

IVAIR MATIAS JÚNIOR

Desenvolvimento de um modelo experimental de hemisferotomia em ratos

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do **Título de Doutor.**

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Opção: Morfologia e Medicina experimental

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens Machado

Ribeirão Preto
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Matias Jr, Ivair

Desenvolvimento de um modelo experimental de hemisferotomia em ratos. Ribeirão Preto, 2019.

87 f.: il.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia e Anatomia. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Machado, Hélio Rubens.

1) Hemisferotomia. 2) Neurotraçador. 3) Amina Dextrana Biotinizada . 4) Imagens tomográficas *in vivo*. 5) Córtex cerebral.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matias Jr, Ivair

Desenvolvimento de um modelo experimental de hemisferotomia em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências – Clínica Cirúrgica.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria José, nutridora de amor e auxílio nos momentos em que eu necessitava de repouso.

Ao meu pai, Ivair Matias, um exemplo de força e coragem.

Aos meus irmãos, Igor e Gislaine, e cunhada, Lilian, que sempre estiveram por perto, apoiando e encorajando esta longa caminhada, com muita alegria e amor.

À minha querida sobrinha Sofia, uma luz que surgiu em nossa família nos enchendo de graça e felicidade.

À minha querida e amada esposa, Ana Carolina Coelho, que surgiu em minha vida oferecendo carinho, atenção e luz. Agradeço-lhe pela paciência cotidiana, por ser uma pessoa muito especial na minha jornada, pois transformou de maneira positiva e amorosa o meu olhar para com o mundo. Sem você, nenhuma conquista valeria a pena.

Ao meu irmão e mentor, João de Nazaré, que me forneceu esperança para continuar meu desenvolvimento pessoal com força e coragem.

Ao meu irmão e mestre JESUS, fonte eterna de LUZ e AMOR.

AGRADECIMENTOS

Registro, em primeiro lugar, um agradecimento especial a minha esposa, Ana Carolina, pelo apoio, paciência e incentivo irrestrito e fundamental durante esses seis anos de pós-graduação, principalmente nos momentos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Ao Prof. Dr. Hélio Rubens Machado, pela orientação e pelo conhecimento e por mostrar a necessidade de empenho, a fim de se construírem projetos sólidos para a formação de um ótimo profissional.

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, pela conduta humana, paciência, amizade e aconselhamento, mas, essencialmente, porque se preocupou genuinamente comigo, algo perceptível pelas constantes palavras de conforto e estímulo que me ajudaram a manter a motivação para seguir em frente. Um eterno sentimento de gratidão a Deus por ter conhecido esse grande professor e recebido tanto apoio dele, ao longo dos últimos anos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Gomes da Silva, pelo auxílio e orientações, durante a execução deste projeto: o fornecimento de aparatos científicos que deram suporte para apresentar a qualidade técnica desta pesquisa bem como apoio através de palavras em momentos importantes, ao longo de minha jornada. Agradeço, ainda, as considerações pertinentes e o incentivo e interesse pela evolução do meu trabalho e da minha pessoa.

À Profa. Dra. Luíza Lopes, pela disposição em sanar dúvidas técnicas, orientando no desenvolvimento técnico desta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância, pelos aconselhamentos, pela disposição em me escutar nos momentos de angústia, pela iniciativa e acolhimento com palavras, sorrisos e conhecimentos.

À secretária do Departamento de Cirurgia e Anatomia, Juliana, que sempre se manteve solícita exercendo suas atividades com eficiência, disposição e dedicação ímpares.

À equipe de trabalho do CIREP-HCFMRP/USP, em especial Adriana e Elídia que torcem pelo meu sucesso e por diversas vezes contribuíram para a realização das minhas atividades no HCFMRP/USP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001 e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA), pelo apoio financeiro que permitiu a realização e divulgação desta pesquisa.

Ao companheiro Ricardo Andrade Brandão que se fez presente durante o desenvolvimento deste projeto, auxiliando como um grande amigo e irmão. Os conhecimentos adquiridos com ele durante esse período de doutorado foram muito importantes para o meu desenvolvimento técnico e como ser humano.

Ao amigo Rafael Menezes Reis, meus agradecimentos pela força e companheirismo, pelas conversas que fortaleceram a minha trajetória e que consolidaram o sentimento de estar trabalhando no que acredito (meus objetivos), além da disposição por ter me ajudado em diversos momentos.

Ao meu amigo/irmão Carlos Augusto Bertolino, que há 12 anos estimulou-me a ingressar em um curso de nível superior e apoiou-me materialmente e principalmente emocionalmente/espiritualmente. Nos momentos em que pensei em desistir, este irmão me fez continuar e, agora, chegamos ao fim de mais uma etapa desta jornada acadêmica.

A Daoud Elias, um companheiro que muito auxiliou nos últimos anos com conversas sérias, brincadeiras descontraídas e exemplos de honestidade, tornando-se meu amigo. Agradeço-lhe o modelo de dignidade, a confiança na minha capacidade e, por meio do seu conhecimento técnico-científico, por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver meu projeto de doutorado.

À minha querida Vani Maria Alves Correa, uma pessoa excepcional, grande técnica e principalmente MÃE. Uma grande amiga que ofereceu base técnica para o desenvolvimento do meu doutorado e forneceu conselhos que transformaram os conhecimentos de meu espírito. Grande gratidão pelo respeito e pelo carinho!

Ao meu tio Ademir, um homem além do seu tempo, amigo, preocupado com a unidade FAMÍLIA. Auxiliou-me e incentivou-me nesta trajetória e é uma pessoa a quem devo muita gratidão, amor e respeito.

A Débora Mendonça Matias e família, AMIGA – a quem dedico meu eterno respeito – esta que me ensinou sobre as verdades do mundo (essências), que podemos ser melhores do que somos e que devemos viver integrados, cuidando um dos outros com honestidade, como irmãos.

À minha amiga-irmã, Ana Carolina Dentini Custódio, e à afilhada, Helena, que sempre me acolhem com amor e carinho.

Aos amigos Miro e Laura, meus agradecimentos por terem acreditado em meus objetivos, acolhendo-me em seu lar no início de minha formação na pós-graduação, dando-me a oportunidade de permanecer em Ribeirão Preto e lutar pelos meus desejos.

À minha amiga Laís Bueno Borges, pessoa com bondade infinita que me acolheu com o olhar e coração em momentos de extrema solidão da minha alma; à sua família pelo enorme carinho e amor; a seu pai José Reis, pela assistência prestada na fase inicial de minha trajetória e que foi também um grande impulsionador desta jornada acadêmica.

A Francine Victal, pelo apoio e amizade na criação e solidificação de saberes através da ajuda no entendimento de várias experiências que foram marcantes nos últimos anos, transmutando minhas deficiências em capacidades para superar os desafios do mundo acadêmico, profissional e pessoal.

Ao meu grande amigo e mestre João, um ser que posso chamar de irmão da alma, que me mostrou nos últimos anos que sempre somos acolhidos pelo Mestre Jesus Cristo e que, por meio de pequenos gestos, podemos dedicar os pequenos atos de nossa vida a DEUS, nosso Pai. João é um verdadeiro amigo e irmão de longos e para todos os tempos.

E ao meu PAI, DEUS, por me dar a oportunidade da vida e cuidar de mim com AMOR através do Evangelho de Jesus e, principalmente, por colocar em minha existência todas essas pessoas a quem dedico e agradeço nesta tese.



A todo o momento, podemos reescrever nossa vida. Um passo, um laço, um sorriso é a chama para reconstrução de um mundo; Um mundo que existe em nós. Um mundo que se transfere para aqueles que estão perto de nós.

A ciência da vida não é descobrir a essência dela, mas sim a essência que existe em nós. Somos a verdadeira expressão de Deus e em cada um de nós ressoa a fala do universo.

A diferença em viver é fazer parte do adverso e construir o verso que faz a rima do sorriso de Deus. Recomeçar, mensurar, pormenorizar, singularizar, ampliar, recriar, amar, SER, viver, reverenciar, enfim, ser o espelho da criação, ser a Luz, ser Espírito.

Acreditar, refletir e fletir o amor de DEUS, ser o que somos predestinados a ser, e viver o hoje, encarando-o com amor e simplicidade.

A você desejo o amor da vida, o amor por você.

Amar, pois para ser amado basta amar.

João de Nazaré

RESUMO

Matias Jr, I. **Desenvolvimento de modelo experimental de hemisferotomia em ratos**. 2019. 87f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

INTRODUÇÃO: A hemisferotomia é uma técnica cirúrgica de desconexão hemisférica eficaz para o controle das epilepsias refratárias. Porém, os modelos cirúrgicos nas áreas experimentais da neurocirurgia e reabilitação não abordam a técnica de ressecção e desconexão cortical que reproduza as condições clínicas de tratamento neurocirúrgico. Desta forma, o uso de um modelo experimental para investigar mecanismos relacionados às alterações neurofisiológicas, à neuroplasticidade e à recuperação funcional é relevante para determinar e compreender novas formas de intervenções no tratamento da epilepsia, após intervenção neurocirúrgica. **OBJETIVO:** Desenvolver um modelo experimental de cirurgia em ratos adultos jovens que reproduza os procedimentos da hemisferotomia realizada em seres humanos; Identificação das vias e fibras desconectadas, através de neurotraçamento; Determinar a atividade encefálica através de tomografia computadorizada (SPECT). **MÉTODOS:** Foram utilizados 26 ratos *Wistar* machos, jovens (pesando 260 ± 10 g), distribuídos em dois grupos (cirurgia experimental – CE e controle –CT). O grupo CT não foi submetido à cirurgia experimental, sendo constituído por cinco animais e dividido em dois subgrupos: neurotraçamento (n = 4) e SPECT (n = 1). O grupo CE foi formado por 21 animais. Com relação a esse grupo, oito ratos submetidos à hemisferotomia morreram, antes do desfecho final do experimento; portanto, 13 ratos do grupo CE foram utilizados com a seguinte distribuição: neurotraçamento (n=10) e SPECT (n=3). A cirurgia compreendeu as seguintes etapas: (a) desconexão frontal; (b) ressecção cortical; (c) calosotomia; (d) hipocampectomia; (e) desconexão temporal; (f) desconexão posterior. Para identificar vias e fibras desconectadas após a CE, um neurotraçador anterógrado não fluorescente, a amina dextrana biotinizada (BDA 10000 MW), foi microinjetado, no hemisfério direito, na área motora do neocórtex (M1), de acordo com o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2007), segundo as seguintes coordenadas: anteroposterior (AP) = 0,12 mm; médio-lateral (ML) = 2,0 mm e dorsoventral (DV) = 5,8 mm para M1. Duas semanas após o procedimento cirúrgico, os ratos de ambos os grupos: (a) grupo CT (n = 1) e CE (n = 3) foram anestesiados, e imagens foram obtidas (SPECT), utilizando o fármaco hexametil-propileno-amina-oxima (HMPAO-^{99m}Tc), para verificar a perfusão em áreas funcionais do cérebro dos animais. Para a triagem comportamental e avaliação da atividade locomotora (Teste Rotarod), utilizamos 30 ratos *Wistar*, machos, jovens e adultos, distribuídos aleatoriamente em três grupos: CT (10 ratos), grupo pseudo-operado ou *Sham* = craniotomia (10 ratos) e CE (10 ratos). Os grupos *Sham* e CT não foram submetidos à lesão cerebral. **RESULTADOS:** No CT, as vias corticoestriadas marcadas com BDA foram encontradas ipsilateralmente aos sítios de microinjeção de BDA, sendo possível identificar o cruzamento da linha mediana pelo neurotraçador, por meio do corpo caloso, atingindo o córtex cerebral contralateral e corpos neuronais localizados na camada cortical multiforme. No grupo CE, as microinjeções do neurotraçador no córtex motor primário (M1) mostraram fibras corticais eferentes marcadas ipsilateralmente com BDA e projeções intra-hemisféricas colaterais, positivas para BDA, dirigindo-se para o neostriato, com uma rarefação da projeção inter-hemisférica e ausência de marcação do BDA no hemisfério contralateral, o que sugere uma clara interrupção das vias córtico-corticais. A microinjeção de BDA no neostriado (CPu) demonstrou a preservação das vias córtico-neoestriadas, vias dopaminérgicas nigro-estriadas. Nas imagens obtidas por SPECT, podemos observar que a perfusão cerebral foi uniformemente distribuída nos hemisférios cerebrais,

considerando as áreas encefálicas: rostral/caudal e dorsal/ventral encefálica no grupo CT e que houve hipoperfusão ipsilateral no grupo CE. Com relação à função motora, segundo a análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA), houve efeito significativo do tratamento [$F(34,24) = 2$; $P < 0,0001$], do tempo [$F(2,19) = 27$; $P < 0,007$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F(4) = 21,26$; $P < 0,0001$]. No período pré-operatório, o desempenho motor foi significativamente afetado, de forma que ocorreu aumento no número de tentativas para manter o equilíbrio na barra giratória do Teste *Rotarod*, em 10 dias [teste *post hoc* de Bonferroni; $P < 0,001$ e 30 dias [teste *post hoc* de Bonferroni; $P < 0,001$], após a CE, em comparação com o grupo CT. No entanto, houve tendência de recuperação do déficit funcional, ao longo do tempo. **CONCLUSÃO:** O novo modelo experimental proposto de hemisferotomia mostrou-se tecnicamente viável e comparável aos procedimentos cirúrgicos utilizados atualmente em pacientes com epilepsia refratária. Além de esse novo modelo possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias de reabilitação em modelos experimentais, ele permite descrever as bases neurológicas desta intervenção terapêutica em áreas de neurocirurgia, neurologia experimental e de neuroreabilitação.

Palavras-chave: Hemisferotomia, Neurotraçador, Amina Dextrana Biotinizada não fluorescente; Imagens tomográficas *in vivo*, Córtex cerebral.

ABSTRACT

Matias Jr, I. Development of experimental model of hemispherotomy in rats. 2018. 87f. Thesis (Doctorate) - Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

INTRODUCTION: Hemispherotomy is an effective hemispheric disconnection surgical technique for the control of refractory epilepsy. However, the surgical models in the experimental areas of neurosurgery and rehabilitation do not address the technique of cortical resection and disconnection that reproduces the clinical conditions of neurosurgical treatment. Thus, the use of an experimental model to investigate mechanisms related to neurophysiological changes, neuroplasticity, and functional recovery is relevant to determine and understand new forms of interventions in the treatment of epilepsy after neurosurgical intervention. **OBJECTIVE:** To develop an experimental model of surgery in young adult rats that reproduces the procedures of the hemispherotomy; Identification of disconnected pathways and fibers through neuronal tract *tracing*; To determine the functional brain morphology through computed tomography (SPECT). **METHODS:** Twenty – six male Wistar rats (weighing 260 ± 10 g) were distributed in two groups (experimental surgery – ES and control – CT). The CT group was not submitted to experimental surgery, consisting of five animals and divided into two subgroups: neuronal tract *tracing* (n = 4) and SPECT (n = 1). The ES group consisted of 21 animals. Eight rats submitted to hemispherotomy died before the final outcome of the experiment, therefore, 13 rats of the ES group were used with the following distribution: neuronal tract *tracing* (n = 10) and SPECT (n = 3). The surgery comprised the following steps: (a) frontal disconnection; (b) cortical resection; (c) callosotomy; (d) hypomyelotomy; (e) temporary disconnection; (f) disconnection posterior. To identify unpaired fibers and pathways after EC, the non-fluorescent anterograde neutral - biotinylated amine dextran (BDA 10000 MW) - was microinjected on the right side of the motor cortex (M1) according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (2007) as follows: anteroposterior (AP) = 0.12 mm; (ML) = 2.0 mm and dorsoventral (DV) = 5.8 mm for M1. Two weeks after the surgical procedure, rats from both groups: (a) CT group (n = 1) and ES (n = 3) were anesthetized, and images were obtained (SPECT) using the drug hexamethyl-propylene-amine-oxime (HMPAO-99mTc) to verify perfusion in functional areas of the animals' brains. For the behavioral screening and evaluation of locomotor activity (Rotarod test), we used 30 Wistar rats, male, young and adult, randomly distributed in three groups: CT (10 rats), Sham = craniotomy (10 rats) and ES (10 rats). The Sham and CT group were not submitted to brain injury. **RESULTS:** In CT, BDA-labeled *corticostriatal* pathways were found ipsilaterally at BDA microinjection sites, and it was possible to visualize the crossing of the neurotracer in the corpus callosum, reaching the contralateral cerebral cortex and neuronal bodies located in the multiform cortical layer. In the EC group, microinjections of the neurotracer in the primary motor cortex (M1) showed ipsilaterally labeled corticofugal fibers with BDA and intracortical projections of BDA to neostriatum, with a rarefaction of interhemispheric projection and absence of BDA marking in the contralateral hemisphere, which suggests a clear interruption of the corticocortical routes. The microinjection of BDA

in CPU demonstrated the preservation of the cortico-neostriatal, nigrostriatal dopaminergic pathways. In the images by SPECT, we can observe that the cerebral perfusion was evenly distributed in the cerebral hemispheres, considering the encephalic areas: rostral/caudal and dorsal/ventral brain in the CT group and ipsilateral hypoperfusion in the ES group. Regarding motor function, two-way ANOVA promoted significant treatment effect [$F(34,24) = 2$; $P < 0.0001$], time [$F(2,19) = 27$; $P < 0.007$] and treatment versus time interaction [$F(4) = 21.26$; $P < 0.0001$]. In the preoperative period, motor performance was significantly affected, so that there was an increase in the number of attempts to maintain balance in the Rotarod Test in 10 days [Bonferroni post hoc test; $P < 0.001$ and 30 days [post hoc Bonferroni test; $P < 0.001$], after ES, compared to the CT group. However, there was a tendency to recover the functional deficit over time. **CONCLUSION:** The proposed new experimental model of hemispherotomy was technically feasible and comparable to the surgical procedures currently used in patients with refractory epilepsy. In addition to this new model, it is possible to develop new rehabilitation strategies in experimental models, which allows us to describe the neurological bases of this therapeutic intervention in neurosurgery, experimental neurology and neuro-rehabilitation.

