

A ATIVAÇÃO DA REDE NEURAL DE TOMADA DE DECISÃO SOCIAL (RTDS) NO MODELO DO *STATUS EPILEPTICUS* NEONATAL EM RATOS WISTAR MACHOS.

Andreska Paola de Oliveira (IC) e Roberta Monterazzo Cysneiros (Orientador)

Apoio: PIBIC CNPq

RESUMO

As crises neonatais, manifestações agudas de disfunções no Sistema Nervoso Central (SNC), estão entre uma das emergências mais comuns e fatais após o parto, responsáveis por intensos comprometimentos cerebrais, podendo afetar a sociabilidade e emocionalidade dos indivíduos. Dentre as regiões possivelmente comprometidas, a RTDS (Rede Neural de Tomada de Decisão Social) é mais vulnerável às crises epiléticas, uma vez que as descargas elétricas podem levar a uma resposta inadequada com alterações na plasticidade neuronal, como mudanças celulares, incluindo neurônios. Assim, o modelo de *Status Epilepticus* é promissor para entender a relação entre a sociabilidade, a emocionalidade e a RTDS. Dessa forma, o projeto tem como propósito examinar a ativação neural, em ratos Wistar macho, seguida da exposição a um novo contexto e a uma novidade social, que apresentariam nenhuma ou reduzida quantidade de células nervosas, respectivamente, e destacando os sítios da rede relacionados aos prejuízos causados pela descarga elétrica. Sendo assim, a pesquisa seguiu a metodologia em que foi necessário induzir o *Status Epilepticus* nos animais, realizar os testes de exposição à um novo contexto e à uma novidade social e, posteriormente, perfusão cardíaca, seguida da análise de lâminas de cortes cerebrais para contagem de neurônios. O estudo indicou que a quantidade de neurônios corresponde ao estabelecido no objetivo, de modo que a ativação da rede neural associada a um novo contexto, não apresentou alteração no número de células nervosas e a ativação da rede neural relacionada a um novo estímulo social apresentou decaimento do número de neurônios.

Palavras-chave: RTDS; convulsão; epilepsia.

ABSTRACT

Neonatal crises, acute manifestations of dysfunctions in the Central Nervous System (CNS), are among one of the most common and fatal emergencies after childbirth, responsible for intense brain damage, which can affect the sociability and emotion of individuals. Among the possibly compromised regions, the RTDS (Social Decision-Making Neural Network) is more vulnerable to epileptic seizures, since electrical discharges can lead to an inadequate response with changes in neuronal plasticity, such as cellular changes, including neurons. Likewise, the *Status Epilepticus* model is promising to understand the relationship between sociability, emotionality and RTDS. Thus, the project aims to examine neural activation in male Wistar rats, followed by exposure to a new context and a social novelty, which would show no

or a reduction in the number of nerve cells, respectively, and highlighting the sites of the network related to damage caused by electrical discharge. Therefore, the research followed the methodology in which it was necessary to induce *Status Epilepticus* in animals, carry out exposure tests to a new context and social novelty and, subsequently, cardiac perfusion, followed by the analysis of brain sections to count neurons. The study indicated that the number of neurons corresponds to that established in the objective, so that the activation of the neural network associated with a new context, did not change the number of nerve cells and the activation of the neural network related to a new social stimulus showed decay. of the number of neurons.

Keywords: RTDS; Seizures; Epilepsy.

1. INTRODUÇÃO

Entre as patologias neurológicas mais frequentes do período neonatal (até 4 semanas), encontram-se as crises convulsivas, de alta morbi-mortalidade, cuja incidência varia entre 1,8-5/1.000 nascidos vivos (COSTA et al., 2001). As crises neonatais são um problema neurológico, que pode ser o primeiro e único indicador de disfunções no Sistema Nervoso Central (SNC), caracterizado como descarga elétrica síncrona e excessiva de um grupo ou uma totalidade de neurônios (MARTINS, PEREIRA, 2023). Devido à imaturidade do cérebro, o impacto das crises epiléticas pode provocar um comprometimento cerebral grave, como anormalidade crônica da sociabilidade e da emocionalidade, cujos mecanismos ainda não foram completamente compreendidos.

Assim, o *status epilepticus* (SE), ou Estado de Mal Epilético (EME), no que lhe concerne, definido como crise convulsiva com duração maior que 5 minutos, é um modelo promissor para o estudo da associação entre as crises epiléticas e as anormalidades de sociabilidade. Esse padrão pode facilitar a investigação da Rede Neural de Tomada de Decisões Sociais (RTDS), responsável por funções envolvidas com sociabilidade e emocionalidade, que avalia e responde às pistas sociais de modalidades sensoriais e não sociais, e implementa uma resposta adaptativa frente aos desafios e oportunidades (O'CONNEL, HOFMANN, 2011, 2012).

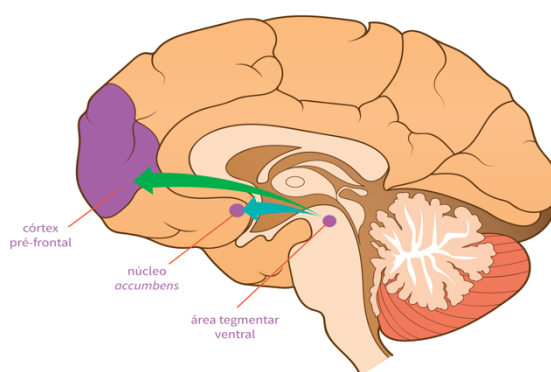
Portanto, devido à vulnerabilidade do cérebro às crises neonatais, o projeto pretende examinar a ativação neural da RTDS seguida de exposição a um novo estímulo social e a um novo contexto, de modo a identificar os sítios da rede relacionados aos prejuízos da sociabilidade, no modelo do SE neonatal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A rede neural do comportamento social (RNCS), descrita por Newman (1999), baseou-se no papel de regiões cerebrais sensíveis aos esteroides sexuais na regulação de múltiplas formas de expressão do comportamento social (comportamento sexual, comportamento agressivo, afiliação e vínculo, comportamento parental e na resposta ao estresse social). No entanto, a RNCS carecia de regiões para detectar, avaliar e responder às pistas de múltiplas modalidades sensoriais de outros indivíduos do grupo, que avaliassem aspectos potencialmente recompensadores das interações sociais e que respondesse por comportamentos sociais complexos, como a formação, manutenção e ajuste dinâmico de hierarquias sociais que dependem da capacidade de memorizar informações sobre indivíduos específicos, perceber mudanças no ambiente social, e de se ajustar a elas (O'CONNEL, HOFMANN, 2012). Esses

aspectos, em geral, são mediados pelo Sistema Cerebral de Recompensa, definido por seus componentes centrais (núcleo *accumbens*, área tegmentar e córtex pré-frontal – Figura 1) e por seu comprometimento com o sistema límbico, amígdala e hipocampo, de maneira que todos os comportamentos que são reforçados por uma recompensa, propendendo-se a serem repetidos e aprendidos (BRASIL, 2017). Biologicamente, esse sistema garante a sobrevivência, através de atitudes como comer, beber e reproduzir (SOARES, 2010).

