.
80. SUGIMOTO, A.; SHOZUHARA, H.; KOGURE, K. ONODERA, H. Exposure to sublethal ischemia failed to prevent subsequent ischemic death of dentate hilar neurons, as estimated by laminin immunohistochemistry. **Brain Research**, 629(1): 159-162, 1993.
81. VERGONI, A. V.; OTTANI, A.; BOTTICELLI, A. R.; GUANO, L.; LOCHE, A.; GENEDANI, S.; GESSA, G. L.; BERTOLINI, A. Neuroprotective effect of gamma-hydroxybutyrate in transient global cerebral ischemia in rat. **European Journal of Pharmacology**, 397(1): 75-84, 2000.
82. VILA, N.; CASTILLO, J.; DAVALOS, A.; CHAMORRO, A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. **Stroke**, 31: 2325-2329, 2000.
83. YEE, B. K. Cytotoxic lesion of the medial prefrontal cortex abolishes the partial reinforcement extinction effect, attenuates prepulse inhibition of the acoustic

- startle reflex and induces transient hyperlocomotion, while sparing spontaneous object recognition memory in the rat. **Neuroscience**, 95(3): 675-689, 2000.
84. WADE, D. T.; WOOD, V. A.; LANGTON, H. R. Recovery after stroke – the first 3 months. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**. 48: 7-13, 1985.
85. WILLIAMS, G. JIANG, J. Development of an ischemic stroke survival score. **Stroke**, 31: 2414-2420, 2000.
86. WHISHAW, I. Q.; ROD, M. R.; AUER, R. N. Behavioral deficits revealed by multiple tests in rats with ischemic damage limited to half of CA1 sector of hippocampus. **Brain Research Bulletin**, 34: 283-89, 1994.
87. WHITALL, J.; WALLER, S.; SILVER, K.; MACKO, R. Repetitive bilateral arm training with rhythmic auditory cueing improves motor function chronic hemiparetic stroke. **Stroke**, 31: 2390-2395, 2000.
88. WITTE, O. W.; BIDMON, H.; SCHIENE, K.; REDECKER, C.; HAGEMANN, G. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 20: 1149-1165, 2000.
89. ZIGMOND, M. J.; BLOOM, F. E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J. L. SQUIRE, L. R. **Fundamental Neuroscience**. California: Academic Press, 1999.
90. ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R. Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. **Behavioural Neuroscience**, 100: 155-160, 1986.
91. ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; REMPEL, N.; CLOWER, R.; AMARAL, D. Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, 12: 2582-2596, 1992.