Keywords: Hemisferotomy, Neurotracer, Non-fluorescent biotinylated amine Dextran; CT images in vivo, cerebral cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Técnicas de desconexão e ressecção cortical.	22
Figura 2 - Técnicas cirúrgicas de desconexão e ressecção cortical.....	23
Figura 3 - Hemisferotomia vertical parassagital	23
Figura 4 - Diagrama esquemático da sequência cirúrgica.....	24
Figura 5 - Desenvolvimento do tubo neural.....	26
Figura 6 - Topografia cerebral	27
Figura 7 - Desenvolvimento do cérebro.....	28
Figura 8 - Cortes dos cérebros de roedores e de seres humanos	29
Figura 9 - Fluxograma das atividades experimentais.....	37
Figura 10 - Delineamento experimental.....	38
Figura 11 - Posicionamento.	39
Figura 12 - Limites para a craniectomia.....	40
Figura 13 - Desconexão frontal.....	41
Figura 14 - Ressecção do parênquima cerebral.....	42
Figura 15 - Calosotomia.....	43
Figura 16 - Hipocampectomia.....	44
Figura 17 - Lobectomia.....	45
Figura 18 - Amigdalectomia.	46
Figura 19 - Câmara miniSPECT.	47
Figura 20 - Neurotraçamento	49
Figura 21 - Visão histológica representativa do encéfalo de rato demonstrando os procedimentos da hemisferotomia experimental.....	54
Figura 22 - Procedimento neuroanatômico.	55
Figura 23 - Fotomicrografia neurotraçamento, grupo controle.....	56
Figura 24 - Fotomicrografia neurotraçamento, grupo cirurgia experimental.....	57
Figura 25 - Fotomicrografia neurotraçamento (Cpu), grupo cirurgia experimental	58
Figura 26 - Imagens SPECT.	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Desempenho motor (Teste Rotarod).....	61
--	-----------

LISTA DE SIGLAS

AP	Ânteroposterior
BDA	Traçador Anterógrado Dextrana Amina Biotinizada
CC	Corpo Caloso
CE	Cirurgia Experimental
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Cpu	Caudado- <i>Putamen</i> (neostriado)
CT	Controle
DV	Dorsoventral
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HE	Hemisferotomia experimental
HMPAO	Hexametilpropilenoamina
ICLAS	<i>International Council for Laboratory Animal Science</i>
M1	Córtex motor primário
ML	Médiolateral
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância Negra, parte compacta
SNpr	Substância Negra, parte reticulada
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
TSM	Transecção Subpial Múltipla

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Hemisferotomia.....	21
1.1.1 Técnicas de desconexão e ressecção cortical	22
1.1.2 Modelo experimental.....	25
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Animais	35
4.2. Aspectos éticos.....	35
4.3. Grupos experimentais: hemisferotomia experimental.....	36
4.5. Grupos experimentais: Teste de Comportamento (Teste <i>Rotarod</i>).....	38
4.4. Neurocirurgia: hemisferotomia experimental	38
4.4.1. Desconexão frontal:.....	40
4.4.2. Ressecção do parênquima cerebral:	41
4.4.3. Procedimento de calosotomia:.....	42
4.4.4. Hipocampectomia:	43
4.4.5. Desconexão do lobo temporal:	44
4.4.6. Desconexão posterior:	45
4.5. Imagem – SPECT	47
4.6. Neurotraçamento	48
4.7. Histologia	50
5 RESULTADOS	53
5.1. Neurocirurgia	53
5.1.1. Avaliação clínica	53
5.1.2. Investigação neuroanatômica estrutural	54
5.1.3. Investigação funcional (SPECT).....	58
5.1.4. Investigação comportamental (Teste <i>Rotarod</i>)	61
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	68
8 REFERÊNCIAS	70
9 ANEXOS	79
9.1 Certificado da Comissão de Ética em uso de Animais.....	79
9.2 Publicação de artigo científico - <i>Doutorado</i>	80

9.3 Publicação de artigo científico - <i>colaboração científica</i>	81
9.5 Artigos Submetidos – Aceitos para publicação.....	85
9.5 Artigos Submetidos – <i>Em processo de avaliação pelos pares</i>	87
9.4.1. Mestrado.....	87

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A incidência de epilepsia tem sido alta nos primeiros anos de vida, e a ocorrência de crises durante esse período altamente plástico do sistema nervoso pode causar distúrbios no desenvolvimento normal do cérebro em etapas tardias (Fisher *et al.*, 2017; Ismail *et al.*, 2017; Pearl, 2018). Assim, o tratamento farmacológico com as drogas antiepilépticas tem sido essencial na maioria dos casos; porém, uma parte das crianças ainda continua apresentando crises após o tratamento medicamentoso (Rosati *et al.*, 2015).

Nesse sentido, a busca por outras formas de tratamento e novas intervenções terapêuticas têm se tornado de grande interesse na comunidade médica; dentre elas, a técnica de hemisferotomia tem recebido especial destaque (Terra-Bustamante *et al.*, 2009; Lew, 2014; Kim *et al.*, 2018). Este procedimento cirúrgico envolve a desconexão total de um dos hemisférios cerebrais e tem como objetivo diminuir ou até mesmo extinguir a ocorrência das crises epiléticas em crianças com resistência ao tratamento medicamentoso (Lew, 2014; Santos e Machado, 2017).

Apesar do controle dessas crises e outros benefícios, tais como a reversão do quadro de regressão do desenvolvimento neuropsicomotor e melhora cognitiva, a técnica de hemisferotomia apresenta desvantagens inerentes a esse tipo de cirurgia, tais como hemiparesia residual, perda do controle voluntário dos membros, alterações proprioceptivas e do tônus muscular (De Bode *et al.*, 2007; De Bode *et al.*, 2009). Por outro lado, a notável recuperação motora, caracterizada pela melhora neurológica global, observada em crianças submetidas à ampla ressecção hemisférica tem impressionado vários autores. Segundo Machado *et al.* (2003), o questionamento seria como esses pacientes recuperam-se dos déficits motores, sensoriais e de fala em um curto espaço de tempo, após ampla ressecção de um hemisfério cerebral (Marino *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2003).

Tais resultados são difíceis de serem interpretados à luz da neurologia clássica; no entanto, evidências crescentes apontam para as capacidades plásticas do sistema nervoso central (SNC), embora os mecanismos nos quais ocorre essa plasticidade ainda não sejam bem compreendidos (Machado *et al.*, 2003).

O melhor entendimento de tais meios de recuperação pode ser obtido através de modelos experimentais; desta forma, o desenvolvimento deles torna-se importante na medida em que auxiliam no melhor conhecimento da fisiologia, etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos ou dos efeitos das intervenções cirúrgicas (Pasupuleti *et al.*, 2016; Andersen e

Winter, 2017).

Com relação à epilepsia, os modelos experimentais transformaram-se drasticamente nos últimos anos, devido aos avanços biotecnológicos que contribuíram para o crescente conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na geração de crises, sendo um desses catalisadores o rápido desenvolvimento da genética molecular (Loscher, 2011; 2017).

Uma ampla diversidade de modelos animais está disponível para o estudo da epilepsia, e eles têm uma história comprovada no avanço da nossa compreensão dos processos que conduzem à doença, como mecanismos biológicos de farmacoresistência, desenvolvimento de terapias modificadoras de doença e neuroplasticidade após lesão do SNC (Garcia Garcia *et al.*, 2010; Loscher, 2017). Todavia, é importante observar que os modelos que mais se assemelham à epilepsia de seres humanos, com mecanismos de lesão, intervenção cirúrgica e recuperação após lesões do SNC, ou que guardam estreitas relações com esta, permanecerão em uso, enquanto os demais que não apresentem uma boa possibilidade de reproduzir características da epilepsia que tendem ao ostracismo (Loscher, 2017). No campo da neurocirurgia experimental, foram realizadas pesquisas para a análise dos efeitos comportamentais e clínicos da intervenção neurocirúrgica sobre adaptações funcionais/morfológicas de estruturas neurais, resultando em reorganização neural e recuperação funcional após hemisferectomia e hemidescorticação (Marino *et al.*, 2001; Umeda e Funakoshi, 2014; Wanakhachornkrai *et al.*, 2014). Esses estudos foram baseados em modelos experimentais de técnicas cirúrgicas e utilizaram roedores, felinos e primatas (animais de laboratório jovens e adultos). Nakai *et al.* (2001) e Hashizume e Tanaka (2001), por exemplo, utilizaram ratos e gatos em modelos experimentais de epilepsia focal, nos quais executaram amígdalo-hipocampectomia, calosotomia e transecção subpial múltipla (TSM), com o objetivo de remover o foco cortical epileptiforme e interromper as crises epiléticas (Hashizume e Tanaka, 1998; Tanaka *et al.*, 2001).

No que diz respeito à neurologia experimental, ela investiga os complexos mecanismos neurobiológicos envolvidos na epileptogênese e manutenção de crises (Leite *et al.*, 1990), desenvolvimento de novos fármacos antiepiléticos (Cunha *et al.*, 2005; Fachim *et al.*, 2011; Gelfuso *et al.*, 2013), alterações na plasticidade sináptica (Vianna *et al.*, 2005; Althaus *et al.*, 2016; Willemse *et al.*, 2016; Lenz *et al.*, 2017), alterações neurofisiológicas e neurofarmacológicas na síndrome de imobilidade pós-ictal (Coimbra *et al.*, 2001; de Oliveira *et al.*, 2006; Cycowicz *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2009; de Freitas *et al.*, 2016), neurofisiologia do estado ictal e pós-ictal (Merricks *et al.*, 2015) e recuperação pós-cirúrgica (Hertz-Pannier *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2008; Save-Pedebos *et al.*, 2016; Bulteau *et al.*,

2017).

Apesar de variadas abordagens, nenhuma dessas linhas de pesquisa está relacionada à ressecção de áreas expressivas do cérebro e às desconexões de tratos corticais em animais submetidos a modelos agudos e crônicos de indução epiléptica generalizada, multifocal ou límbica e reorganização cortical. O objetivo deste estudo, portanto, é descrever um novo modelo neurocirúrgico experimental de hemisferotomia em ratos *Wistar* jovens. A nova abordagem cirúrgica auxiliará estudos sobre o tratamento cirúrgico da epilepsia em modelos experimentais crônicos da doença, recuperação de alterações comportamentais induzidas por lesão no SNC, mas também pode abrir novas perspectivas sobre a plasticidade dos circuitos corticais e a recuperação sensório-motora pós-hemisferotomia.

1.1 Hemisferotomia

No ano de 1886, foi realizada a primeira ressecção cirúrgica em um adulto que sofria de crises epiléticas por Sir Victor Horsley (Eadie, 2005). A partir de então, a operação era quase exclusivamente reservada a adultos até que, cada vez mais, passou a ficar claro que os primeiros anos de vida são críticos para a maturação cerebral e também são o período de máxima plasticidade.

A primeira hemisferectomia foi realizada, em 1928, em um adulto com glioma de infiltração difusa (Dandy, 1928), e, desde 1938, o procedimento tem sido usado para tratamento de epilepsias. No entanto, nos anos de 1960, devido a relatos de fatalidades pós-operatórias causadas por hidrocefalia, traumas de cabeça e hemossiderose, a hemisferectomia foi quase abandonada (De Almeida *et al.*, 2006).

Rasmussen propôs, dessa forma, em 1983, o que chamou de hemisferectomia funcional. A técnica consiste em remover o lobo temporal e a parte central dos lobos frontal e parietal; com isso, 3/4 a 4/5 de parênquima cerebral são preservados da remoção em relação à hemisferectomia anatômica. Posteriormente, as porções sobressalentes dos lobos frontal e occipital são desconectadas, o que os torna isolados funcionalmente do restante do cérebro (Rasmussen, 1983).

Seguindo o mesmo princípio básico de remoção cortical parcial associada à desconexão hemisférica, surgiram variantes da abordagem de Rasmussen. Tanto esta como suas variantes, por vezes com nomes particulares, fazem parte de um grupo referido

atualmente como hemisferectomia funcional (De Almeida *et al.*, 2006; Marras *et al.*, 2010) (Figura 1).

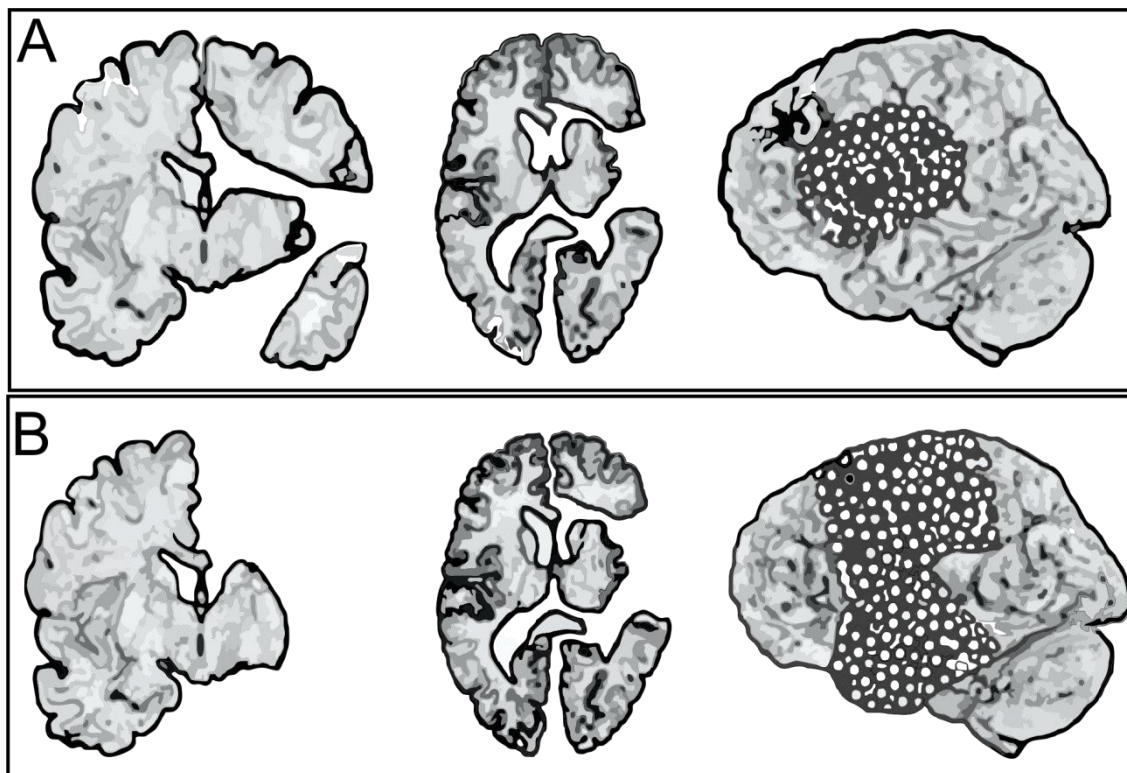


Figura 1 - Técnicas de desconexão e ressecção cortical. Hemisferectomia funcional. A – Abordagem proposta por Rasmussen (1983). B – Abordagem lateral proposta por Delalande (1992).

1.1.1 Técnicas de desconexão e ressecção cortical

Existem diversas estratégias cirúrgicas que podem ser empregadas no tratamento das epilepsias. Estas são classificadas em três grandes grupos: (a) o das cirurgias paliativas (calosotomia); (b) o das cirurgias ressectivas e (c) o das cirurgias desconectivas (Kishima *et al.*, 2013; Jayalakshmi *et al.*, 2014; Jayalakshmi *et al.*, 2017).

No que se refere às técnicas desconectivas (hemisferotomia), elas consistem na remoção de quantidade variável do córtex cerebral associada à desconexão inter-hemisférica (Villemure e Mascott, 1995; Delalande *et al.*, 2007; De Ribaupierre e Delalande, 2008; Jayalakshmi *et al.*, 2017).

Todas essas técnicas desconectivas têm em comum a feitura da ressecção cortical parcial, calosotomia, desconexão dos lobos frontal e occipital e podem ser resumidas em três grupos: (i) hemisferectomia funcional descrita por Rasmussen, na qual uma ampla janela é

aberta nos lobos frontal e parietal para desconexão hemisférica (Rasmussen, 1983); (ii) técnicas que usam a via lateral, trans-sylviana e peri-insular (Villemure e Mascott, 1995) e (iii) a técnica que se utiliza do acesso parassagital para desconectar o hemisfério cerebral – Abordagem Vertical, (Delalande e Dorfmueller, 2008):

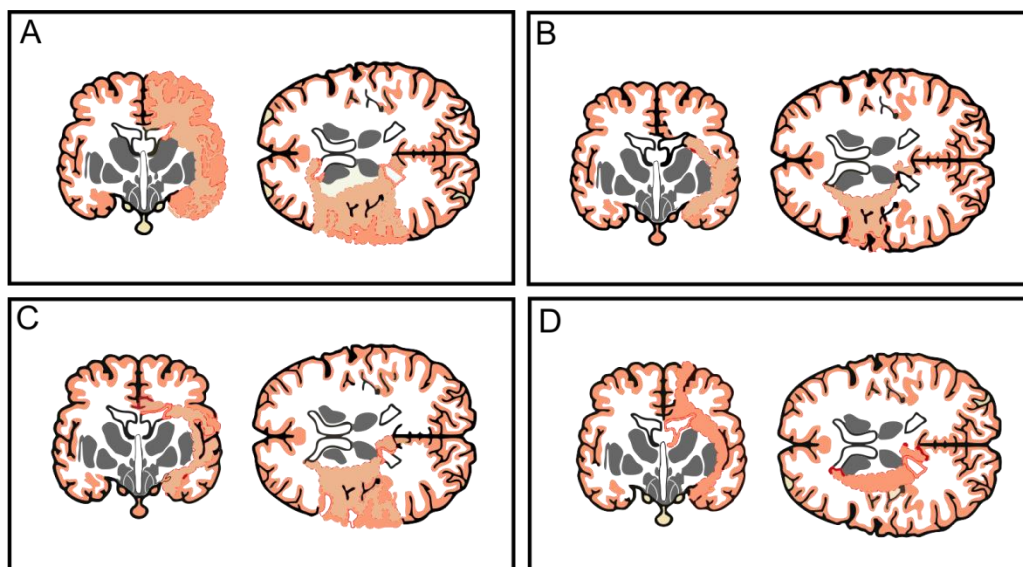


Figura 2 - Técnicas cirúrgicas de desconexão e ressecção cortical: (A) Hemisferectomia funcional. (B) Hemisferotomia – abordagem lateral (trans-sylviana). (C) Hemisferotomia – abordagem lateral (peri-insular). (D) Hemisferotomia – abordagem vertical (parassagital). Adaptado de Marras *et al* (2010).

Apesar de Delalande (1992) ter sido o primeiro autor a usar o termo hemisferotomia, somente anos depois sua técnica de desconexão parassagital foi descrita com detalhes anatômicos adequados (Schramm, 2002; Delalande *et al.*, 2007; Delalande e Dorfmueller, 2008):

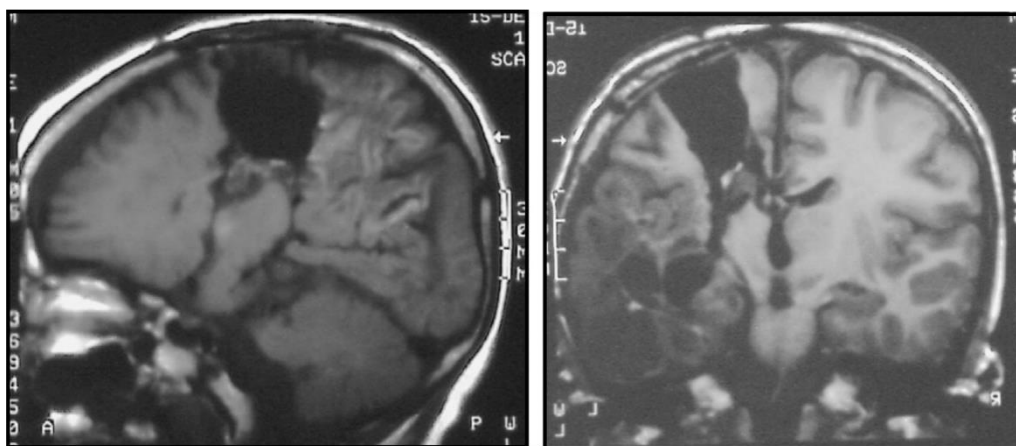


Figura 3 - Hemisferotomia vertical parassagital. Acompanhamento pós-operatório em um caso de doença de Sturge-Weber. Adaptado de Delalande & Dorfmueller, (2007).