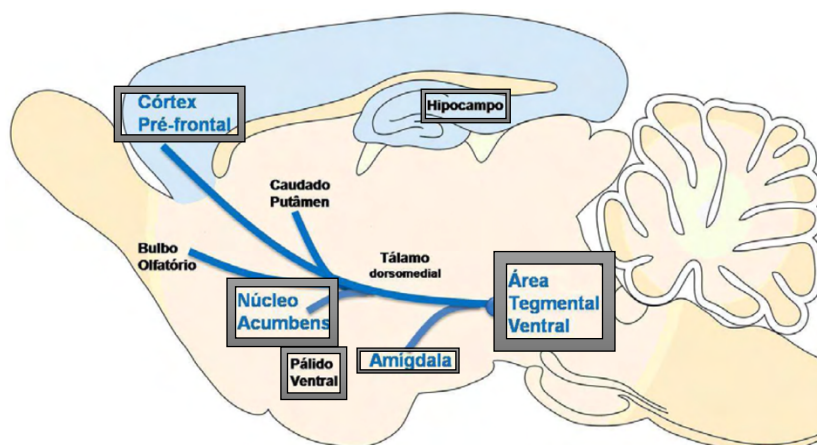
Figura 1 – Representação do encéfalo humano com marcações das principais áreas do Sistema de Recompensa Cerebral



Fonte: Brasil, 2017

Assim, O'Connell e Hofmann (2011, 2012), observaram que as estruturas cerebrais do sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico evoluíram para expressar muitos dos mesmos receptores e genes que intercedem comportamentos sociais que foram considerados para definir a RNCS. Desse modo, fundiram o RNCS com o sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico, elaborando o termo Rede Neural de Tomada de Decisão Social (RTDS), Figura 2, que passou a incluir o núcleo *accumbens* (NAc), Ventral Pálido (VP), Amígdala basolateral, (BLA), Hipocampo (HIP), a área tegmentar ventral (VTA) e córtex Pré-frontal (CPF).

Figura 2 – Representação do encéfalo humano com marcação das principais áreas da RTDS

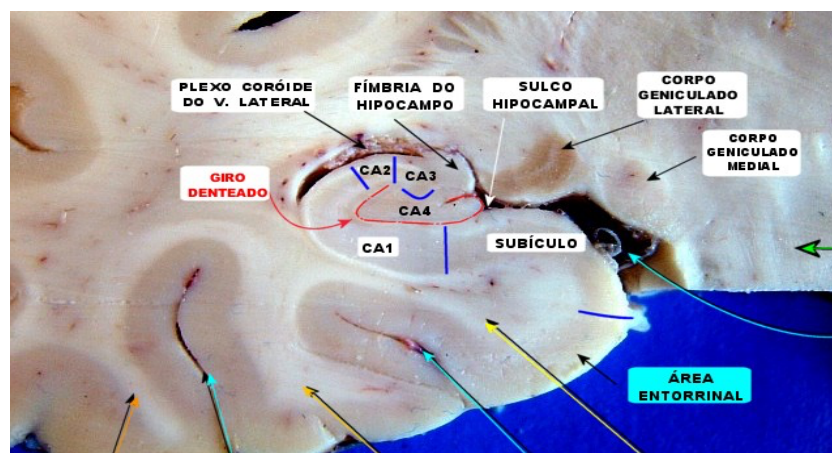


Fonte: GOELDNER, 2009.

Nessa rede neural, apesar de ter sido reconhecida recentemente e ainda não ser totalmente compreendida, o sistema mesolímbico e o mesocortical, que juntos constituem o sistema de recompensa cerebral, foram associados, de modo que, as estruturas da RTDS, fossem responsáveis por diferentes funções. Dessa forma, o córtex pré-frontal foi associado às funções cognitivas superiores e pelo controle do sequenciamento de ações; a amígdala, estrutura responsável pelo processamento do conteúdo emocional de estímulos ambientais; o hipotálamo, à resposta ao estresse e integração dos estímulos do meio interno e externo; o hipocampo, o sítio da memória social, da representação de diferentes dimensões do espaço social, de rastreo do comportamento social dinâmico, da flexibilização do mapa cognitivo social para adaptação a novos contextos sociais, por conseguinte, é também alvo do comportamento social desadaptativo em alguns transtornos psiquiátricos; e o núcleo *accumbens*, pelo aprendizado e pela motivação, bem como pela valorização de cada estímulo (BRASIL, 2017).

Porém, em destaque, o hipocampo, localizado no assoalho do ventrículo lateral, tem papel central na memória episódica e na navegação espacial sendo considerado uma estrutura espaço-temporal dentro do qual os vários componentes sensoriais, cognitivos e emocionais estão associados para contextualizar a experiência (KNIERIM et al., 2015). Essa estrutura, inclui o giro dentado (DG) e as regiões CA1, CA2, CA3 (Figura 3). Situada entre as regiões CA1 e CA3, a região CA2 conecta-se com todas as sub-regiões do hipocampo desempenhando um papel central na memória social. Dessa forma, é evidente que haja prejuízo na sociabilidade em pacientes e ratos com epilepsia do lobo temporal e lesão hipocampal (WANG et al., 2015; IVES-DELIPERI et al., 2019; MARIN et al., 2008), especialmente, na inativação das células piramidais ou lesão da região CA2.

Figura 3 – Regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo



Fonte: UNICAMP, [s.d].

O papel da CA2 na memória social está associado às suas conexões (HAINMUELLER et al., 2014), pois os seus neurônios piramidais recebem impulsos excitatórios do córtex entorrinal (CHEVALEYRE et al., 2010), do septo medial, do núcleo supramamilar, da banda diagonal de Broca, do núcleo paraventricular do hipotálamo e do núcleo mediano da rafe (CUI et al., 2013; LEROY et al., 2018) e enviam impulsos excitatórios para todas as regiões do hipocampo, mas principalmente para a região CA1 ventral (TAMAMAKI et al., 1988; KOHARA et al., 2014). O núcleo paraventricular do hipotálamo produz e secreta os neuropeptídeos ocitocina e vasopressina que alcança regiões seletivas do hipocampo para mediar papel essencial na memória social. Em 1985, houve a identificação de receptores de ocitocina no hipocampo (LEEWEN et al., 1985). A estimulação dos axônios vasopressinérgicos melhorou a memória de reconhecimento social pela ativação seletiva dos receptores vasopressinérgicos 1B (AVPr1b) expressos nos neurônios piramidais da região CA2 dorsal (SMITH et al., 2016).

Em roedores, por apresentarem um fenótipo comportamental de autismo de grau leve, com déficits no comportamento de brincar, baixa preferência pela novidade social, déficit na discriminação social, aumento do estado de ansiedade e prejuízo na vocalização ultrassônica, porém sem prejuízo na memória social, flexibilidade comportamental e aprendizagem associativa, foi registrado redução na motivação social, da expressão do receptor de ocitocina (OTR) no hipocampo, aumento do conteúdo de ocitocina (OT) no hipotálamo, sem alteração na expressão de genes relacionados ao sistema de recompensa (DRD1 e DRD2 no estriado), de genes relacionados a plasticidade sináptica do hipocampo (NT3 e sinapsina) (CASTELHANO et al., 2010; TALOS et al., 2012; CASTELHANO et al., 2013; LUGO et al., 2014;

BERNARD, BENKE, 2015; BERNARD et al., 2015; CASTELHANO et al., 2015; MIKULECKÁ et al., 2019; HODGES et al., 2019, REYNOLDS et al., 2016; REYNOLDS et al., 2017).

Além disso, a facilitação da sinalização por reguladores socioemocionais (endocanabinoides) antes do encontro social, por meio da inibição enzimática, diminuiu a motivação social e a discriminação social de ratos normais, sem efeito nos animais afetados pelas crises neonatais, com sociabilidade prejudicada. Tal fato foi relacionado baixa sinalização mediada pela ocitocina, pelo núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo para o núcleo *accumbens*, visto que o endocanabinoides é dependente da liberação de OT que promove a mobilização de anandamida no núcleo *accumbens* do camundongo (NAC). Esta descoberta indica que a sinalização mediada por anandamida nos receptores, impulsionada pela ocitocina, modula a recompensa (LIMA et al., 2020).

Ademais, em 2016, foi demonstrado que a conexão entre CA1 ventral e Núcleo *accumbens*, região da concha (NAC), é essencial para a discriminação social (OKUYAMA et al., 2016), e, em 2018, através de uma abordagem farmacogenética e optogenética, inativaram reversivelmente a CA2 dorsal e as suas projeções para o hipocampo ventral durante as fases de aquisição e recuperação da memória social e observaram que os neurônios piramidais da região CA2 dorsal são essenciais para ambas as fases (MEIRA et al., 2018). Assim, a conexão excitatória entre CA2 dorsal, CA1 ventral e a projeção para o núcleo *accumbens* é necessária e suficiente para mediar a discriminação de estímulos sociais, mas não os não sociais. Ou seja, roedores são naturalmente curiosos sobre uma novidade social (animal da mesma espécie, não-familiar, do mesmo sexo), ou seja, demonstram mais interesse por um rato desconhecido do que um familiar. Entretanto, quando apresentam a região CA2 inativada ou afetada, por exemplo, pela descarga elétrica das crises epiléticas neonatais, não mostram interesse pela novidade social, uma vez que a conexão excitatória não seria suficiente (LEITE, 2014).

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Presbiteriana Mackenzie, e desenvolvido no laboratório de Neurobiologia e Metabolismo Energético. As idades foram definidas a partir da data do nascimento e denominadas com P0. Ratos Wistar recém-nascidos foram mantidos com as suas mães em estantes ventiladas sob condições

controladas (Ciclo claro/escuro 07h-19h; 22–24 °C e umidade relativa de 50-55%). Em P5, houve a sexagem, fazendo parte da pesquisa apenas filhotes machos. Em P21, os animais foram desmamados e alojados em grupos com acesso livre à água e comida.

Onde “P” é relacionado ao tempo de vida, dado em dias (número subsequente), exemplo, P5 = 5 dias após nascimento.

3.2. Indução do *Status Epilepticus* neonatal

A pilocarpina foi utilizada para induzir o *Status Epilepticus*, conforme estudos anteriores (Castelhano et al., 2010, 2013, 2015; Pacífico et al., 2020 e Ribeiro et al., 2020), nos ratos Wistar machos P9, que corresponde a um recém-nascido a termo, recebendo pilocarpina (Sigma) 3,8% em solução salina (380 mg / kg, i.p.) ou solução salina (0,1mL / 10g). Durante este período os animais ficam sob uma fonte de luz para se manterem aquecidos. A taxa de mortalidade é em torno de 10%. Após a cessação do SE (cerca de 3,5 – 4 horas), os animais retornam para as caixas moradias até serem desmamados no 21 ° dia pós-natal e agrupados 3–5 animais por caixa para constituir os seguintes grupos (tabela 1).

O grupo CTR não recebeu qualquer estímulo, pois são a referência da ativação basal do gene c-fos. O c-fos é um proto-oncogene de ativação imediata, cujo produto proteico (proteína c-fos) é usado como marcador de ativação neural e pode ser identificado por técnicas de imuno-histoquímicas (BULLITT, 1990).

Tabela 1. Distribuição dos animais em grupos.

GRUPOS	CONTROLE (10 ANIMAIS)	CRT – novo contexto (5 animais)
		CRT – novidade social (5 animais)
	EXPERIMENTAL (10 ANIMAIS)	EXP – novo contexto (5 animais)
		EXP – novidade social (5 animais)

3.3. Testes comportamentais

Os testes ocorreram em ratos (P60-70) habituados previamente (45 minutos) à sala de experimentação com pouca iluminação, entre 8:00-12:00 horas, sem a presença do experimentador e filmados para análise posterior.