Segundo Delalande et al. (2007), a abordagem vertical da hemisferotomia difere das outras técnicas desconectivas em dois aspectos principais (Delalande *et al.*, 2007):

1) o princípio fundamental é reduzir ainda mais a extensão da ressecção cerebral, de forma a aumentar a quantidade de desconexão, introduzindo, assim, o conceito de hemisferotomia;

2) o uso da abordagem vertical, ao invés da abordagem lateral, oferece a possibilidade de fazer exatamente as incisões realizadas na hemisferectomia anatômica, com base em pontos de referência confiáveis. Isso permite que o cirurgião assegure que uma desconexão total efetiva do hemisfério seja alcançada.

A técnica descrita por Delalande et al. (2007) se inicia com uma corticectomia parietal alta. Por essa abertura, o ventrículo lateral é exposto, e uma calosotomia realizada. Utiliza-se, então, uma incisão, passando pela cápsula interna, até o corno temporal, onde as estruturas mediais desse lobo são ressecadas.

Após essa etapa, os ventrículos são utilizados como parâmetro para a desconexão dos lobos frontal e occipital (Delalande *et al.*, 1992; Delalande *et al.*, 2007; Delalande e Dorfmueller, 2008):

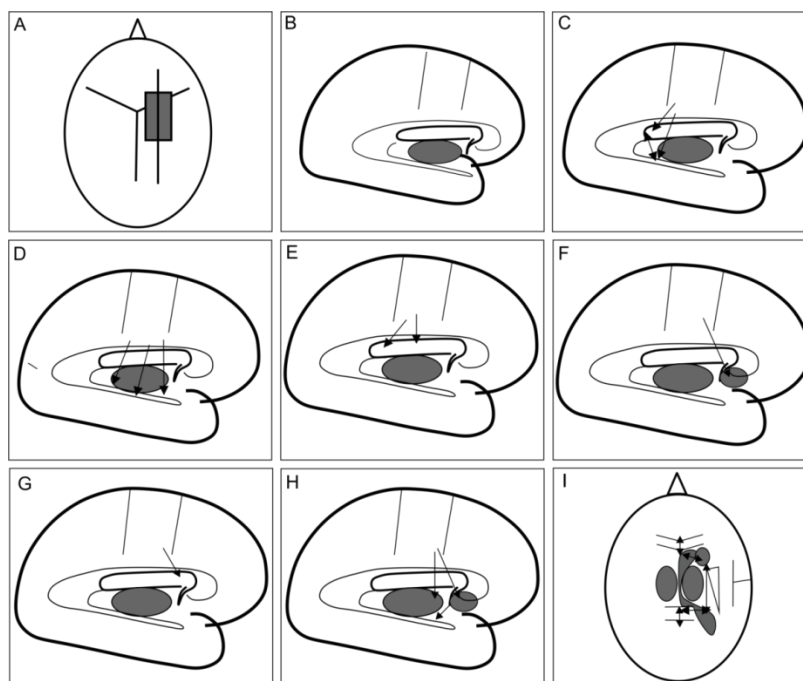


Figura 4 - Diagrama esquemático da sequência cirúrgica – Hemisferotomia vertical parassagital. (A) Incisão na pele. (B) Abordagem ventricular. (C) Calosotomia posterior. (D) Incisão do assoalho do trigono ventricular. (E) Incisão talâmica lateral acima do corno temporal do ventrículo. (F) Calosotomia anterior. (G) Ressecção da parte posterior do giro reto (H) Junção com a incisão talâmica lateral. (I) Hemisferotomia abordagem vertical parassagital. Adaptado de Delalande & Dorfmueller, (2007).

1.1.2 Modelo experimental

A utilização de modelos animais está presente em estudos relevantes de diferentes áreas. Eles são desenvolvidos para o estudo científico, e sua utilização engloba todos os campos das pesquisas médicas atuais, além de possuírem a finalidade de representar uma situação ou condição real (Andersen e Winter, 2017). Esses modelos devem ser precisos e o mais semelhante possível ao que se deseja estudar, uma vez que são ferramentas úteis para desvendar os mecanismos da fisiologia humana e oferecem suporte científico a novas abordagens terapêuticas (Ellenbroek e Youn, 2016).

A determinação do modelo animal para pesquisa científica deve ser realizada durante o planejamento do projeto, pois esta escolha dependerá do que será analisado e quais serão os objetivos a cumprir. Atualmente, várias espécies são utilizadas no desenvolvimento de estudos científicos; entre elas, as mais comuns são coelhos, camundongos, ratos e macacos (Davidson *et al.*, 1987).

Nesse contexto, nas investigações experimentais, os ratos têm uma série de vantagens por permitirem análises etológicas claras (Ellenbroek e Youn, 2016); desta forma, através de uma revisão da literatura, podemos encontrar uma ampla gama de descrições de comportamentos (Balcombe, 2006), estudos detalhados do padrão de recuperação na regeneração morfofuncional, e em procedimentos cirúrgicos, tais como: lesão medular (Kjell e Olson, 2016), lesões cerebrais traumáticas (Bondi *et al.*, 2015) e modelos de epilepsia (Yang *et al.*, 2015; Becker, 2018).

Com relação ao uso de modelos experimentais em neurociências, apesar das diferenças, entre seres humanos e ratos, os resultados de pesquisas interdisciplinares sobre comportamento demonstram que a atividade neural entre essas duas espécies segue as mesmas leis que controlam outros tipos de comportamento; por isso, o mecanismo cerebral que comanda estes comportamentos são muito parecidos (Silva *et al.*, 2016). Em neurociências, nos estudos sobre anatomia comparada entre seres humanos e outros animais, constatamos que o sistema nervoso apresenta características que são adaptadas ao tipo de vida do animal; portanto, com relação ao SNC, o cérebro não é um órgão homogêneo, podendo ser formado por diferentes estruturas. Suas regiões apresentam diferenças em seus ritmos de crescimento, ou seja, o desenvolvimento anatômico, químico e fisiológico do cérebro pode apresentar período crítico de desenvolvimento conforme a espécie (Haartsen *et al.*, 2016). Ao considerarmos a informação acima, o primeiro grande evento do desenvolvimento do SNC em todos os vertebrados é a formação do tubo neural, do qual a medula espinhal e o cérebro

subsequentemente se diferenciam (Stiles e Jernigan, 2010).

Nos roedores, a formação do tubo neural ocorre aproximadamente na metade da gestação, considerando os dias gestacionais (DG) dos roedores que compreende o período 20-21, e a formação do tubo neural em ratos e camundongos ocorre no DG 10,5-11 e 9-9,5, respectivamente (Rice e Barone, 2000) (Ver Figura 5).

Em seres humanos, esse evento ocorre mais cedo durante o desenvolvimento pré-natal, entre os dias 24 e 28 (3-4 semanas), tendo em vista que o período de gestação é de 40 semanas. (Desesso *et al.*, 1999; Rice e Barone, 2000).

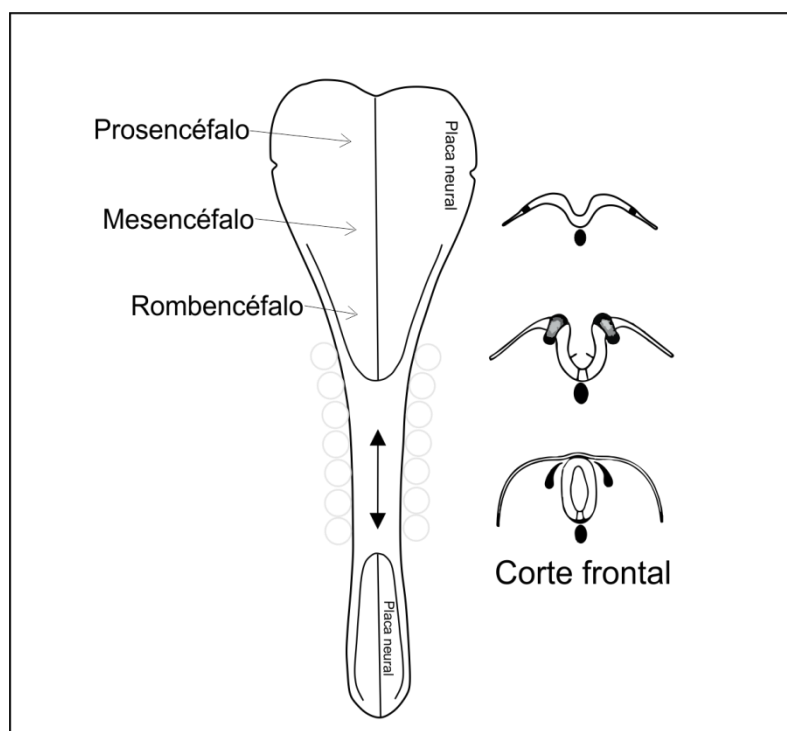


Figura 5 - Desenvolvimento do tubo neural. Desenvolvimento do tubo neural de roedores: DG – 10,5 a 11. Adaptado de Swanson (1992).

Na anatomia comparativa (cérebros de seres humanos e de roedores), o neocórtex humano distingue-se em comparação com a maioria dos outros mamíferos, não apenas pelo seu grande volume absoluto, mas também pelo seu grande tamanho em relação ao rombencéfalo (Snyder *et al.*, 2018).

Uma diferença notável entre o cérebro em desenvolvimento de seres humanos e dos roedores é a ausência de fissuras, giros e sulcos no cérebro do roedor, com exceção da fissura longitudinal que divide os dois hemisférios, devido a mudanças na densidade celular e maturação dos tratos de fibras subcorticais (Bayer *et al.*, 1993; Levine e Barnes, 1999; Dubois *et al.*, 2008).

A espessura da matéria cinzenta e a quantidade de substância branca subjacente são muito maiores em seres humanos em relação aos roedores, como consequência da maior conectividade intra-hemisférica e intra-hemisférica necessária para suportar processos cognitivos, como indicado pelos giros no cérebro humano.

A partir dessas informações, verifica-se que a expansão de células neuroepiteliais neocorticais (em ratos) em relação a mesencéfalo e do rombencéfalo não é pronunciada. Inicialmente, a expansão das células neuroepiteliais neocorticais é menor do que na região do mesencéfalo/rombencéfalo (Martínez *et al.*, 2012).

Portanto, é impossível delimitar regiões específicas do cérebro do roedor com base na superfície topográfica, enquanto tais subdivisões são prontamente definidas para o cérebro humano, através dos giros visíveis e sulcos (Snyder *et al.*, 2018):

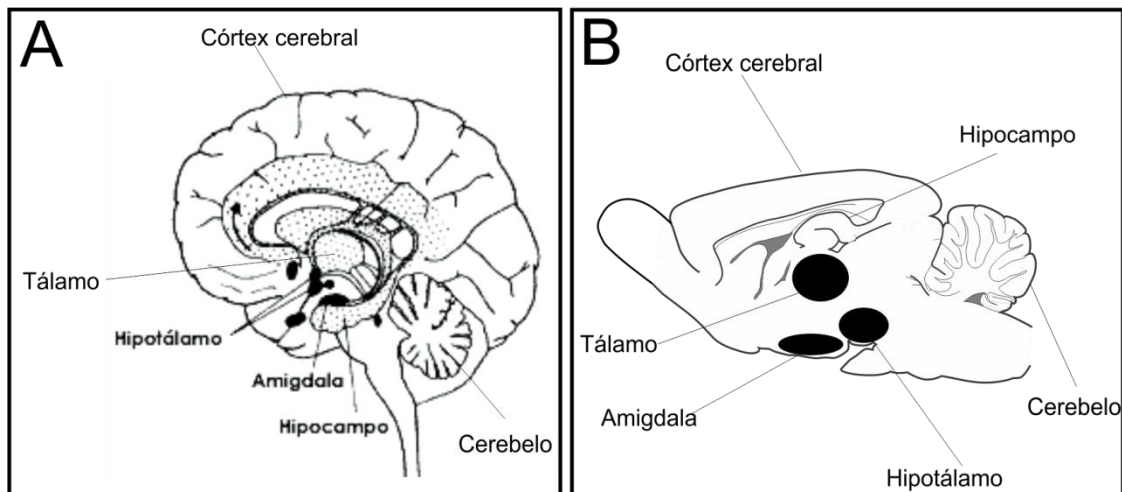


Figura 6 - Topografia cerebral: Superfície topográfica do cérebro de seres humanos (A) e de ratos (B). Note no córtex cerebral de seres humanos a formação de giros e sulcos. Adaptado de Paxinos e Watson (2007) e Snyder *et al.* (2018).

Outro fator que devemos considerar na anatomia comparativa é que no neuroeixo dos roedores o desenvolvimento é linear, ou seja, de rostral para caudal, já nos seres humanos, em razão da postura bípede, ocorre uma curvatura (90°) no sentido horizontal (orientação do cérebro) para o plano vertical (orientação do tronco encefálico) (Snyder *et al.*, 2018).

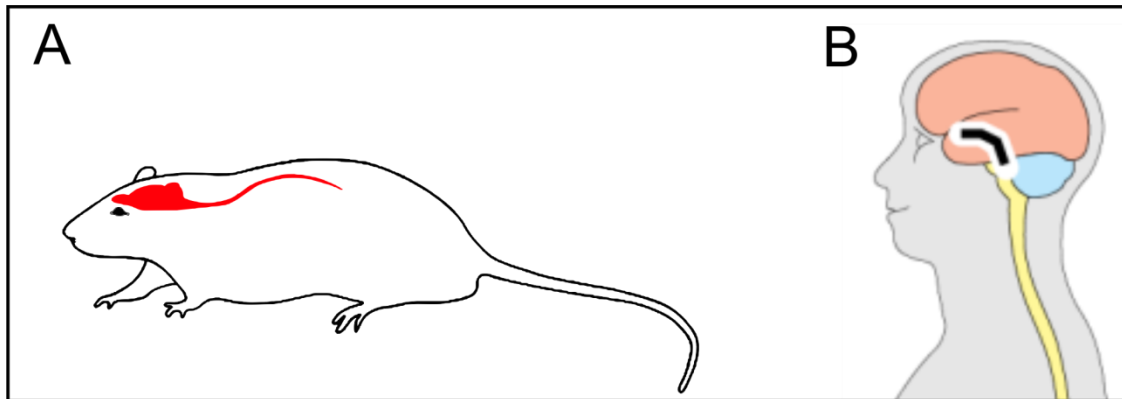


Figura 7 - Desenvolvimento do cérebro: (A) Desenvolvimento linear (rostrocaudal) em ratos. (B) Desenvolvimento em ângulo em seres humanos (90°). Note a forma do SNC na região do tronco encefálico nos seres humanos em comparação com o tronco encefálico dos roedores. Adaptado de (Swanson, 1992).

A adaptação postural em bípedes, em combinação com o maior volume do córtex cerebral e de substância branca em primatas, resultou em diferenças significativas no posicionamento de algumas estruturas neuroanatômicas em seres humanos, em comparação com roedores (Dunbar *et al.*, 1986; Takakusaki, 2017).

Dessa forma, considerando as diferenças significativas no posicionamento das estruturas neuroanatômicas, a melhor maneira de garantir a extrapolação de dados na comparação dos roedores com os seres humanos nos estudos neuroanatômicos está relacionada ao entendimento dos pontos equivalentes e divergentes do cérebro e da medula espinhal como, por exemplo, características internas, como os limites das substâncias cinzenta e branca que podem ser observados em cortes transversais de roedores e seres humanos (Sozmen *et al.*, 2012; Semple *et al.*, 2013; Snyder *et al.*, 2018) Figura 8.

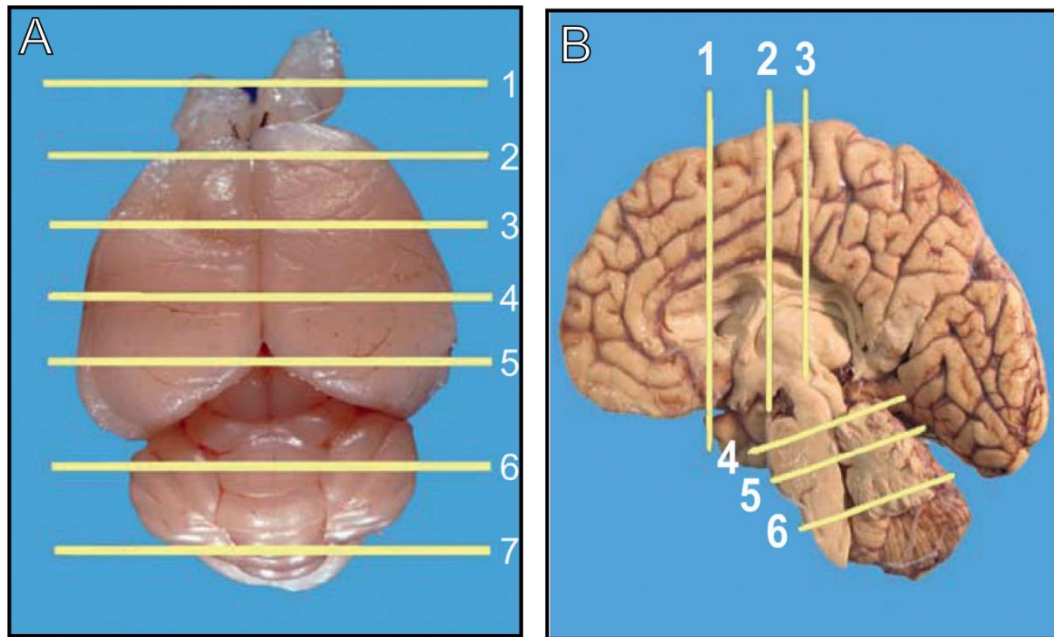


Figura 8 - Cortes dos encéfalos de roedores e de seres humanos: Comparação do desenvolvimento linear do cérebro de roedores (A) e em curvatura em seres humanos (B). O neuroeixo humano é único porque tem uma curvatura de 90 °. Adaptado de Snyder *et al.* (2018).

2 JUSTIFICATIVA

O modelo de tratamento cirúrgico experimental para estudo da epilepsia refratária e os mecanismos da neuroplasticidade, através da ressecção hemisféricas (hemisferectomia) atualmente disponíveis, não simulam a técnica mais usada na prática neurocirúrgica para tratamento da epilepsia refratária, a hemisferotomia. Assim, propomo-nos a desenvolver um modelo experimental de hemisferotomia, estabelecendo parâmetros que permitam a reprodutibilidade do modelo, tais como medidas anatômicas e reconhecimento das vias e fibras desconectadas. Esse método deve permitir estudos futuros que auxiliem pesquisas nas diversas áreas da neurologia e neuroanatomia experimental.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um modelo experimental de cirurgia em ratos adultos jovens que reproduza os procedimentos da hemisferotomia realizados em seres humanos com epilepsia refratária ao uso de fármacos antiepiléticos.

3.2 Objetivos Específicos

- A.** Desenvolver um modelo reprodutível e validado, no qual serão determinados e detalhados todos os parâmetros cirúrgicos, com precisão de medidas e relações anatômicas.
- B.** Identificação das vias e fibras desconectadas através de neurotraçamento.
- C.** Determinar a atividade encefálica de animais hemisferotomizados através de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT).

4 Material e Métodos

4 MATERIAI E MÉTODOS

4.1. Animais

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados 26 ratos *Wistar* machos, jovens (pesando $260 \pm 10\text{g}$), com média de idade de 45 dias. Durante os experimentos, os animais ficaram alojados no biotério do prédio da Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em caixas de polipropileno com tampa gradeada de aço em grupos de até quatro animais por caixa.

Antes de iniciar o experimento, os animais passaram por um período de adaptação e ambientação de 24 horas, com ciclos de claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas das 7h às 19h e desligadas das 19h às 7h) e com controle da temperatura ambiente entre 22 e 25°C. Dieta comercial (NUVLAB CRI-NUVITA) e água foram oferecidas *ad libitum*.

4.2. Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo os animais estavam de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo comitê local, o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – CETEA) – processo 54/2015 – e do Hospital Israelita Albert Einstein – processo SGPP # 2870-16 – em conformidade com a ética em pesquisa animal adotada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), entidade filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS).

Todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento e a quantidade de animais usados nesta pesquisa.

4.3. Grupos experimentais: hemisferotomia experimental

Os ratos foram distribuídos em dois grupos experimentais: grupo controle (CT, n = 5) e cirurgia experimental (CE, n = 21). Todos os grupos receberam uma injeção do neurotraçador anterógrado dextrana amina biotinizada (BDA), no hemisfério cerebral direito (Figura 1A).

Para a microinjeção do traçador, utilizamos as seguintes coordenadas:

- **Córtex motor primário (M1)**
 - ✓ Ântero-posterior (AP) = 0,12 mm (Bregma);
 - ✓ Médio-lateral (ML) = 2,0 mm;
 - ✓ Dorso-ventral (DV) = 5,8 mm.

- **Caudado-Putamen (Cpu)**
 - ✓ Ântero-posterior (AP) = 1,92 mm (Bregma);
 - ✓ Médio-lateral (ML) = 2,6 mm;
 - ✓ Dorso-ventral (DV) = 5,0 mm.

As coordenadas estereotáxicas foram obtidas com auxílio do atlas do encéfalo de rato em coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (2007). A coordenada ântero-posterior utilizou como referência o bregma.

Os animais remanescentes (n = 4 do CT e CE = 10) foram sacrificados 10 dias após procedimentos de neurotraçamento e/ou neurotraçamento/neurocirurgia.

Oito ratos submetidos à hemisferotomia morreram antes do desfecho final do experimento; portanto, 13 ratos foram utilizados na presente investigação neuroanatômica (Figuras 9A e 9B).

4.4. Grupos experimentais: Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT)

Para a obtenção de imagens por SPECT, formou-se um grupo independente de ratos Wistar constituído por um rato do grupo de controle (*naïve*) e três ratos do grupo submetido à cirurgia experimental. A perfusão cerebral foi feita com Tecnécio [99mTc] HMPAO SPECT, duas semanas após a cirurgia (Figura 9B).

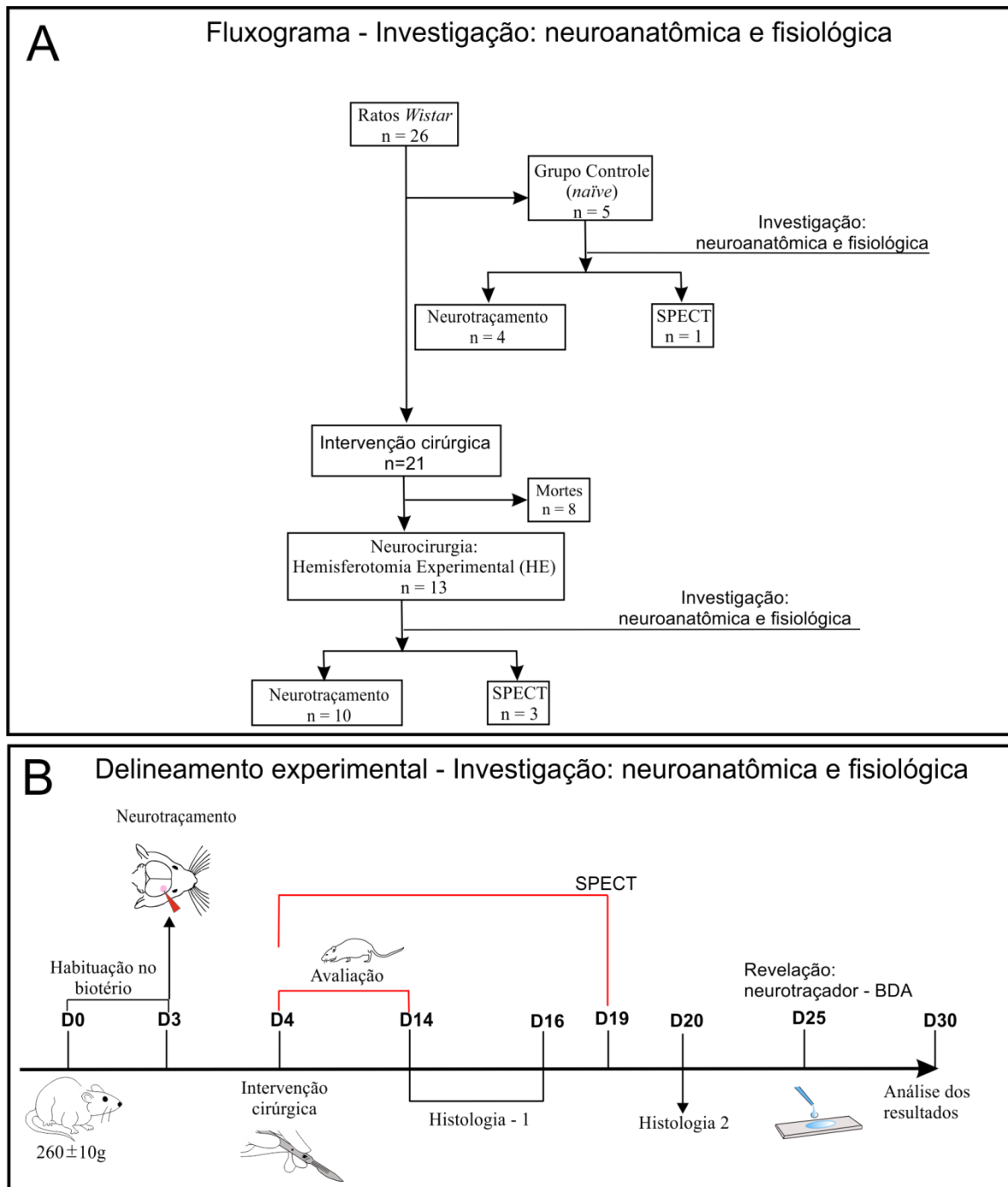


Figura 9 - Fluxograma das atividades experimentais. **1A:** Os ratos do grupo CT não foram submetidos à neurocirurgia e foram avaliados através de neurotraçamento e tomografia computadorizada (SPECT). A intervenção cirúrgica foi realizada nos animais submetidos à CE (Hemisferotomia Experimental - HE). O grupo CE foi inicialmente composto por 21 animais: 8 morreram, 10 foram submetidos ao neurotraçamento e 3 foram submetidos à SPECT. **1B:** Delineamento experimental da investigação neuroanatomofisiológica: 12 horas após o neurotraçamento, os animais foram submetidos à HE. O acompanhamento da avaliação clínica ocorreu durante 10 dias, e a aquisição das imagens SPECT foi realizada 2 semanas após a HE. Revelação do neurotraçador BDA = visualização de conexões inter-hemisféricas; Histologia 1 = preparação de tecido encefálico: perfusão, diafanização e fixação de parafina; Histologia 2 = seccionamento cerebral para o procedimento histoquímico.

4.5. Grupos experimentais: Teste de Comportamento (Teste *Rotarod*)

Um segundo grupo, formado por 30 ratos (n=10 ratos por grupo) *Wistar*, machos, foi distribuído aleatoriamente em outros três grupos: controle (*naïve*), pseudocirurgia (*Sham*) e cirurgia experimental (hemisferotomia). Esses animais foram utilizados para avaliação motora por meio do teste *Rotarod*. Os grupos *Sham* e controle não sofreram lesão cerebral:

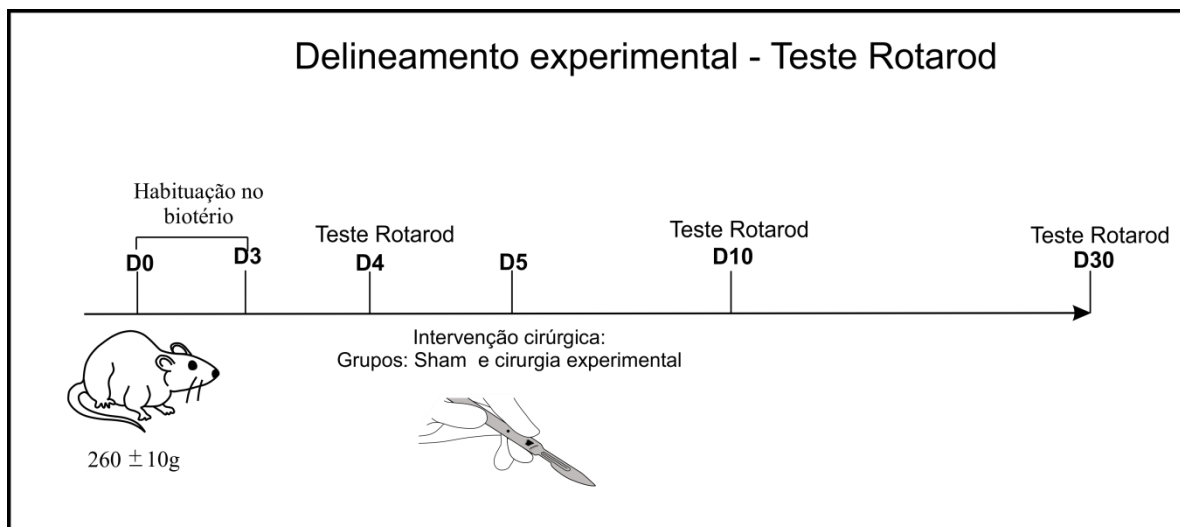


Figura 10 - Delineamento experimental – Teste de comportamento (*Rotarod*): habituação no biotério da FMRP – USP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo), Departamento de Cirurgia e Anatomia por 3 dias. Teste *Rotarod* antes da cirurgia no quarto dia; no quinto dia procedimento cirúrgico nos grupos hemisferotomia experimental e *Sham* e teste de *Rotarod* 10 e 30 dias após a cirurgia.

4.4. Neurocirurgia: hemisferotomia experimental

Os experimentos cirúrgicos foram desenvolvidos em sala com controle térmico, com temperatura ambiente mantida a 21°C. Os animais foram colocados individualmente na câmara anestésica, e a anestesia foi induzida com uma mistura 5% de isoflurano (Isoforina, Cristália Farmacêutica e Química Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil) e 100% de oxigênio, fornecidos a uma taxa de 1L/min, até perda do reflexo postural.

Em seguida, foi reduzida a concentração de isoflurano para 1,5-2% em 100% de oxigênio, administrado por intubação endotraqueal e mantido sob ventilação controlada (CR Bion) a uma taxa de 1L/min.

Cada rato foi tratado com uma injeção intramuscular de penicilina G-Benzatina (120 000 UI; 0,1 ml), seguida de injeção subcutânea do analgésico e anti-inflamatório Flunixinina

meglumina (2,5 mg / kg) e posicionado em mesa cirúrgica aquecida para pequenos roedores, em decúbito ventral (Figura 3A).

A região dorsal da cabeça foi tricotomizada, seguida de assepsia e antissepsia com solução de clorexedina a 0,5% (VIC PHARMA Indústria e Comércio Ltda., Taquaritinga, São Paulo, Brasil).

Uma incisão cirúrgica foi feita na linha mediana com bisturi lâmina 15, envolvendo pele, subcutâneo e periósteo, de 2 mm à frente da sutura coronal até 1mm atrás da sutura lambdoide. O periósteo do lado esquerdo do crânio foi descolado, até exposição a das suturas coronal, lambdoide e sagital, e identificação da linha temporal:

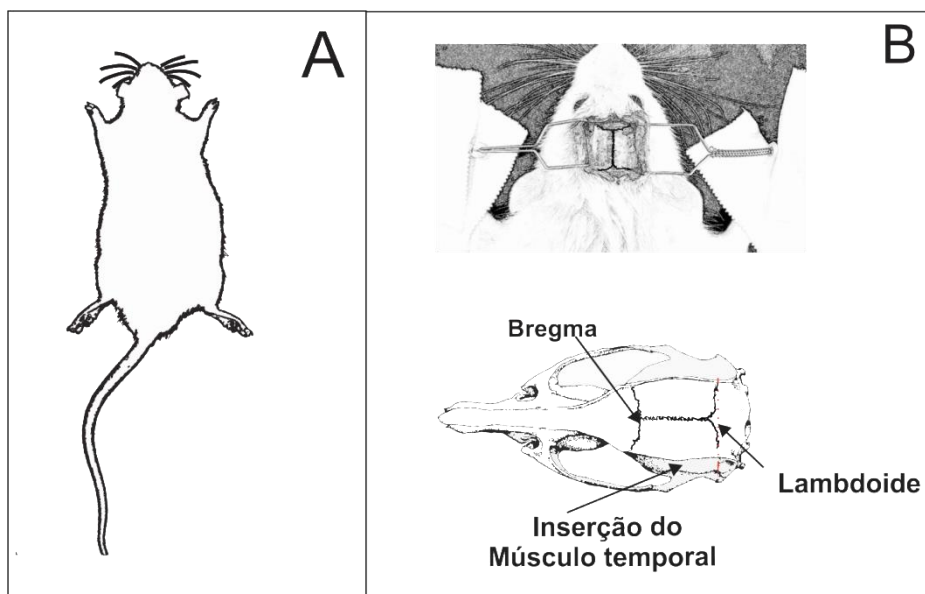


Figura 11 - Posicionamento: (A) Posicionamento do animal em decúbito dorsal após anestesia. (B) Incisão, deslocamento do periósteo e exposição das suturas coronal, lambdoide e sagital, e identificação da linha temporal.

Com auxílio de um motor elétrico (DREMEL®, *Flex Shaft*, MultiPro, Modelo 225 T2, *Illinois*, Chicago, EUA) com broca de ponta esférica, diamantada e delicada, um retalho ósseo foi retirado cuidadosamente, mantendo a integridade das meninges de *dura-mater* subjacentes.

Foram respeitados os seguintes limites para a craniectomia: anterior = 2mm à frente da sutura coronal; medial = ½ mm lateral à sutura sagital (com preservação de estreita faixa óssea sobre o seio sagital superior); posterior = sutura lambdoide; lateral = linha temporal ou inserção do músculo temporal):

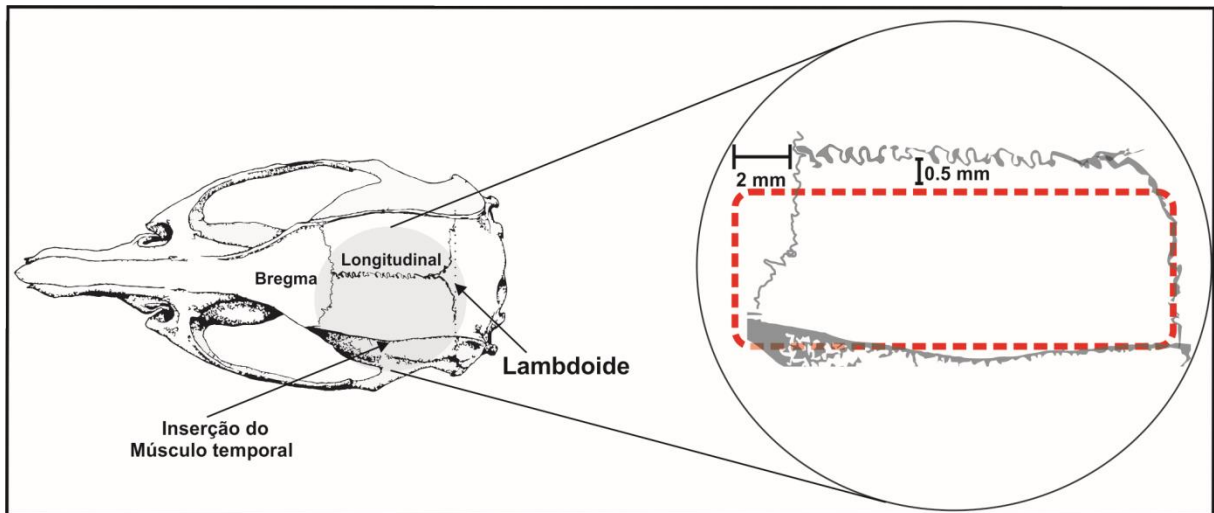


Figura 12 - Limites para a craniectomia.

Foi realizada uma incisão no formato C e, com base na linha mediana, foi feita na *dura-mater*, com auxílio de um microscópio estereotáxico (D.F Vasconcellos S.A, São Paulo, Brasil), e instrumentos usados em cirurgia oftálmica, como minipinças curvas e minitesoura delicada, dentro dos limites da craniectomia.