3.3.1. Ativação neural diante da exposição à uma novidade social

Animais (CTRA e EXPA) habituados a uma arena circular (50 cm (altura) x 60 cm (diâmetro) contendo uma caixa de acrílico (L x P x A, 40 cm x 40 cm x 40 cm) durante 3 dias por 10 minutos, foram expostos a um estímulo social não familiar num contexto familiar. O estímulo social é um animal, da mesma espécie, não-familiar, do mesmo sexo (30–35 dias pós-natal) inserido na caixa de acrílico por 10 minutos. A investigação social é avaliada durante o tempo de exposição ao novo estímulo social. Ao final, os animais são anestesiados e perfundidos 1,5 horas do término do experimento.

3.3.2. Ativação neural diante da exposição à um novo contexto

Animais (CTRB e EXPB) foram transferidos das caixas moradias para uma arena circular, (50 cm (altura) x 60 cm (diâmetro) contendo uma caixa de acrílico (L x P x A, 40 cm x 40 cm x 40 cm) por 10 min. Ao final, os animais são anestesiados e perfundidos após 1,5 horas do término do experimento.

3.4. Perfusão transcardíaca

Os ratos foram anestesiados profundamente com Uretana (1,2g/kg), perfundidos com tampão PBS (0,1M, pH 7,4), seguido de PFA 4% com auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex L/S, 15 ml/min) por meio de uma agulha (40X12) inserida no ventrículo esquerdo. Em seguida, os ratos foram decapitados e os encéfalos removidos. Os encéfalos permaneceram por 24 horas em PFA 4% e, posteriormente, em solução de sacarose 30% por 72 horas. Com o auxílio do vibrátomo de lâmina vibratória (Leica System), de acordo com o atlas Paxinos e Watson, 6th edition, 2009, versão compacta, foram obtidos cortes coronais seccionados na espessura de 40 μ m, referentes as seguintes regiões: córtex pré-frontal (4,68 mm a 2,76 mm), núcleo *accumbens* (4,24 mm a 0,96 mm), hipotálamo, hipocampo e amígdala (-1,56 mm a -5,04 mm).

3.5. Imunofluorescência

As fatias (4/6 por região de interesse por animal) lavadas com PBS 0,1 M (3x10 min) foram colocadas em tampão de bloqueio (10% de soro de cabra, 5% de albumina de soro bovina e 0,2% Triton X-100 em PBS 0,1 M) por 1 hora. Posteriormente, incubadas “overnight” a 40 °C com o anticorpo primário monoclonal anti-C-fos (1:1000) em solução de 5% de soro de cabra, 1% de BSA em PBS 0,1 M contendo 0,2% de triton X-100. Após o período de incubação, as fatias foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o

anticorpo secundário (Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Texas Red, 1:500) por 2 horas à temperatura ambiente em solução de 5% de soro de cabra, 1% de BSA em PBS 0,1 M contendo 0,2% de triton X-100. A seguir, as fatias foram lavadas 2 vezes com PBS e depois na presença de DAPI (1:10.000). As fatias, então, foram organizadas em lâminas de vidro com fluoromount-G e cobertas com lamínulas e analisadas em microscópio de fluorescência, fotografadas e as imagens analisadas no Image J (*software* para processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. Ativação mediante à novo contexto social

A ativação da rede neural por meio de um novo contexto social foi baseada na hipótese de que os animais, no modelo do *Status Epilepticus*, não apresentariam nenhuma mudança, em relação ao número de neurônios, entre o grupo controle e o experimental, visto que conexão excitatória entre as diferentes regiões do hipocampo (CA2 dorsal e CA1 ventral) e a projeção para o núcleo *accumbens* não é suficiente para mediar discriminação de estímulos sociais. Assim, após o processo de imunofluorescência, as imagens das lâminas dos cortes cerebrais foram analisadas por meio do ImageJ, obtendo os dados conforme Figuras 4, 5, 6 e 7, e Tabela 2.

Figura 4 – Imagem da região do hipocampo (esquerda) e contagem de neurônios à vista (direita) – Caixa 1, animal 2

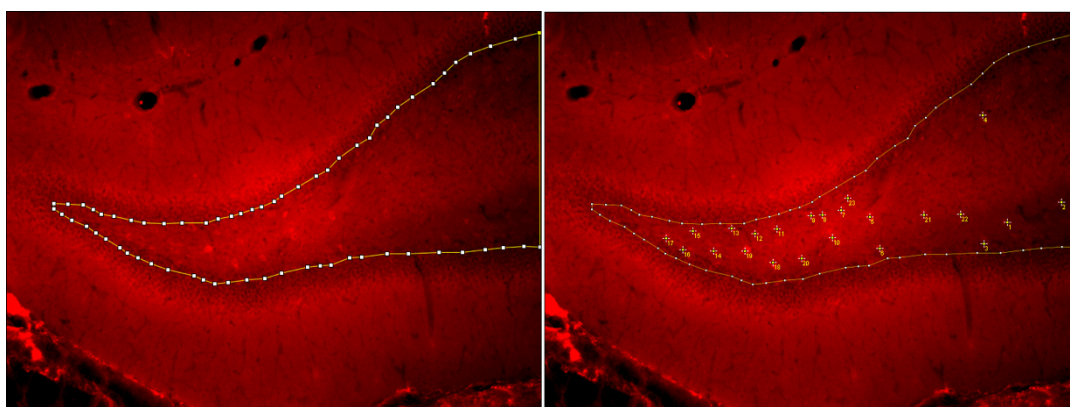


Figura 5 - Imagem da região do hipocampo (esquerda) e contagem de neurônios à vista (direita) – Caixa 1, animal 2A

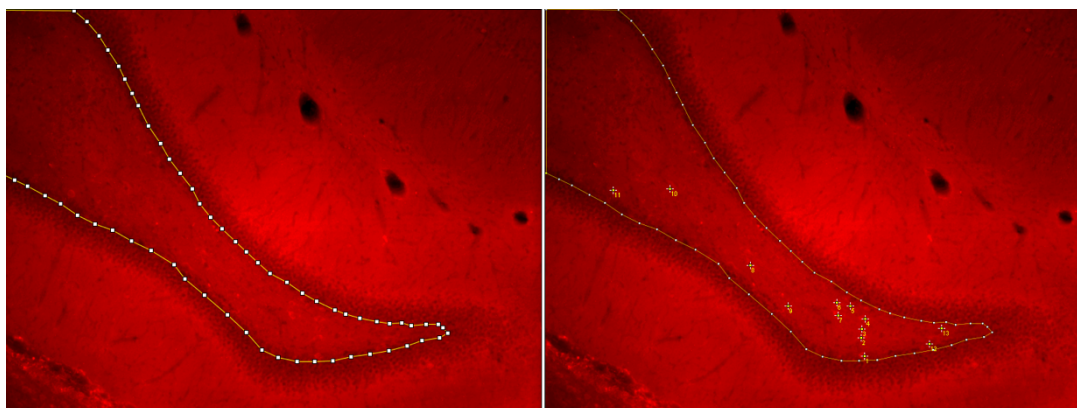


Figura 6 - Imagem da região do hipocampo (esquerda) e contagem de neurônios à vista (direita) – Caixa 2, animal 1A