Após criteriosa hemostasia com minicoagulador bipolar, iniciou-se a hemisferotomia, de acordo com as seguintes etapas:

4.4.1. Desconexão frontal:

A desconexão do lobo frontal foi realizada 1 mm à frente da projeção da sutura coronal imediatamente à frente da comissura anterior, através de um instrumento de ponta redonda, de forma que o limite inferior da desconexão foi a base do crânio:

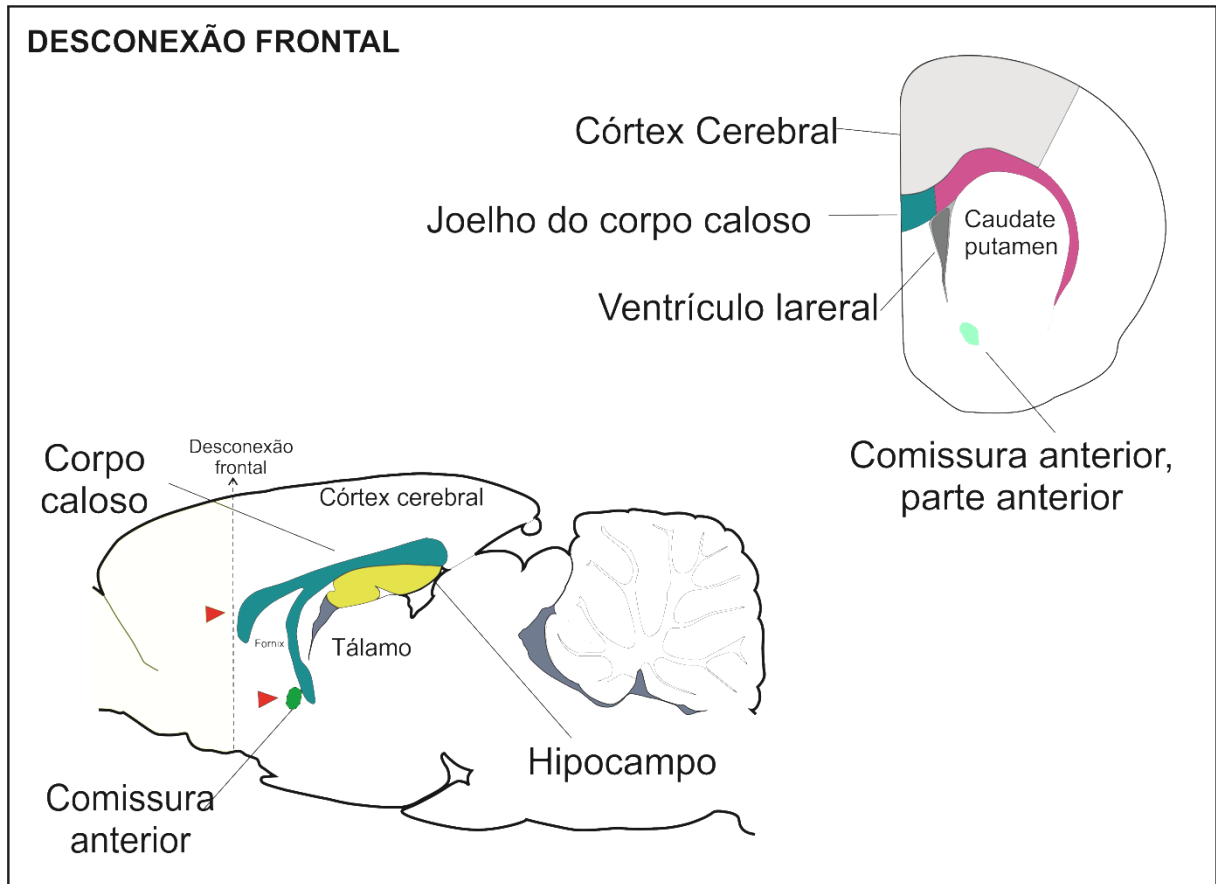


Figura 13 - Desconexão frontal. Primeira etapa da hemisferotomia experimental. Visão encefálica sagital: desconexão do lobo frontal e comissura anterior (cabeças de setas vermelhas).

4.4.2. Ressecção do parênquima cerebral:

O parênquima cerebral foi ressecado por aspiração no limite da desconexão do lobo frontal. O limite mais profundo da ressecção foi a visualização de estruturas subtelencefálicas e arqueocórtex. Considerando os limites anterior e lateral da ressecção, houve a exposição do corno anterior do ventrículo lateral e do caudado-*putamen*. Quanto ao limite posterior da ressecção cortical, este foi definido pelo surgimento do hipocampo dorsal. Nesta fase cirúrgica, o cirurgião manteve a integridade destas estruturas.

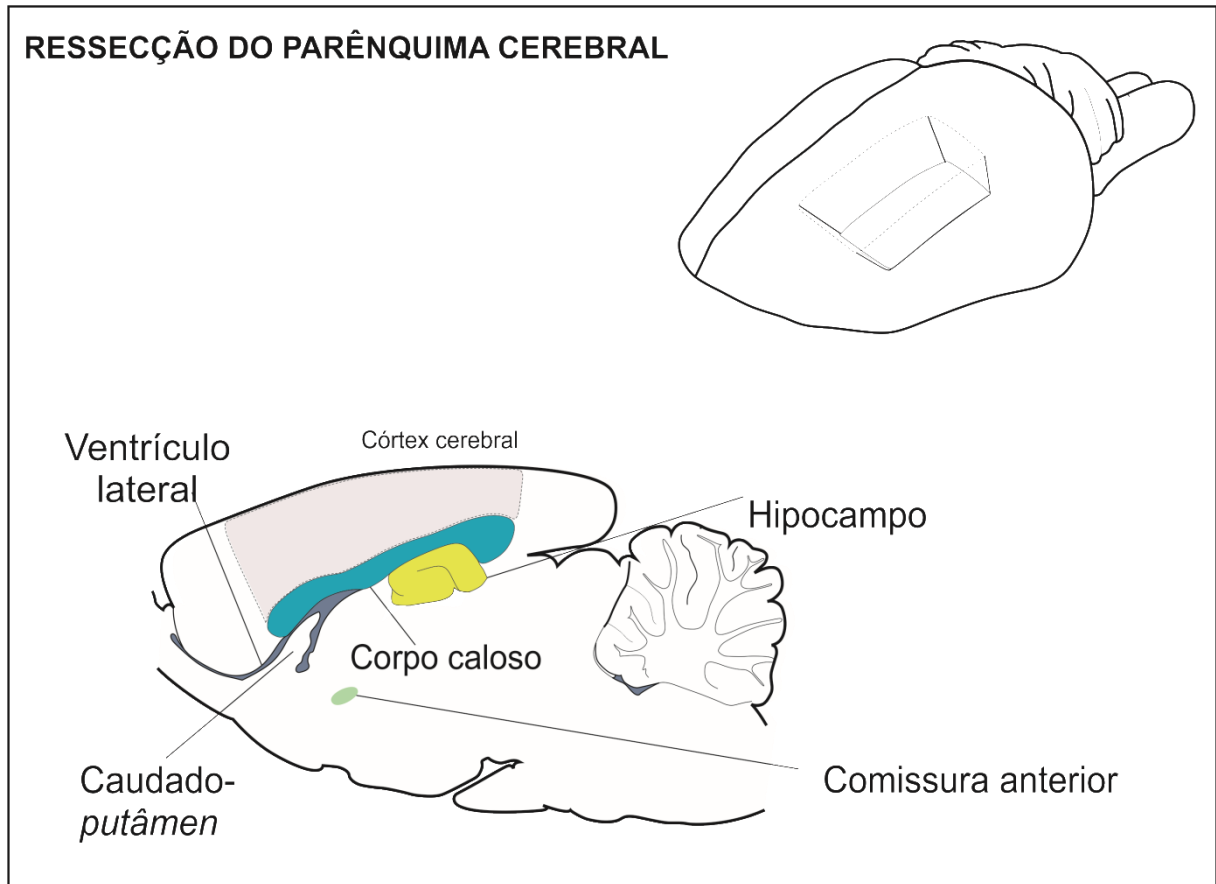


Figura 14 - Ressecção do parênquima cerebral. Segunda etapa da hemisferotomia experimental. Visão encefálica sagital: a linha tracejada representa a remoção do bloco tecidual, constituído por córtex cerebral e substância branca subcortical (linha tracejada).

4.4.3. Procedimento de calosotomia:

Após a ressecção do parênquima cerebral, o microscópio estereoscópico foi utilizado para visualizar o corpo caloso (localização das referências: anterior - caudado-putâmen e ventrículo lateral, posterior – hipocampo) e o instrumento de desconexão (medida: aproximadamente 12 mm de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e com 1 mm em uma extremidade afiada e dobrada no ângulo de 10°) foi posicionado paralelo em relação ao corpo caloso. Esse corpo caloso foi seccionado no plano rostrocaudal, de forma que ele acompanhasse o ângulo desta comissura com a extremidade cortante do instrumento direcionada ligeiramente para cima. O limite anterior da desconexão (visando ao joelho do corpo caloso) foi de 2 mm à frente da craniectomia e do limite posterior (visando ao esplênio do corpo caloso) 1 mm após a craniectomia, com a extremidade cortante do instrumento ligeiramente para baixo:

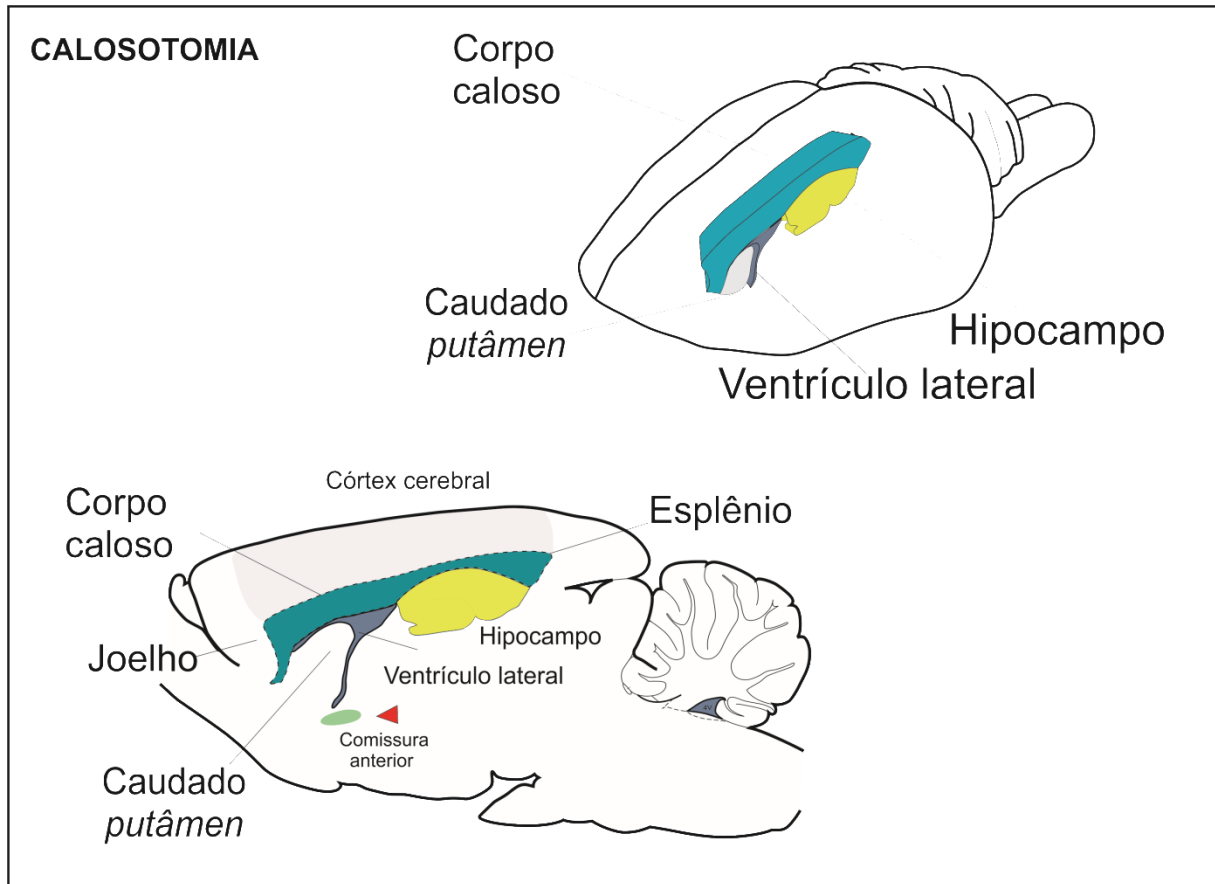


Figura 15 – Calosotomia. Terceira etapa da hemisferotomia experimental. Visão encefálica sagital: desconexão do corpo caloso (linha tracejada).

4.4.4. Hipocampectomia:

Com a ressecção do parênquima cerebral, remoção da substância branca subcortical e desconexão do corpo caloso, a saliência dorsal do hipocampo foi identificada e ressecada por aspiração. A hipocampectomia foi cuidadosamente realizada até a identificação visual do tálamo dorsal, no assoalho do ventrículo lateral. Após visualizar o *fornix*, ele também foi cuidadosamente seccionado, como está mostrado na Figura 16.

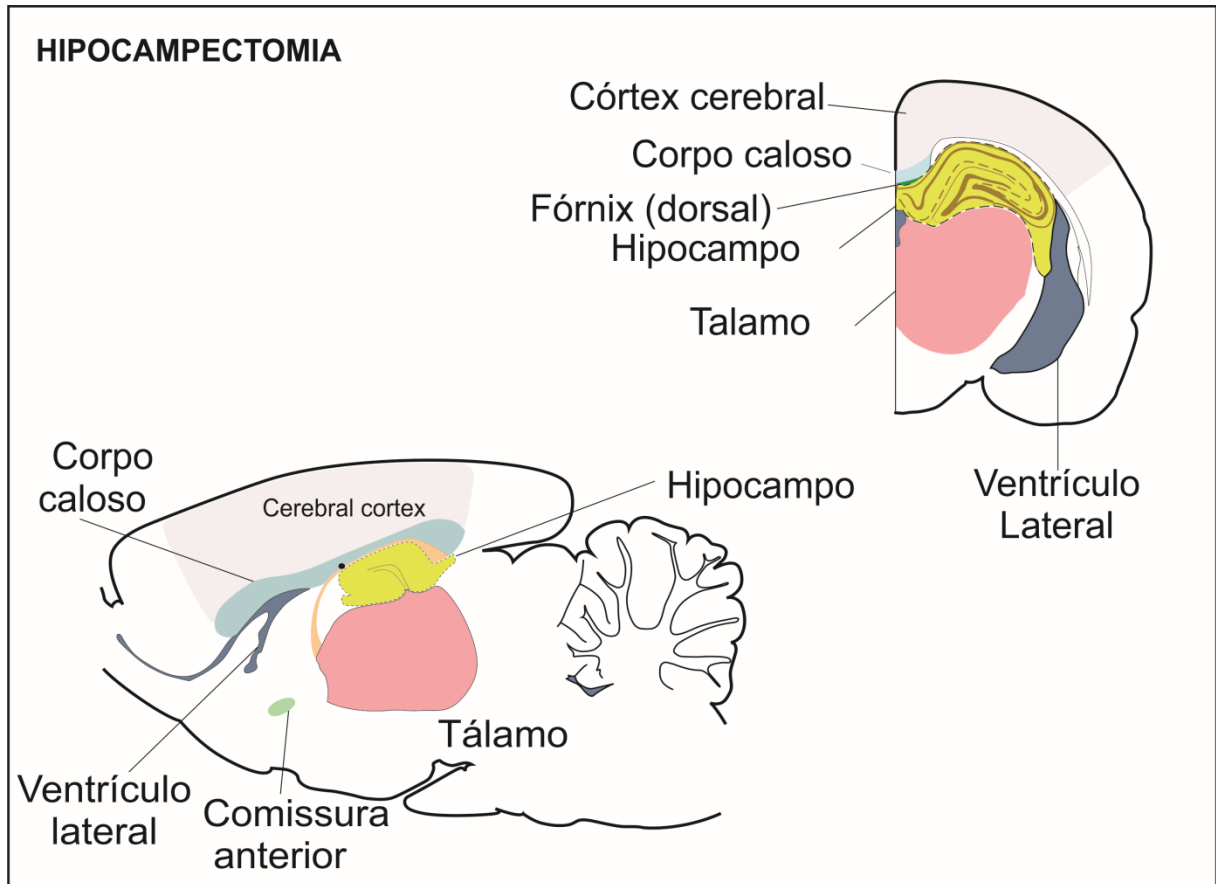


Figura 16 - Hipocampectomia. Quarta etapa da hemisferotomia experimental. Visão encefálica sagital e corte coronal posterior demonstrando hipocampectomia dorsal (linha tracejada).

4.4.5. Desconexão do lobo temporal:

A desconexão da cápsula externa foi realizada com um dissecador cirúrgico, seguindo o ângulo da cápsula externa lateral ao caudado e *putamen*. O limite anterior foi o mesmo da região da desconexão frontal (1 mm à frente da projeção da sutura coronal imediatamente à frente da comissura anterior), e o limite posterior desta etapa foi a região da sutura lambdoide dorsal e lateralmente ao ventrículo lateral. A base do crânio foi o limite inferior da desconexão, como podemos observar na Figura 17.

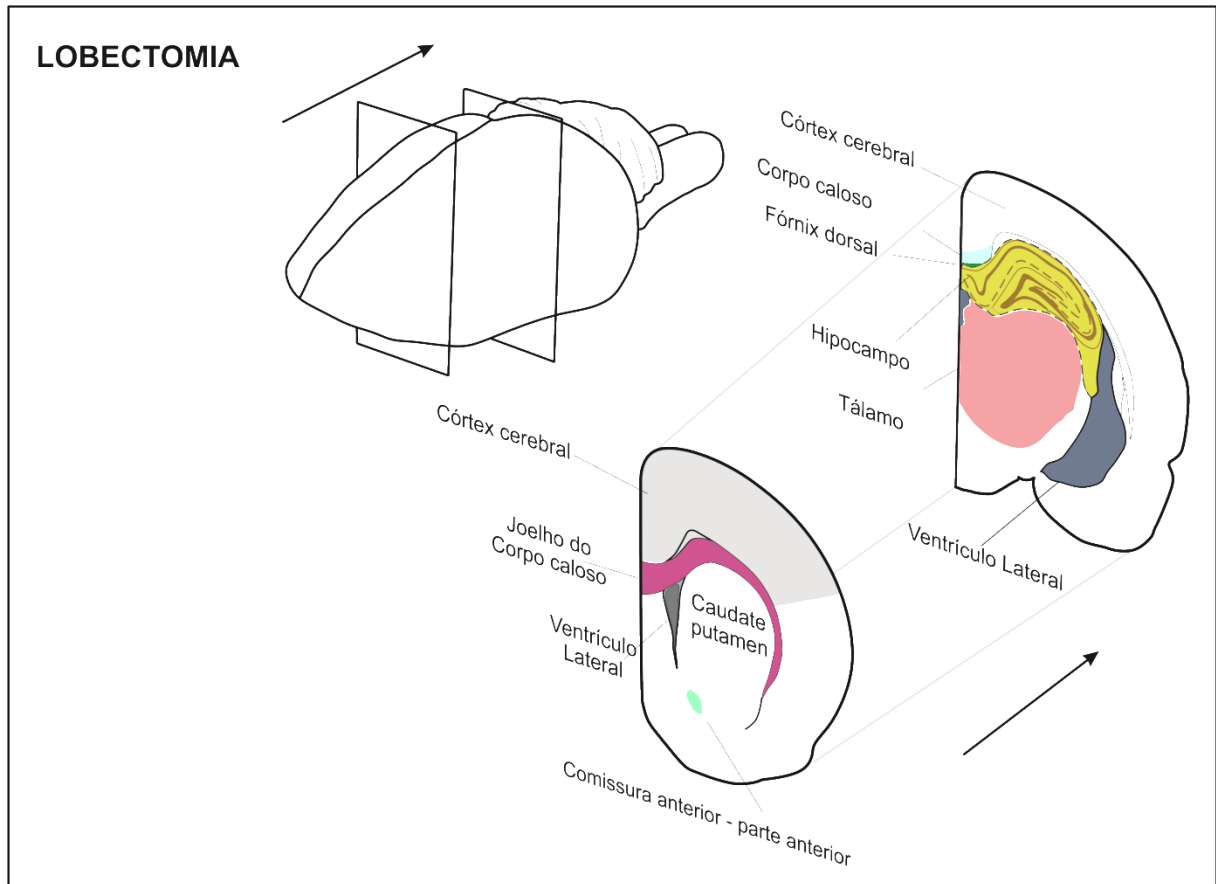


Figura 17 – Lobectomia. Quinta etapa da hemisferotomia experimental. Desconexão da cápsula externa (linha tracejada).

4.4.6. Desconexão posterior:

O instrumento de dissecação foi inserido no ventrículo lateral no plano sagital lateral na linha média da craniectomia na inserção do músculo temporal e dirigido ao plano sagital para o limite medial posterior do crânio, frontal à sutura lambdoide cerca de 1 mm, após a craniectomia, desconectando o complexo amigdalóide e as fibras do córtex entorrinal do hipocampo (amigdaló-hipocampectomia), conforme mostra a Figura 18.

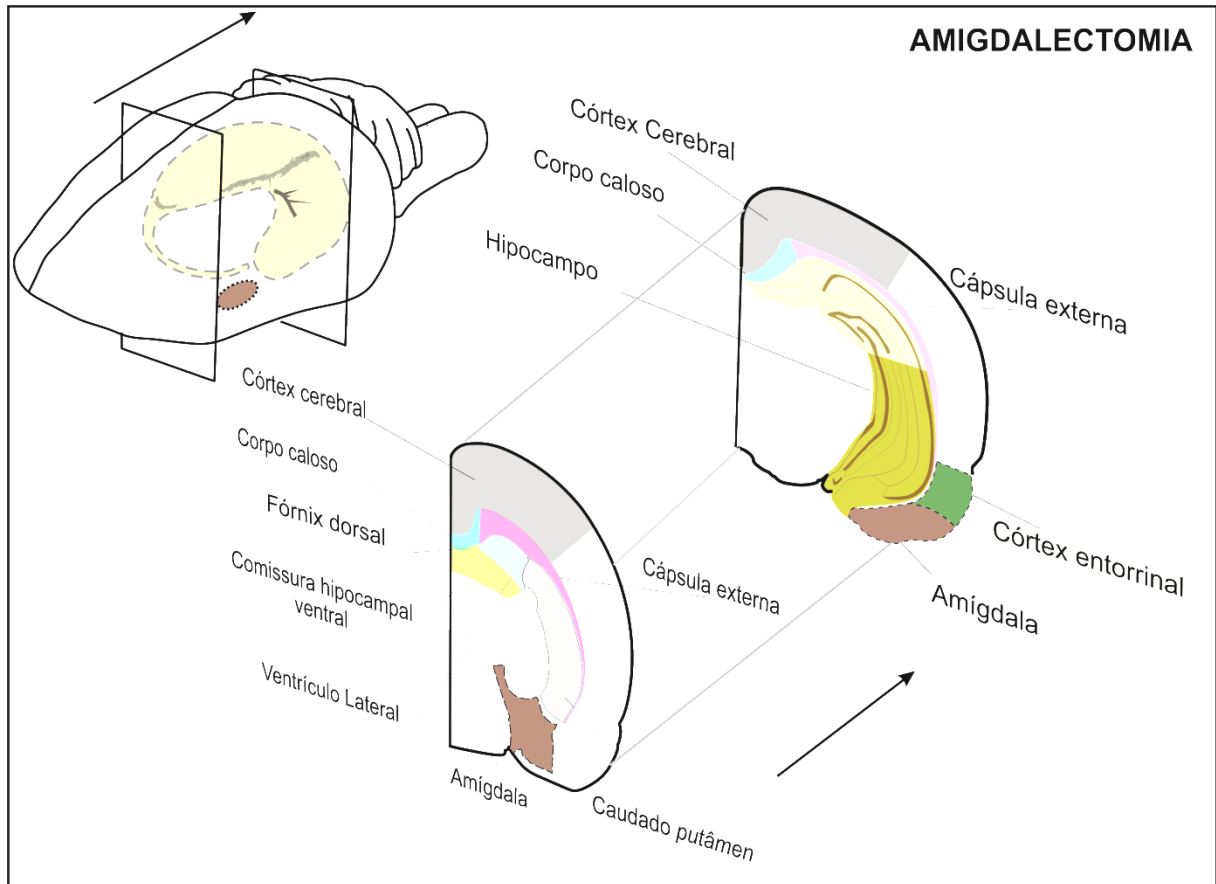


Figura 18 – Amigdalectomia. Sexta etapa da hemisferotomia experimental (desconexão posterior). Leucotomia anteroposterior do complexo amigdalóide e do lobo occipital.

Após revisão da hemostasia, o retalho da *dura-mater* foi reposicionado e realizou-se o fechamento da incisão de pele. O rato, então, recebeu uma dose de analgésico (cetoprofeno) por injeção intramuscular. Posteriormente, após completa recuperação anestésica, o animal foi recolocado em sua caixa-alojamento de origem e observado diariamente quanto aos aspectos clínicos gerais, ingestão de água e comida e condições neurológicas.

Depois de cuidadosa revisão da hemostasia (*WEM Electronic Equipment Ltda*, HF – 120 Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), a *dura-mater* foi reposicionada, e a pele do animal foi suturada com fio de *nylon 4-0* (*POLYSUTURE*, NP53340, São Sebastião, Minas Gerais, Brasil). Ao final do procedimento cirúrgico, o animal foi mantido entubado (recuperação anestésica) para oxigenação em uma máquina de respiração automática.

Cada rato foi recolocado em sua caixa-alojamento de origem, após o período de recuperação anestésica, e observado diariamente para registrar aspectos clínicos gerais, comportamento de ingestão de alimentos e água e condições neurológicas.

4.5. Imagem – SPECT

Para a obtenção de imagens por SPECT, formou-se um grupo independente de ratos Wistar constituídos por um rato do grupo de controle e três ratos do grupo de hemisferotomia, os quais foram submetidos ao protocolo de imagem por SPECT. A perfusão cerebral foi avaliada por Tecnécio [99mTc] HMPAO SPECT, duas semanas após a cirurgia.

O hexametil-propileno-amina (HMPAO) foi obtido na forma de um *kit*, disponível comercialmente contendo o produto liofilizado e reconstituído por [99mTc] pertecnetato, de acordo com as instruções do fabricante.

Cada animal foi anestesiado com cetamina a 92 mg / kg (Ketamina Agener®, União Química Farmacêutica Nacional, Brasil, 0,2 mL de solução a 10%) e xilazina a 9,2 mg / kg (0,1 mL) (Dopaser®, Hertape / Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil) e recebeu 350 MBq de [99mTc] HMPAO, injetado perifericamente através da veia dorsal superficial do pênis (Ver Figura 19).

Para aquisição de imagens, utilizou-se uma câmera *gamma* clínica atualizada e equipada com um colimador de 1,5 mm de diâmetro e um estágio rotativo controlado por computador para posicionamento de alvo (Mejia *et al.*, 2016).



Figura 19 - Câmara miniSPECT. Imagem câmera Discovery VH e o dispositivo de adaptação miniSPECT. Adaptado de Mejia *et al.* (2016).

As projeções foram registradas começando pouco depois da injeção do radiofármaco. Os animais foram posicionados verticalmente no tubo porta-alvo (suporte do

animal), com a cabeça na frente do colimador e 40 projeções de 45 segundos cada uma, para um tempo de imagem total de 30 minutos.

A resolução em energia foi ajustada para 10% a 140keV, e o colimador de orifício para o eixo de rotação foi ajustado para 315 e 43 mm, respectivamente. As projeções foram gravadas em 256x256 *pixels* e subampliadas a 128x128 *pixels* para processamento. As imagens tomográficas foram obtidas utilizando uma versão interna implementada do algoritmo de Maximização da Expectativa do Subconjunto Ordenado, com 10 interações, 4 subconjuntos de projeções e suavizado 3D com uma função Kernel gaussiana de 1,5 *pixel* de largura a meia altura entre iterações.

4.6. Neurotraçamento

Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg / kg, ip) e xilazina (10 mg / kg, ip) e levados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA, EUA). A barra para incisivos superiores foi fixada em 3,3 mm abaixo da linha interaural para que o crânio ficasse na posição horizontal entre o bregma e o lambda. A cabeça do roedor foi fixada ao aparelho estereotáxico pelo rochedo temporal.

Para o grupo controle, antes da exposição da calota craniana, a pele e o tecido subcutâneo foram anestesiados com solução de lidocaína a 2% (0,1 mL, s.c.). O perióstio foi retirado, e a calota craniana tratada com H₂O₂ a 10%.

No grupo de cirurgia experimental, uma incisão cirúrgica foi feita na linha mediana com bisturi lâmina 15, envolvendo pele, subcutâneo e perióstio. O neurotraçador dextran amina biotinizada anterógrado não fluorescente (BDA, 10000 MW) foi microinjetada na área cortical (córtex motor primário – M1), de acordo com o atlas do cérebro de ratos em coordenadas estereotáxicas (Paxinos G e C, 2007).

Os ratos receberam subsequentemente uma injeção intramuscular de penicilina G-Benzatina (Pentabiotic, 600.000 UI, 0,2 ml; *Fort Dodge, Iowa, USA*), seguida de injeção subcutânea do analgésico e anti-inflamatório Flunixinina meglumina (Banamine, 2,5 mg / kg; *Schering-Plough, Hertfordshire, United Kingdom*).

O BDA (10%, 10000 MW, *Molecular Probes, USA*) foi solubilizado em solução-tampão fosfato, e as microinjeções foram realizadas durante a cirurgia, enquanto os animais estavam anestesiados. Para microinjeção, utilizou-se uma técnica já descrita por Carvalho *et al.*, (2013) através de uma agulha tipo-Mizzi era acoplada a um catéter de polietileno conectado a uma seringa (Hamilton, 10 µL).

As infusões foram administradas utilizando uma bomba de infusão (*Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA*), a um volume de 0,5 μL de BDA por hemisfério, e injetadas durante 300 s. A concentração do neurotraçador e o tempo de injeção foram baseados em estudos prévios (Veenman *et al.*, 1992; Ribeiro *et al.*, 2005; Castellán-Baldan *et al.*, 2006). O deslocamento de uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno que ligava a seringa à agulha de injeção foi utilizado para monitorizar as microinjeções. A agulha foi deixada no local durante 5 min após o fim de cada microinjeção, para permitir a difusão local do neurotraçador.

No grupo submetido à cirurgia, o BDA (10.000 MW) foi injetado no córtex motor (M1), 12 horas antes da hemisferotomia experimental, e no caudado-putamen (CPu) 72 horas após a hemisferotomia:

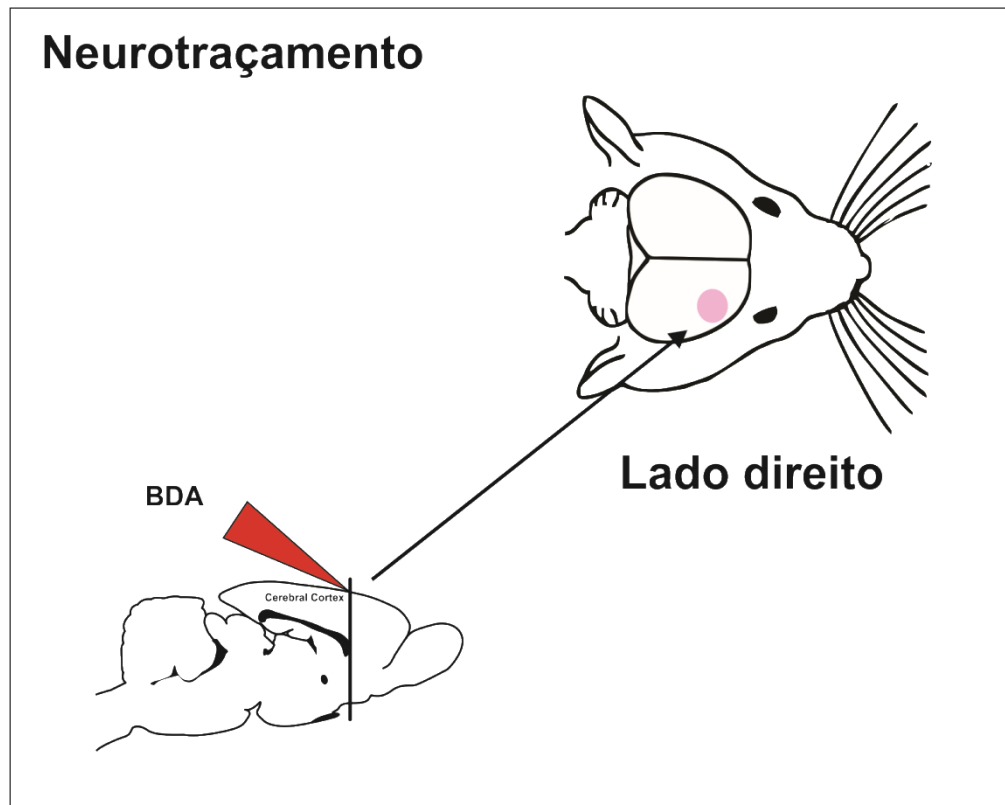


Figura 20 – Neurotraçamento. Visão esquemática do procedimento neuroanatômico (microinjeção do neurotraçador anterógrado). A imagem demonstra a microinjeção do neurotraçador anterógrado BDA (cabeça de seta) na área M1 do neocórtex dos ratos Wistar (hemisfério direito).

4.7. Análise Estatística

Dados obtidos a partir da exposição de do grupo controle (*naïve*), e submetido ou à pseudocirurgia (*Sham*) ou à cirurgia experimental (hemisforotomia) ao teste *Rotarod* foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e à análise de variância de medidas repetidas (repeated measure two-way ANOVA), considerando fatores o tratamento e o tempo. Em caso de interação significativa do tratamento *versus* tempo, os dados foram submetidos ao teste *post hoc* de Bonferroni. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.8. Histologia

Após 10 dias da microinjeção do neurotraçador, os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1 ml de cetamina a 10% (Agener, na dose de 25 mg/kg, IP) para 0,2 ml de xilasina a 4% (Dopaser, na dose de 10 mg/kg, IP) e perfundidos, por via transcardíaca, com solução salina tamponada (STF – solução-tampão fosfato a 0,1 M; pH = 7,4), seguida de paraformaldeído tamponado a 4% (0,1 M; pH = 7,4), para fixação do tecido.

As amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (50% a 100%) diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina. Também foram cortadas coronalmente em micrótomo rotativo em secções de 6µm de espessura, e os cortes foram estendidos em lâminas histológicas.

Para análise por histoquímica, as lâminas foram mantidas em estufa (60°C) por uma hora para derretimento da parafina. Em seguida, os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização, seguidos de banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água.

A marcação com BDA foi visualizada utilizando um método-padrão com complexo ABC (avidina-biotina-peroxidase de rábano silvestre) e reação de dicloridrato de peroxidase 3,3'-diaminobenzidina intensificada com níquel. Por fim, as lâminas foram submetidas à contracoloração com Nissl, lavadas em solução-tampão de fosfato a 0,1 M (pH 7,4), desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de álcool e xilol, recobertas por lamínulas montadas com Permount® e vistas sob um fotomicroscópio (AxioImager Z1, Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

As áreas de microinjeção foram analisadas, e os sítios confirmados histologicamente foram identificados de acordo com o atlas de cérebro de ratos em coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (2007).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1. Neurocirurgia

Vinte e seis ratos foram utilizados no presente estudo: selecionaram-se cinco ratos para o grupo CT, e 21 ratos foram submetidos à cirurgia experimental (hemisferotomia). Dentre os 21 animais operados, 13 sobreviveram até o final do experimento e foram utilizados para investigação neuroanatômica estrutural (neurotraçamento, n=10) e funcional (SPECT, n=3). Os outros oito ratos operados morreram dentro das primeiras 24 horas após a cirurgia, após sangramento profuso intraoperatório. A duração da hemisferotomia foi de 50 ± 10 min.

5.1.1. Avaliação clínica

No pós-operatório imediato (ou seja, nas primeiras 24 horas), as seguintes características após a HE foram registradas: tremores (8%, n = 1), sangramento através da pele (31%, n = 4), edema no local de cirurgia (69%, n = 9), diminuição da atividade motora (85%, n = 11), ptose palpebral (38%, n = 5), aumento do tônus muscular dos músculos dorsais (69%, n = 9) e discreto sangramento nos olhos e nariz (15%, n = 2).

No segundo dia de acompanhamento, observaram-se: diminuição da ingestão de água e alimentos (85%, n = 11), diminuição da atividade motora (85%, n = 11), edema no local de cirurgia (69%, n = 9), agressividade (69%, n = 9), dispneia (8%, n = 1), ptose palpebral (38%, n = 5), aumento do tônus muscular dos músculos dorsais (85%, n = 11) e discreta hemorragia nos olhos e nariz (15%, n = 2).

No terceiro dia de observação clínica, observaram-se: diminuição da ingestão de água e alimentos (69%, n = 9), negligência na autolimpeza (*grooming*) (85%, n = 11), diminuição do tônus muscular (85%, n = 11), agressividade (69%, n = 9), edema no local da cirurgia (31%, n = 4) e diminuição da atividade motora (46%, n = 6). Observamos, também, ptose palpebral (23%, n = 3), aumento do tônus muscular dos músculos dorsais (85%, n = 11) e discreto sangramento nos olhos e nariz (15%, n = 2).

No quarto dia após o procedimento cirúrgico, os animais apresentaram movimentos reduzidos das patas contralaterais à abordagem cirúrgica, dificuldade em iniciar os movimentos e a deambulação unilateral (locomoção para a direita).

No quinto dia após a cirurgia, os animais apresentaram comportamento exploratório. No entanto, com movimentos reduzidos das patas contralaterais à cirurgia, aumento na curvatura da coluna vertebral e diminuição do equilíbrio corporal, durante a marcha.

5.1.2. Investigação neuroanatômica estrutural

Os cortes histológicos foram observados ao microscópio de luz, e foi constatada uma hemisferotomia experimental bem-sucedida em todos os animais submetidos à neurocirurgia. A Figura 21 mostra os cortes histológicos da cirurgia experimental. As imagens são as amostras do grupo experimental e demonstram as etapas de ressecção e desconexão hemisférica.