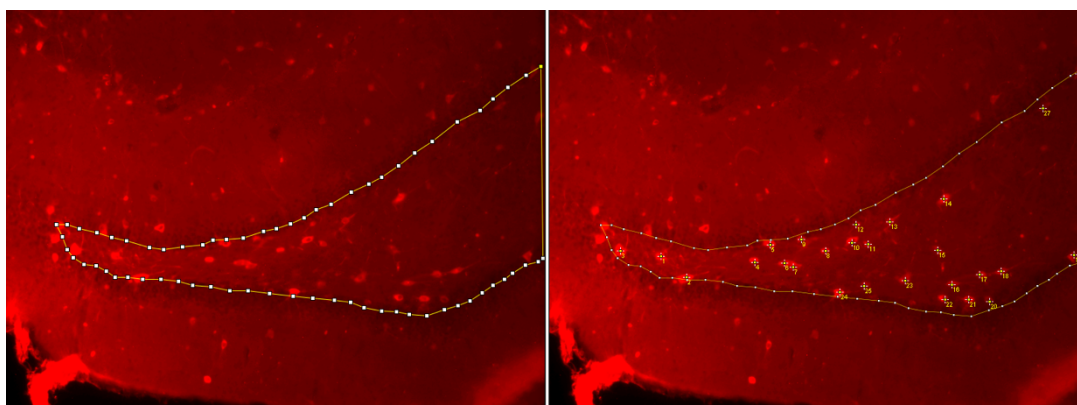
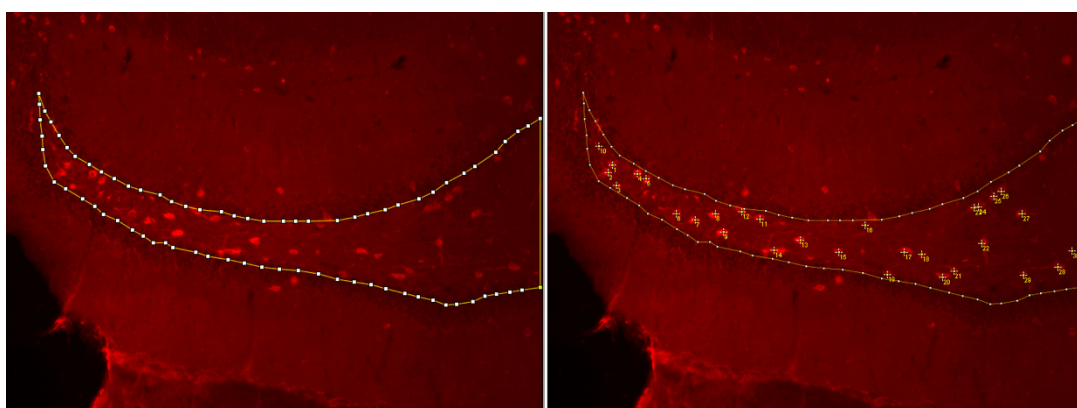


Figura 7 - Imagem da região do hipocampo (esquerda) e contagem de neurônios à vista (direita) – Caixa 2, animal 1B



A partir das Figuras 4, 5, 6 e 7, foram feitas as contagens de neurônios e que estão indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Informações geradas a partir do ImageJ baseado na análise das figuras 4, 5, 6 e 7

GRUPO	CAIXA	ANIMAL	ÁREA (PIXELS / MICRÔMETRO)	CÉLULAS	CÉLULAS POR MICRÔMETRO
CRT - contexto	1	2	83129.412	23	$2,7 \times 10^{-4}$
CRT - contexto	1	2A	28416.609	13	$4,5 \times 10^{-4}$
EXP - contexto	2	1A	20612.111	28	$1,3 \times 10^{-3}$
EXP - contexto	2	1B	29993.426	30	1×10^{-3}

Dessa forma, de acordo com os dados das Figuras 4, 5, 6 e 7, e da Tabela 2, não houve variação drástica do número de neurônios, comprovando a hipótese de que, mesmo com a região CA2 afetada pelo modelo SE, não haveria alterações significativas no número de células, uma vez que a conexão excitatória entre as diferentes regiões do hipocampo (CA2 dorsal e CA1 ventral) e a projeção para o núcleo *accumbens* não é suficiente para mediar discriminação de estímulos sociais.

4.2. Ativação mediante à novidade social

A ativação da rede neural por meio de uma novidade social foi baseada na hipótese de que os animais, no modelo do *Status Epilepticus*, apresentariam uma redução, em relação ao número de neurônios, entre o grupo controle e o experimental, visto que conexão excitatória entre CA2 dorsal, CA1 ventral e a projeção para o núcleo *accumbens* é necessária e suficiente para mediar a discriminação de estímulos sociais, que, no caso, é a interação com um animal da mesma espécie e sexo. Dessa maneira, após o processo de imunofluorescência, foi possível fazer as análises das imagens das lâminas cerebrais no *software* do ImageJ, alcançando os dados da Tabela 3 e das imagens 8, 9, 10, 11 e 12.