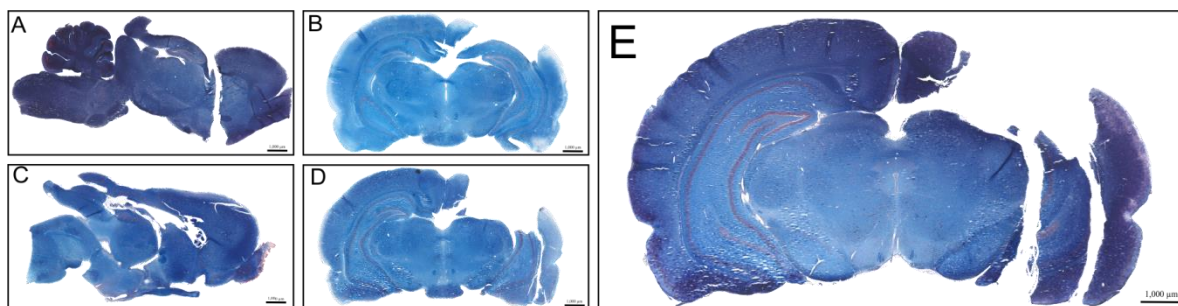


Figura 21 - Visão histológica representativa do encéfalo de rato demonstrando os procedimentos da hemisferotomia experimental – Corte parassagital (A e C) e cortes transversais (B, D e E) do encéfalo (A e C), cérebro (B e D) e mesencéfalo (E) murino: desconexão frontal e ressecção cortical (A); ressecção cortical com preservação do hipocampo (B); calosotomia (C); ressecção cortical, hipocampectomia dorsal e desconexão da cápsula externa (D); desconexão posterior (E). Barra = 1000 μm.

A via marcada com o neurotraçador de transporte anterógrado - BDA, microinjetado no córtex cerebral, atingiu as camadas de células piramidais (externa e interna) do córtex motor (M1), como está mostrado na Figura 22.

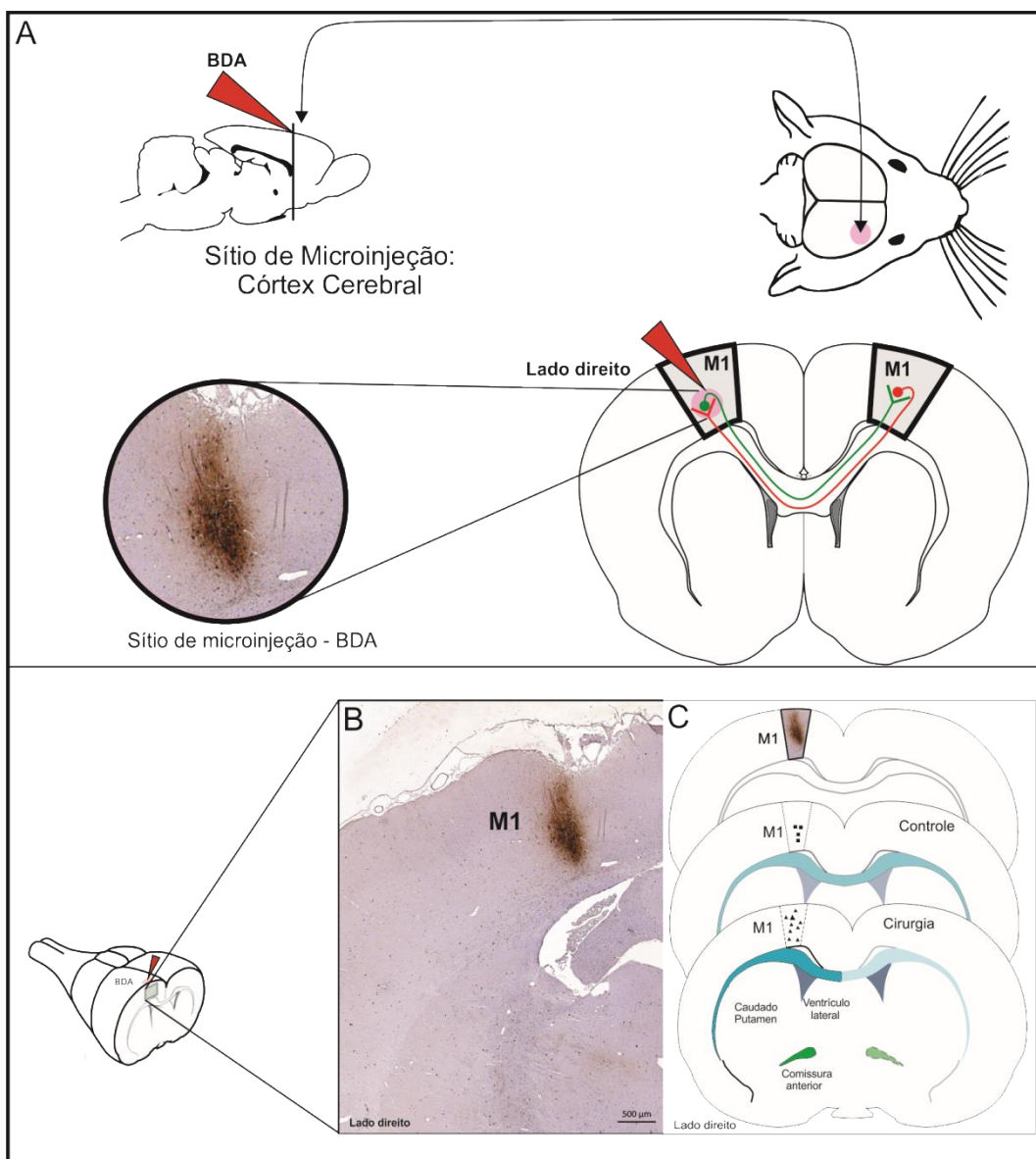


Figura 22 - Procedimento neuroanatômico. Visão esquemática de microinjeção do neurotraçador anterógrado BDA 10000. **A:** Parte superior: A imagem demonstra a microinjeção do neurotraçador anterógrado BDA (cabeça de seta) na área M1 do neocórtex dos ratos Wistar (hemisfério direito). Parte inferior: Corte transversal do cérebro de rato *Wistar* demonstrando, em uma visão esquemática, projeções neurais conectando os hemisférios cerebrais através do corpo caloso. A fotomicrografia à esquerda representa a confirmação histológica de um sítio de microinjeção do BDA no telencéfalo de rato *Wistar*. **(B):** Fotomicrografia de um corte coronal do telencéfalo de rato *Wistar*, mostrando a confirmação histológica de um sítio microinjeção intratelencefálica do neurotraçador anterógrado BDA no córtex motor primário (M1). **(C):** Representação dos sítios (confirmados histologicamente) de microinjeções BDA no M1 de animais do grupo CT e CE, apresentados em anagramas modificados do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2007).

No grupo CT, as vias corticoestriadas marcadas com BDA foram encontradas ipsilateralmente (Figura 23 A) aos sítios de microinjeção de BDA. É possível observar que as vias corticocorticais foram amplamente marcadas com BDA. Torna-se possível identificar o cruzamento do neurotraçador no corpo caloso (Figura 23B e C), atingindo o córtex cerebral contralateral e fibras de corpos neuronais localizadas na camada cortical multiforme (Figura 23 D).

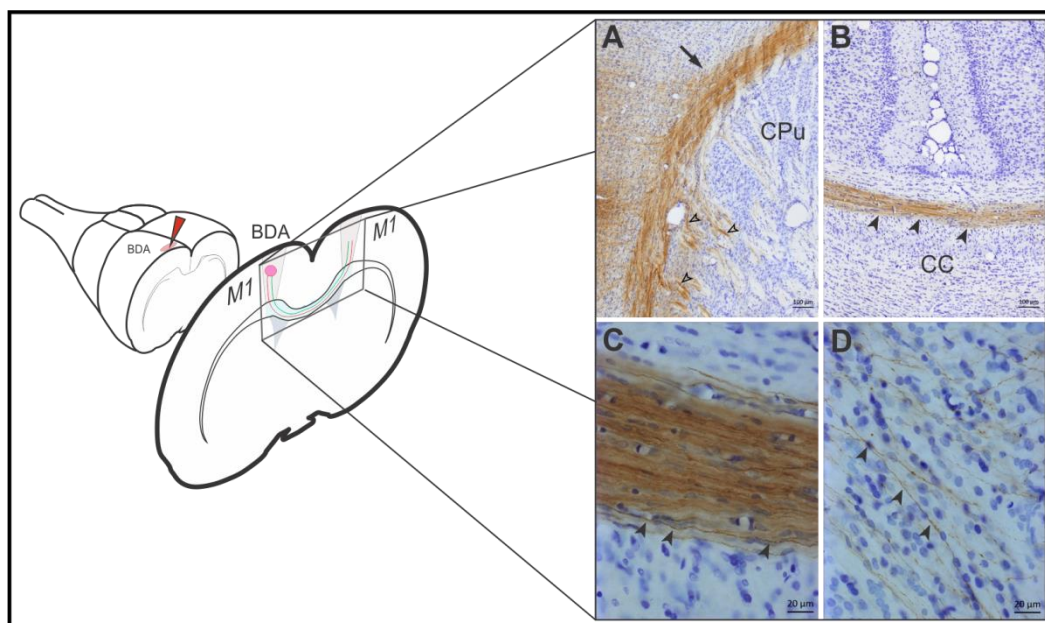


Figura 23 – Fotomicrografias mostrando neurotraçamento no grupo controle. Um corte coronal esquemático do telencéfalo de um rato Wistar (controle), mostrando vias corticocorticais, pode ser visto à esquerda. **A:** As vias corticofugais (seta preta) originaram-se do hemisfério cerebral direito ipsilateral ao local de microinjeção do neurotraçador anterógrado Amina Dextrana Biotinizada (BDA) no córtex motor primário (M1) com projeções neuronais para o neostriato (pontas de setas abertas). **B:** Vias corticais inter-hemisféricas (pontas de setas negras) cruzando a linha média pelo corpo caloso. **C:** Detalhe do trajeto córtico-cortical (pontas de setas negras) de axônios marcados com BD, com origem no hemisfério cerebral direito, ipsilateral ao sítio de microinjeção do BDA no córtex motor primário, cruzando a linha média pelo corpo caloso. **D:** Cortes coronais do hemisfério cerebral esquerdo mostrando fibras marcadas com BDA (pontas de seta pretas) atingindo a camada cortical multiforme contralateral ao sítio de microinjeção do neurotraçador anterógrado, envolvendo os neurônios locais. CPu: Caudado *putamen*; CC: corpo caloso.

Entretanto, nos animais submetidos à hemisferotomia experimental, as microinjeções do neurotraçador anterógrado no M1 mostraram fibras córtico-corticais marcadas ipsilateralmente com BDA (Fig. 24A e B) com projeções intracorticais colaterais de BDA para o neostriato (Figura 24A).

Embora tenha sido observada a presença de fibras marcadas no corpo caloso (Figura 24C), verificou-se uma rarefação da projeção inter-hemisférica (Figura 24B), cruzando a linha mediana do corpo caloso (Figura 24C). Como consequência, há uma ausência de marcação de

fibras axônicas com BDA no hemisfério contralateral (Figura 24 D), sugerindo uma clara interrupção das vias córtico-corticais, desconectadas pelo procedimento de HE. As vias córtico-neostriada (Figura 25, A-C), neostriado-nigral (Figura 25D) e a via nigro-estriatal (Figura 25, E e F) são exemplos de conexões preservadas no grupo CE.

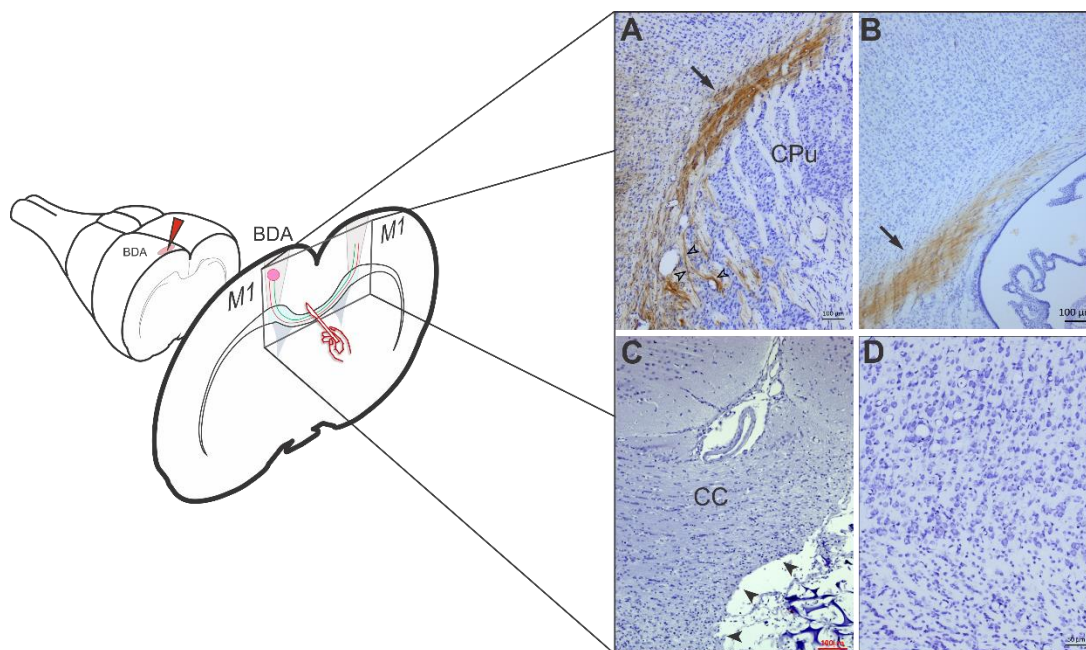


Figura 24 - Fotomicrografias mostrando neurotraçamento no grupo submetido à cirurgia experimental. Um corte coronal esquemático do telencéfalo de um rato Wistar submetido à cirurgia experimental, mostrando vias córtico-corticais e córtico-neostriatais, pode ser visto à esquerda. **A:** Conexões córtico-neostriatais intra-hemisféricas (pontas de setas abertas) e as vias córtico-corticais (seta negra) originadas do hemisfério cerebral direito, ipsilateral ao sítio de microinjeção do neuroçador anterógrado Amina Dextrana Biotinizada (BDA), no córtex motor primário (M1) podem ser identificadas na cor marrom. **B:** vias neurais inter-hemisféricas marcadas com BDA (seta preta) atingindo o corpo caloso ipsilateral ao sítio de microinjeção em M1. **(C)** rarefação de fibras marcadas com BDA nas imediações da calosotomia (pontas de seta pretas) cruzando a linha mediana através do corpo caloso, demonstrando ausência de fibras axônicas marcadas com BDA nas camadas do córtex cerebral contralateral **(D)**. CPu: caudado-putamen; CC: corpo caloso.

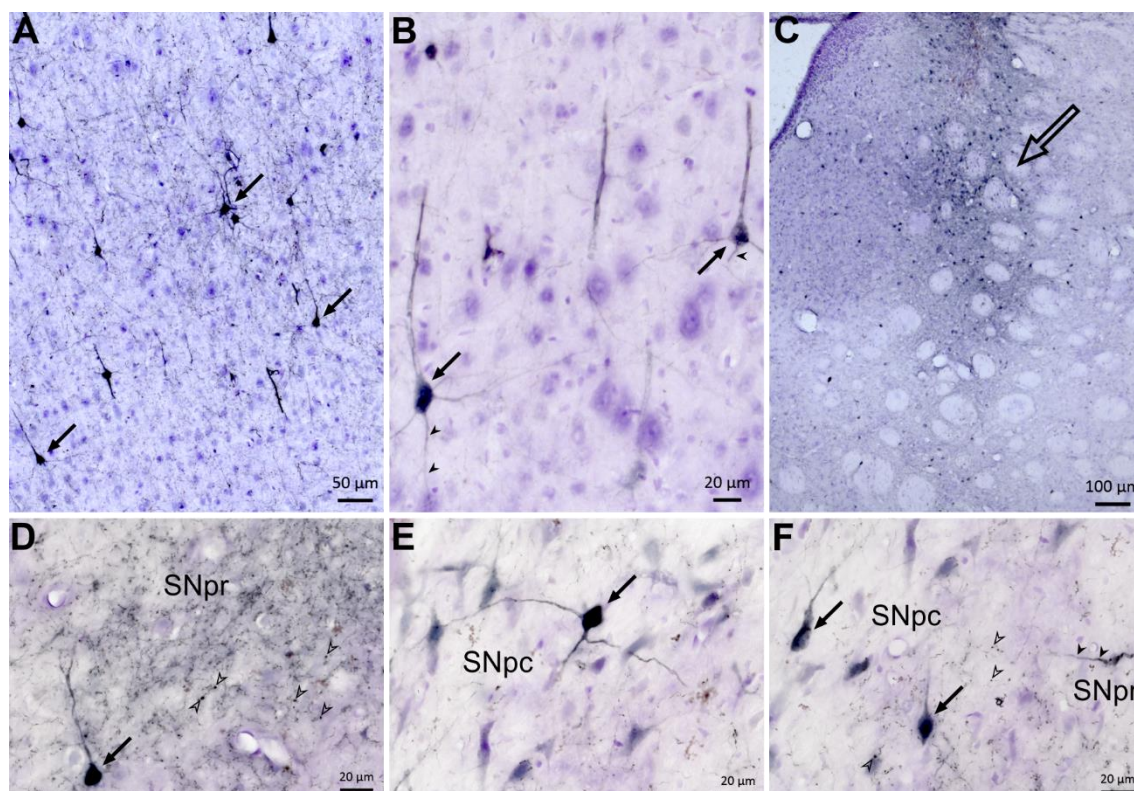


Figura 25 – Fotomicrografias representativas de cortes transversais do neocórtex motor (A e B), do corpo estriado (C) e do mesencéfalo ventral (D-F), mostrando neurotraçamento realizado em animais do grupo submetido à cirurgia experimental, mostrando conexões ipsilaterais preservadas. **A - C**: A via corticostriatal, com neurônios (setas pretas) situados na camada piramidal interna (**A e B**) do neocórtex motor (M1), enviando axônios (cabeças de setas negras, em B) para o neostriado (CPu) (**C**). **D**: Projeção GABAérgica neostriado-nigral, representada por axônios e botões terminais (cabeças de setas abertas, em D e F) situados na substância negra, parte reticulada (SNpr). **E e F**: Via dopaminérgica nigro-estriatal, representada por neurônios (setas negras, em D, E e F) situados na substância negra, parte compacta (SNpc) conectada ao CPu (cabeças de setas negras em F indicam dendritos). A seta aberta em C mostra um sítio representativo das microinjeções do neurotraçador bidirecional (BDA, 3000 MW) no neostriado. O corpo neuronal (seta negra) demonstrado na parte inferior da figura **D** está situado na SNpc. Axônios (setas pretas) e *puncta* negros (pontas setas abertas), sugerem botões terminais (figura F, à direita), situados no SNpr. Coloração: Cresil Violeta.

5.1.3. Investigação funcional (SPECT)

Foram obtidas imagens tomográficas utilizando o fármaco hexametil-propileno-amina-oxima marcada com ^{99m}Tc (HMPAO- ^{99m}Tc) para verificar a perfusão em áreas funcionais do cérebro dos animais. A perfusão cerebral foi uniformemente distribuída em ambos os hemisférios cerebrais do animal do grupo controle, considerando as seguintes áreas encefálicas: rostral/caudal (Figura 26A) e dorsal/ventral (Figura 26B). No entanto, a perfusão cerebral com relação aos ratos hemisferotomizados foi maior no hemisfério direito, considerando as seguintes áreas: rostral/caudal (Figura 26C) e dorsal/ventral (Figura 26D) do

cérebro, com clara hipoperfusão no hemisfério ipsilateral à cirurgia, como mostrado em cortes horizontais e coronais (Fig. 26A inferior,26-E).