Figura 8 - Imagem da região do hipocampo (esquerda) e contagem de neurônios à vista (direita) – Caixa 5, animal 2A

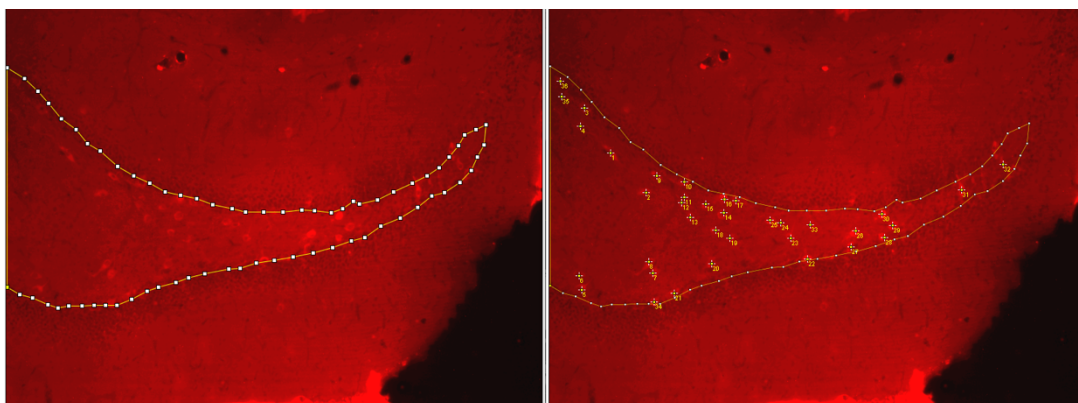


Figura 9 - Imagem da região do hipocampo (esquerda) e contagem de neurônios à vista (direita) – Caixa 5, animal 2B

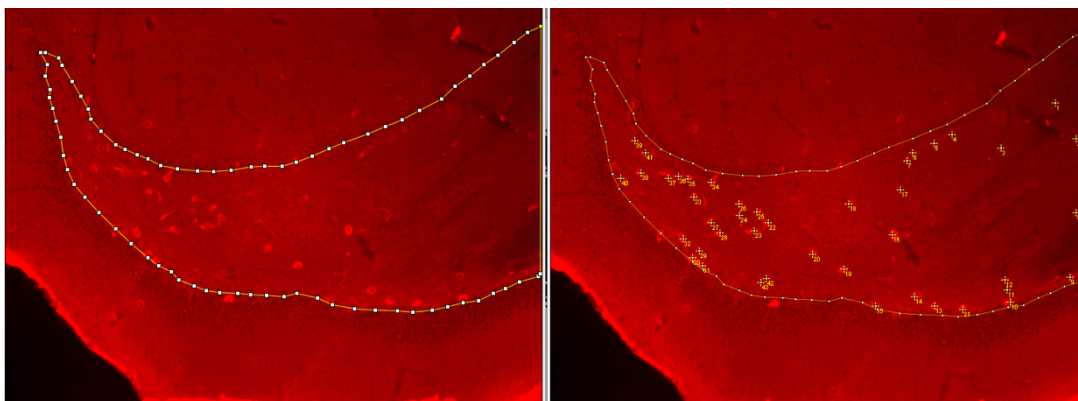


Figura 10 - Imagem da região do hipocampo (esquerda) e contagem de neurônios à vista (direita) – Caixa 7, animal 4A

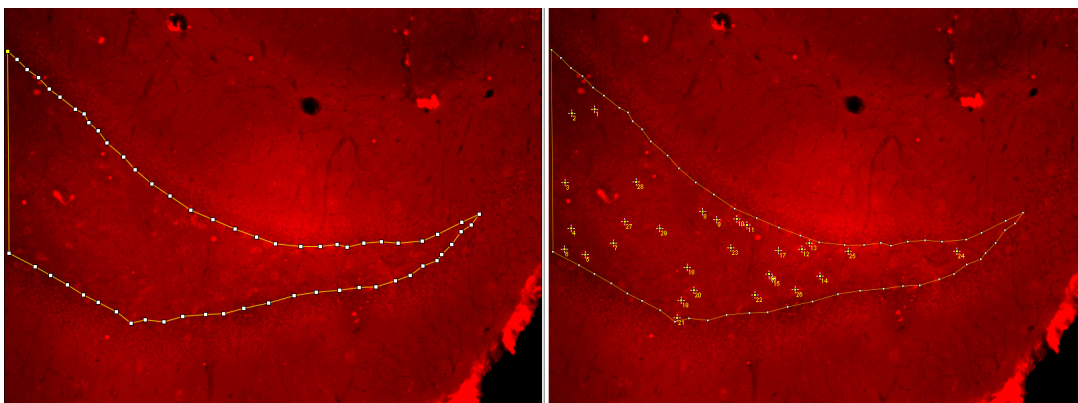


Figura 11 - Imagem da região do hipocampo (esquerda) e contagem de neurônios à vista (direita) – Caixa 9, animal 3

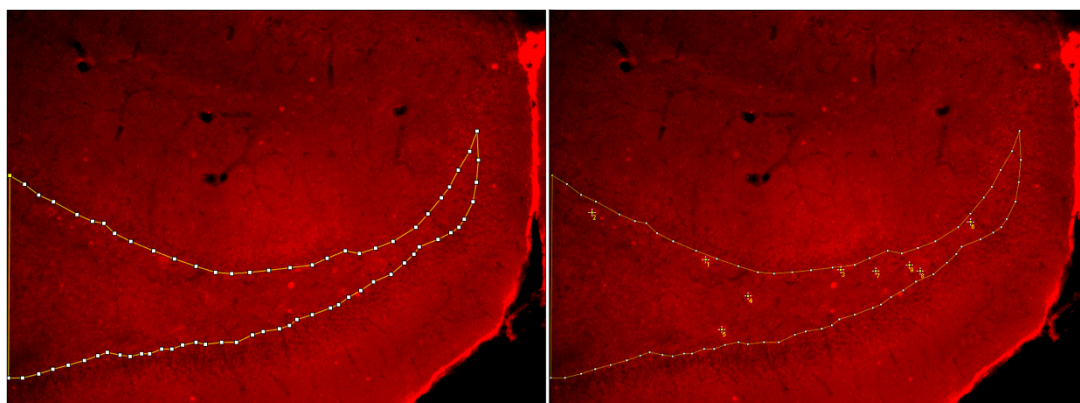
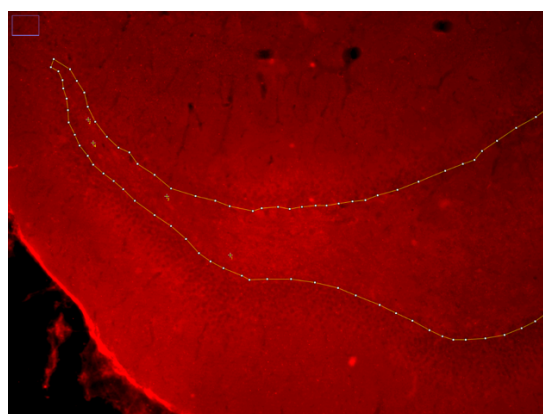


Figura 12 - Imagem da região do hipocampo com a contagem de neurônios à vista – Caixa 9, animal 3A



A partir das Figuras 8, 9, 10, 11 e 12, foram feitas as contagens de neurônios e que estão indicadas na Tabela 3.

Tabela 3. Informações geradas a partir do ImageJ baseado na análise das figuras 8, 9, 10, 11 e 12

GRUPO	CAIXA	ANIMAL	ÁREA (PIXELS / MICRÔMETRO)	CÉLULAS	CÉLULAS POR MICRÔMETRO
CRT – social	5	2A	18250.173	36	$1,9 \times 10^{-3}$
CRT - social	5	2B	29491.003	43	$1,4 \times 10^{-3}$
CRT - social	7	4A	18664.706	29	$1,5 \times 10^{-3}$
EXP - social	9	3	10611.419	9	$8,4 \times 10^{-4}$

EXP - social	9	3A	37621.107	4	1×10^{-4}
-----------------	---	----	-----------	---	--------------------

Dessa forma, de acordo com os dados das Figuras 8, 9, 10, 11 e 12, e da Tabela 3, houve variação drástica do número de neurônios, comprovando a hipótese de que haveria alterações significativas no número de células nas diferentes regiões do hipocampo (CA2 dorsal e CA1 ventral), uma vez que foram afetadas pelo modelo *SE*, ou seja, a conexão excitatória projetada para o núcleo *accumbens*, que é necessária, não foi suficiente para mediar discriminação de estímulos sociais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados apresentados no item 4. Resultados e Discussão, foi constatado que o número de lâminas analisadas foi menor que o esperado, isto, devido ao fato que, durante o método de perfusão, na retirada do encéfalo, o mesmo sofreu alguns danos, o que dificultou o corte pelo vibratomo, provocando a perda de fatias, prejudicando o processo de separação para a imunofluorescência. Outro problema enfrentado foi durante o processo fotográfico das lâminas, onde se observou que a marcação com somatostatina (SST) estava apenas na região do hipocampo (capaz de marcar, por exemplo, núcleo *accumbens* e camadas piramidais), sem marcação expressiva do pré-frontal e que nem todos os animais haviam marcação de SST, podendo indicar um erro de concentração ou aplicação da proteína marcadora. Ademais, na montagem das lâminas, algumas acabaram por apresentar bolhas, impedindo a leitura no microscópio.

Entretanto, apesar das dificuldades enfrentadas durante o projeto, fica evidente que os resultados apresentados (Tabelas 2 e 3 e Figuras 3 a 11), confirmam que a hipótese proposta pode ser verdadeira, dado que a ativação da rede neural associada a um novo contexto, não apresentou alteração no número de células nervosas e a ativação da rede neural relacionada a um novo estímulo social apresentou decaimento do número de neurônios. Todavia, devido à pequena quantidade de amostras para o projeto e para garantir que a suposição do projeto seja totalmente verdadeira, seria necessário considerar uma nova realização dos testes, de maneira a confirmar os resultados apresentados. Além disso, em razão da marcação pela SST (somatostatina), não foi possível identificar, exatamente, os sítios da rede relacionados aos prejuízos da sociabilidade, no modelo do *SE* neonatal, da Rede Neural de Tomada de Decisão Social (RTDS).

Não obstante, o projeto atingiu os seus objetivos, evidenciando que os dados apresentados mostram um avanço na pesquisa em relação às crises epiléticas, de sociabilidade e emocionalidade.

6. REFERÊNCIAS

- BERNARD, P. B.; BENKE, T. A. **Early life seizures: evidence for chronic deficits linked to autism and intellectual disability across species and models**. National Library of Medicine, PubMed, Exp Neurol, October, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.09.018>.
- BERNARD, P. B.; CASTANO, A. M.; BEITZEL, C. S.; CARLSON, V. B.; BENKE, T. A. **Behavioral changes following a single episode of early-life seizures support the latent development of an autistic phenotype**. National Library of Medicine, PubMed, February, Epilepsy Behav, February, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.01.006>.
- BRASIL. Ministério da Justiça. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. **Neurobiologia: mecanismos de reforço e recompensa no uso de drogas de abuso**. Aberta: portal de formação a distância. Florianópolis: UFSC, 2017.
- CASTELHANO, A. S.; CASSANE, G. S.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M. **Altered anxiety-related and abnormal social behaviors in rats exposed to early life seizures**. National Library of Medicine, PubMed, J Neural Transm, Vienna, May, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00036>.
- CASTELHANO, A. S.; RAMOS, F. O.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M. **Early life seizures in female rats lead to anxiety-related behavior and abnormal social behavior characterized by reduced motivation to novelty and deficit in social discrimination**. National Library of Medicine, PubMed, J Neural Transm, Vienna, August, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1291-2>.
- CASTELHANO, A. S.; SCORZA, F. A.; TEIXEIRA, M. C.; ARIDA, R. M.; CAVALHEIRO, E. A.; CYSNEIROS, R. M. **Social play impairment following status epilepticus during early development**. National Library of Medicine, PubMed, J Neural Transm, Vienna, August, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0460-1>.
- CHEVALEYRE, V.; SIEGELBAUM, S. A. **Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop**. National Library of Medicine, PubMed, Neuron, May, 2010. DOI: [10.1016/j.neuron.2010.04.013](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.013).
- COSTA, J. C.; NUNES, M. L.; FIORI, R. M. **Convulsões no período neonatal**. Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, 2001. DOI: 0021-7557/01/77.
- CUI, Z.; GERFEN, C. R.; YOUNG, W. S. **Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus**. National Library of Medicine, PubMed, J Comp Neurol, June, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/cne.23263>.
- GOELDNER, F. O. **Expressão Gênica de Receptores e da Catalase no Circuito de Recompensa de Camundongos Sensibilizados e Não Sensibilizados aos Efeitos Estimulantes do Etanol**. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/xmlui/bitstream/handle/11600/9624/Tese-11628.pdf?sequence=1>.
- IVES-DELIPERI, V.; JOKEIT, H. **Impaired social cognition in epilepsy: a review of what we have learnt from neuroimaging studies**. National Library of Medicine, PubMed, Front Neuron, September, 2019. DOI: [10.3389/fneur.2019.00940](https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00940).
- KNIERIM, J. J. **The hippocampus**. National Library of Medicine, PubMed, Curr Biol, December, 2015. DOI: [10.1016/j.cub.2015.10.049](https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049).
- KOHARA, K.; PIGNATELLI, M.; RIVEST, A. J.; JUNG, H. Y.; KITAMURA, T.; SUH, J.; FRANK, D.; KAJIKAWA, K.; MISE, N.; OBATA, Y.; WICKERSHAM, I. R.; TONEGAWA, S. **Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits**. National Library of Medicine, PubMed, Nat Neurosci, February, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.3614>.

LEITE, Ana. **Área CA2 do hipocampo**. Nature, Columbia University Medical Center, 2014. Disponível em: <https://www.reab.me/essencial-para-memoria-social-area-ca2-do-hipocampo/>.

LEROY, F.; PARK, J.; ASOK, A.; BRANN, D. H.; MEIRA, T.; BOYLE, L. M.; BUSS, E. W.; KANDEL, E. R.; SIEGELBAUM, S. A. **A circuit from hippocampal CA2 to lateral septum disinhibits social aggression**. Nature Journal, December, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0772-0>.

LIMA, M. C. M.; VALENÇA, M. M.; MACHADO, C. E.; PEREIRA, M. E. M.; BRANT, P. K. **Uso da Cannabis medicinal e autismo**. Jornal Memorial da Medicina, 2020, vol. 2, p. 5-14. DOI: <https://doi.org/10.37085/jmmv2.n1.2020.pp.5-14>.

MARIN, J.; MOURA, P.; CYSNEIROS, R. M.; COLUGNATI, D. B.; CAVALHEIRO, E. A.; SCORZA, F. A.; XAVIER, G. F.; ZILBOVICIUS, M.; MERCADANTE, M. T. **Temporal lobe epilepsy and social behavior: an animal model for autism?**. National Library of Medicine, PubMed, Epilepsy Behav, July, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.03.004>.

MARTINS, C. H.; PEREIRA, K. M. **Convulsões Neonatais: Uma Dificuldade Clínica Neonatal**. Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação (REASE), v. 1, n. 01, Junho, 2023. Disponível em: doi.org/10.51891/rease.v1i1.10508.

MEIRA, T.; LEROY, F.; BUSS, E. W.; OLIVA, A.; PARK, J.; SIEGELBAUM, S. A. **A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics**. Nature Journal, October, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06501-w>.

NEWMAN, S. W. **The medial extended amygdala in male reproductive behavior: A node in the mammalian social behavior network**. National Library of Medicine, PubMed, Ann, NY, Acad Sci, June, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x>.

O'CONNEL, L. A.; HOFMANN, H. A. **The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis**. National Library of Medicine, PubMed, J Comp, Neurol, December, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/cne.22735>.

O'CONNEL, L. A.; HOFMANN, H. A. **Evolution of a vertebrate social decision-making network**. National Library of Medicine, PubMed, Science, June, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1218889>.

OKUYAMA, T.; KITAMURA, T.; ROY, D. S.; ITOHARA, S.; TONEGAWA, S. **Ventral CA1 neurons stores social memory**. National Library of Medicine, PubMed, Science, September, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf7003>.

PACÍFICO, A. M.; BATISTA, S. P.; RIBEIRO, F. T.; SANTOS, P. B. D.; SILVEIRA, G. B.; NASCIMENTO, B. P. P.; JUNIOR, E. D.; BARBOSA, G. H. L.; RIBEIRO, M. O.; SILVA, S. G.; CYSNEIROS, R. M. **Dataset on sociability, cognitive function, gene and protein expression of molecules involved in social behavior, reward system and synapse function following early-life status epilepticus in Wistar rats**. National Library of Medicine, PubMed, Data Brief, June, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105819>.

REYNOLDS, C. D.; NOLAN, S. O.; HUEBSCHMAN, J. L.; HODGES, S. L.; LUGO, J. N. **Early-life status epilepticus acutely impacts select quantitative and qualitative features of neonatal vocalization behavior: Spectrographic and temporal characterizations in C57BL/6 mice**. National Library of Medicine, PubMed, Epilepsy Behav, July, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.04.025>.

REYNOLDS, C. D.; SMITH, G.; JEFFERSON, T.; LUGO, J. N. **The effect of early life status epilepticus on ultrasonic vocalizations in mice**. National Library of Medicine, PubMed, Epilepsia, September, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/epi.13450>.

SMITH, A. S.; AVRAM, S. K. W.; CYMERBLIT-SABBA, A.; SONG, J.; YOUNG, W. S. **Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory**. National Library of Medicine, PubMed, Mol Psychiatry, August, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2015.189>.

SOARES, H. L. R.; GONÇALVES, H. C. B.; WERNER JUNIOR, J. **Cérebro e o uso de drogas na infância e adolescência**. Fractal: Revista de Psicologia, v. 22, n. 3, p. 639–639, dez. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/fractal/a/xjYBP8rkDkhJxtqFQ9LmMSH/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 2 de dezembro de 2023.

TALOS, D. M.; SUN, H. Y.; ZHOU, X. P.; FITZGERALD, E. C.; JACKSON, M. C.; KLEIN, P. M.; LAN, V. J.; JOSEPH, A.; JENSEN, F. E. **The Interaction between Early Life Epilepsy and Autistic-Like Behavioral Consequences: A Role for the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway**. National Library of Medicine, PubMed, PLoS One, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035885>.

TAMAMAKI, N.; ABE, K.; NOJYO, Y. **Three-dimensional analysis of the whole axonal arbors originating from single CA2 pyramidal neurons in the rat hippocampus with the aid of a computer graphic technique**. National Library of Medicine, PubMed, Brain Res, June, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90030-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90030-3).

UNICAMP. Universidade Estadual de Campinas. **Neuropatologia e Neuroimagem**. Departamento de Anatomia Patológica, FCM, UNICAMP, [s.d.]. Disponível em: <https://anatpat.unicamp.br/neuroimagem.html>.

WANG, W.; SHIH, Y.; YU, H.; YEN, D.; LIN, Y.; KWAN, S.; CHEN, C.; HUA, M. **Theory of mind and social functioning in patients with temporal lobe epilepsy**. National Library of Medicine, PubMed, Epilepsia, July, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/epi.13023>.

Contatos: andreska_oliveira@hotmail.com e Roberta.cysneiros@mackenzie.br