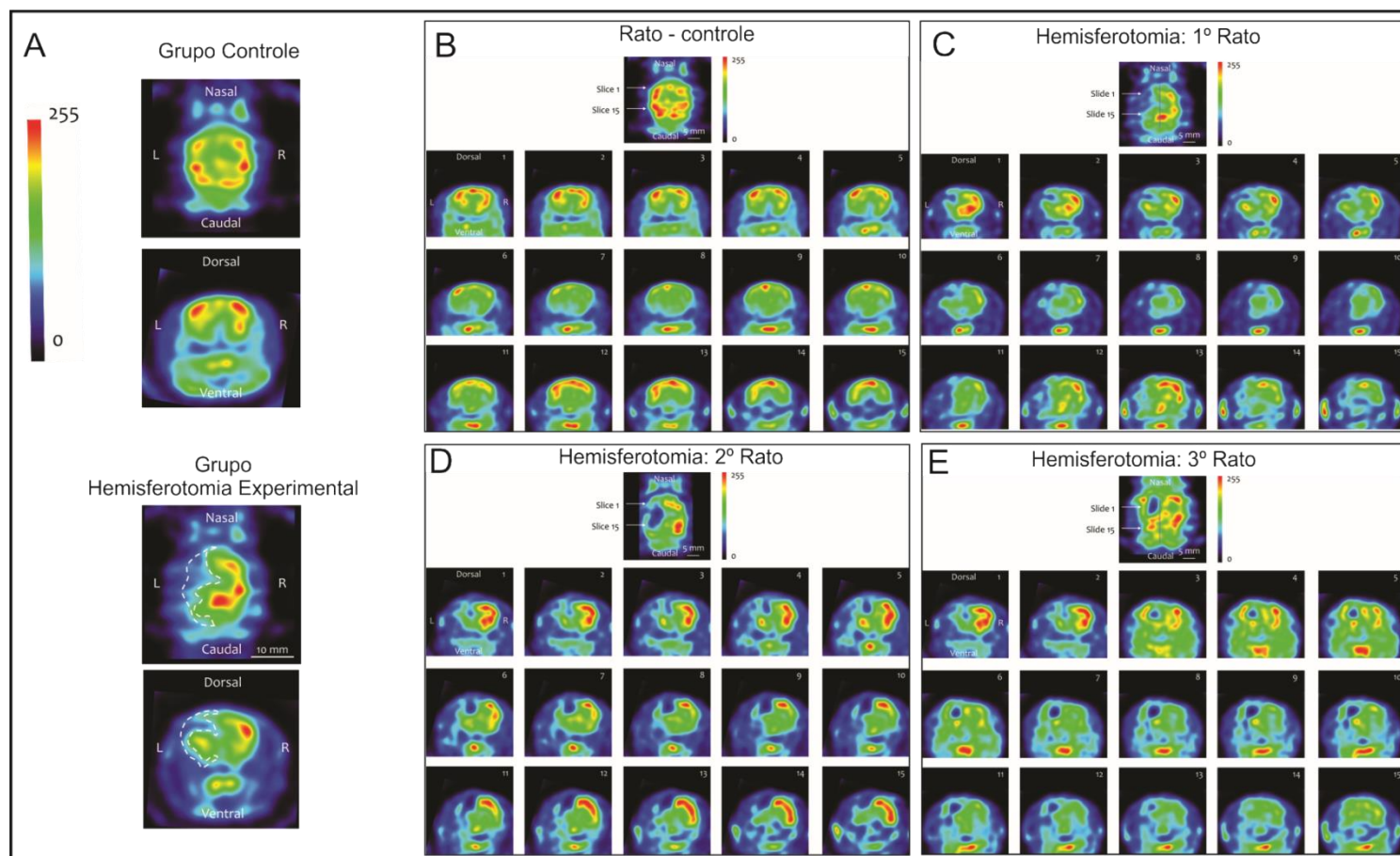


Figura 26 - Imagens obtidas pela técnica de tomografia computadorizada por emissão de próton (SPECT). Cintilografia da perfusão sanguínea do cérebro de Ratos Wistars com o fármaco ^{99m}Tc HMPAO, considerando um rato controle e três ratos submetidos à hemisferotomia. A: Secções cerebrais horizontais e coronais representativas do animal controle (grupo CT) e dos animais submetidos à hemisferotomia (grupo CE). B - E: Sequência horizontal de cortes coronais do cérebro do animal controle e de três ratos submetidos à hemisferotomia. É perceptível a falta de perfusão no lado esquerdo do cérebro dos animais submetidos à hemisferotomia.

5.1.4. Investigação comportamental (Teste Rotarod)

De acordo com os resultados analisados através da *repeated measure two-way ANOVA*, houve uma diferença significativa no efeito do tratamento ($F_{34,24} = 2$, $p < 0,0001$), do tempo ($F_{2,19} = 27$, $p < 0,007$) e da interação tratamento *versus* tempo ($F_{34,24} = 21,26$, $p < 0,0001$). No período pré-operatório, nem os grupos controle e *Sham*, nem aquele submetido à cirurgia experimental apresentaram diferenças significativas no comportamento motor. Nos ratos submetidos à neurocirurgia (hemisferotomia experimental), houve um aumento no número de tentativas de manter o equilíbrio na barra rotatória do teste *Rotarod* em 10 dias (teste *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,001$) e em 30 dias (teste *post hoc* de Bonferroni, $p < 0,001$) em comparação com os grupos CT e Sham (Gráfico q). No entanto, houve uma tendência para recuperar o déficit funcional, ao longo do tempo.

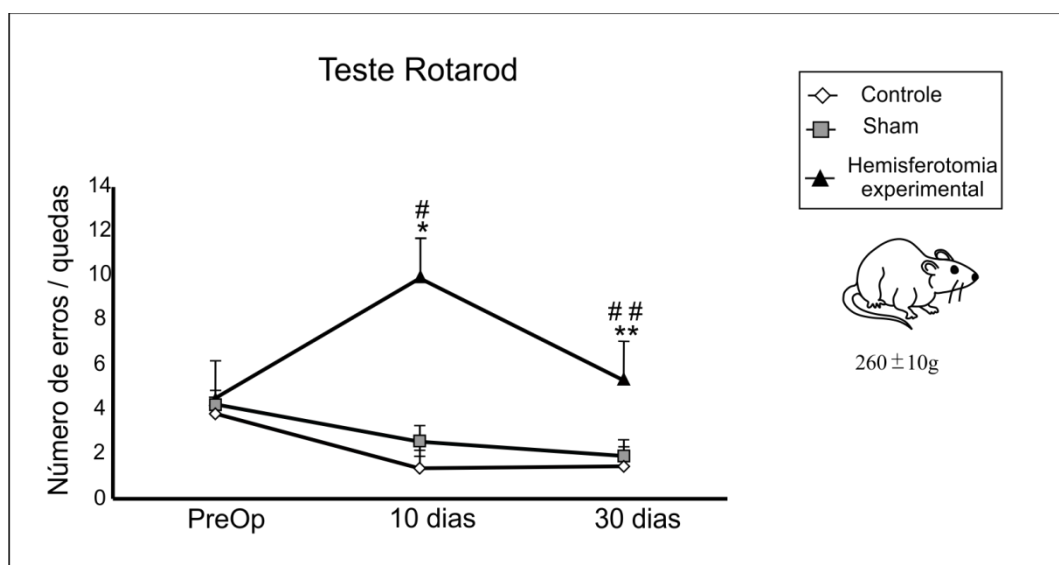


Gráfico 1 –Efeito da hemisferotomia experimental no desempenho motor de ratos *Wistar* no teste *Rotarod*, durante 30 dias de acompanhamento psicobiológico. Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média ($n = 10$ por grupo); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ em comparação ao grupo submetido à pseudocirurgia (*Sham*), de acordo com a análise de variância de duas vias, de medidas repetidas (*repeated measure two-way ANOVA*), seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. PreOp =Pré-operatório / linha de base.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A presente abordagem neurocirúrgica experimental resultou em uma hemisferotomia experimental bem-sucedida em todos os animais submetidos à neurocirurgia, com uma taxa de sobrevivência de 70% e boa recuperação pós-cirúrgica. A hemisferotomia foi confirmada através da investigação neuroanatômica estrutural (neurotraçamentocom BDA 10000 MW e 3000 MW) e funcional (SPECT).

O neurotraçador anterógrado, microinjetado unilateralmente no córtex motor (M1) direito, marcou ambas as vias córtico-neostriatal e inter-hemisférica no grupo controle, mas houve uma clara rarefação das fibras marcadas com BDA cruzando a linha média pelo corpo caloso em ratos *Wistar* submetidos ao procedimento neurocirúrgico, mostrando a eficiência dessa técnica para desconexão hemisférica.

Esta evidência estrutural foi confirmada através do estudo de neuroimagem funcional (SPECT) que demonstrou ter havido um claro comprometimento na perfusão do hemisfério cerebral ipsilateral, em ratos hemisferotomizados. As abordagens neuroanatômicas estruturais e funcionais combinadas com esta intervenção neurocirúrgica destacaram a eficiência desse novo procedimento, com um claro potencial para o estudo da epilepsia refratária e neuroplasticidade em animais de laboratório.

As síndromes epiléticas refratárias têm um prognóstico altamente desfavorável, considerando tanto a evolução da doença como os efeitos posteriores aos tratamentos preconizados. Desde a proposta inicial de hemisferectomia funcional, feita por Rasmussen, em 1983, procedimentos cirúrgicos com a menor ressecção possível de parênquima cerebral, associados a desconexões de tratos neurais da matéria branca, apresentaram-se como a melhor opção para tratamento de síndromes hemisféricas associadas à epilepsia de difícil controle (Winston *et al.*, 1992; Villemure e Mascott, 1995). Por outro lado, os processos envolvidos na reorganização das áreas cerebrais altamente modificadas, após a cirurgia, ainda requerem mais esclarecimentos e estudos (Sugano e Arai, 2015).

Uma maneira de estudar as lesões resultantes de doenças e seus tratamentos é utilizar modelos animais de intervenções cirúrgicas. Porém, até o momento, os modelos experimentais que mimetizam as cirurgias utilizadas no tratamento da epilepsia refratária são a hemisferectomia e a hemidescorticação. Essas técnicas são realizadas em animais de laboratório neonatos, jovens e adultos (Hicks e D'amato, 1970; 1975; Marino *et al.*, 2001; Morosanu *et al.*, 2018).

No presente estudo experimental, descrevemos uma técnica que realiza uma abordagem vertical, similar à hemisferotomia vertical parassagital, descrita por Delalande (Delalande *et al.*, 1992; Delalande *et al.*, 2007; Delalande e Dorfmuller, 2008).

A abordagem cirúrgica escolhida encontra-se compatível com a conformação do encéfalo murino. Embora encéfalos humanos e murinos tenham algumas semelhanças, existem várias diferenças entre eles. Um exemplo, é o fato de o cérebro primitivo ser mais desenvolvido em ratos, e o neocórtex ser mais desenvolvido em seres humanos, desta forma, as circunvoluções cerebrais estão ausentes no cérebro dos ratos e são proeminentes no encéfalo humano. Além disso, em termos de anatomia comparativa, o cérebro do rato desenvolveu-se no eixo longitudinal (do plano cranial para caudal).

Dessa forma, com a abordagem vertical, é possível realizar as desconexões das estruturas subcorticais, identificando-se algumas estruturas encefálicas da linha média até os planos parassagitais, para então para determinarem-se as referências anatômicas relevantes, tais como, o ventrículo lateral e o caudado-*putamen* que está localizado posteriormente à comissura anterior e o corpo caloso (Akakin *et al.*, 2014).

Os resultados aqui obtidos, a partir desta abordagem, confirmam que as estruturas encefálicas acessadas nesta abordagem cirúrgica experimental foram isoladas funcionalmente do restante do cérebro e desconectadas do hemisfério contralateral, simulando as diferentes técnicas (hemisferotomia) da clínica neurocirúrgica que envolve: (i) desconexão da cápsula interna e da *corona radiata*; (ii) ressecção das estruturas temporais mediais; (iii) calosotomia e (iv) desconexão das fibras horizontais frontais (De Ribaupierre e Delalande, 2008).

Na prática clínica, as lesões cerebrais são, por certo, as que provocam maiores e mais extensos déficits funcionais no ser humano. Nesse sentido, um aspecto importante é que a observação de pacientes com lesões cerebrais foi durante muito tempo a janela para o conhecimento do cérebro, ou seja, a forma de determinar déficits funcionais perceptuais, motores ou cognitivos (Devlin, 2003; Hamad *et al.*, 2013).

Entretanto, por mais graves que sejam as consequências dessas lesões, podemos constatar que, frequentemente, ocorrem melhoras nos déficits funcionais. Essa recuperação pode ser observada em estudos experimentais realizados com modelos animais (Marino *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2003; Umeda e Funakoshi, 2014; Wanakhachornkrai *et al.*, 2014; Otte *et al.*, 2015).

Na presente pesquisa, observamos que os animais submetidos à hemisferotomia experimental apresentaram déficit motor nos 10 primeiros dias de observação feita após a intervenção cirúrgica. No entanto, houve uma melhora no desempenho motor (coordenação

motora e equilíbrio) destes animais, identificada no Teste *Rotarod*, após 30 dias da intervenção experimental, sugerindo ter havido neuroplasticidade cerebral.

Os déficits funcionais foram apresentados principalmente através de alterações na coordenação motora, causando um aumento do número de quedas da barra rotatória, possivelmente associadas a alterações no processamento da informação sensorial, influenciando alguns fatores envolvidos na função motora dos roedores, tais como: planejamento motor, coordenação motora, equilíbrio e condições físicas gerais (Xerri *et al.*, 2004; Xerri e Zennou-Azogui, 2014).

Nosso estudo propõe um modelo experimental que oferece a oportunidade para estudar os mecanismos de neuroplasticidade no hemisfério contralateral à ressecção cirúrgica, mas também a reorganização da região cortical preservada (ipsilateral à cirurgia) e sua correlação com a recuperação motora e desenvolvimento de novas projeções nervosas (Nishibe *et al.*, 2010; Nudo, 2013; Hua *et al.*, 2016).

Comparando nossos resultados com modelos de hemisferectomia e de hemidescorticação, observamos semelhança com relatos de outros estudos (Feeney *et al.*, 1981; Yoshikawa *et al.*, 2011; Otte *et al.*, 2015), a exemplo das informações apresentadas por Machado *et al.* (2003), referentes ao período total de recuperação funcional (menos de 2 semanas) que se equipara aos achados de nossa pesquisa. Também observamos que a recuperação motora dos animais submetidos à hemisferotomia experimental pode ter conexão com a restauração funcional a partir da reorganização cortical e subcortical (Marino *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2003; Brus-Ramer *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2009; Van Meer *et al.*, 2010; Axelson *et al.*, 2013).

Outro aspecto importante em nossa pesquisa foi a utilização de animais jovens. Segundo Marino *et al.* (2001), a recuperação funcional está relacionada com a idade do animal no momento da cirurgia, ou seja, ratos mais jovens têm uma chance maior de recuperação.

Na atual abordagem de neurocirurgia experimental, observamos uma mortalidade de 30%, com as mortes ocorrendo sempre nas primeiras 24 horas após o procedimento. Como 71% dos óbitos ocorreram com os primeiros animais operados, essas mortes podem estar relacionadas ao processo de aprendizado e treinamento dos procedimentos cirúrgicos por parte do pesquisador.

Portanto, a fase inicial foi marcada por uma melhora acentuada no desempenho do cirurgião experimental, seguida por um período de estabilidade, no qual a técnica foi refinada e dominada pelo pesquisador.

Além disso, ainda com relação às mortes dos animais, os estudos anteriores não fornecem detalhes sobre a taxa de mortalidade de seus procedimentos ou o momento dessas mortes (Marino *et al.*, 2001)²⁹, ou menção da ocorrência de morte após a cirurgia (Machado *et al.*, 2003; Yoshikawa *et al.*, 2011; Umeda e Funakoshi, 2014).

As vantagens de modelos experimentais de hemisferotomia, como aquele aqui proposto, incluem a oportunidade de estudar a morfologia e as características funcionais de novas conexões neurais decorrentes da neuroplasticidade adaptativa no cérebro desconectado, através do surgimento de novas projeções subcorticais e suas projeções para o corno anterior da medula espinhal (Fouad *et al.*, 2013; Sano *et al.*, 2017).

Além disso, com relação à recuperação dos animais, devemos enfatizar, ainda, o papel funcional potencial desempenhado pela atividade neuronal nos núcleos da base, projeções retículo-espinhais descendentes do tronco encefálico e cerebelo, plasticidade mielínica (De Faria *et al.*, 2017), estimulação elétrica (Yoon *et al.*, 2012; Lopez-Alonso *et al.*, 2015) e mecanismos neurofisiológicos (Song *et al.*, 2017), previamente sugeridos por diversos pesquisadores (Bury e Jones, 2002; Kolb e Gibb, 2007; Otte *et al.*, 2015).

A notável recuperação motora caracterizada pela melhora neurológica global observada em crianças submetidas à ampla ressecção hemisférica tornou-se fator decisivo para indicações cirúrgicas no tratamento da epilepsia refratária. O reconhecimento e a divulgação dos resultados positivos relacionados à melhora dos déficits motores, sensoriais e de fala, em um curto espaço de tempo, têm impressionado vários autores. Diante dessas observações, o modelo experimental de neurocirurgia relacionado com a ressecção de áreas expressivas do cérebro e desconexões de tratos corticais presentemente realizado, possibilita o desenvolvimento de novas estratégias de reabilitação em animais submetidos à hemisferotomia experimental, para fortalecer a recuperação pós-cirúrgica, após lesões hemisféricas.

Em conclusão, o novo modelo experimental proposto de hemisferotomia demonstrado no presente trabalho é tecnicamente viável e comparável aos procedimentos atualmente utilizados para tratar cirurgicamente pacientes com epilepsia refratária. É, também, adequado para estudos futuros focados nas áreas experimentais de neurocirurgia e reabilitação.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

- O modelo de hemisferotomia experimental aqui realizado mostrou-se reprodutível e foi eficiente em cada etapa neurocirúrgica de leucotomia e ablação cortical, como comprovado histologicamente e por meio de SPECT.
- A técnica de neurotraçamento mostrou-se extremamente útil para demonstrar projeções neurais inter-hemisféricas desconectadas por meio da calosotomia, com preservação de vias córtico-neoestriadas ipsilaterais aos depósitos tissulares do neurotraçador de alto peso molecular (10000 MW) com transporte eminentemente anterógrado.
- Os procedimentos neurocirúrgicos realizados durante a hemisferotomia experimental preservou as vias córtico-neoestriadas, neoestriado-nigrais, e vias nigro-estriatais, como demonstrado pelo neurotraçamento com BDA de baixo peso molecular (3000 MW) com transporte bidirecional, o que demonstra haver vias motoras com boa preservação, mesmo após as amplas ressecções realizadas nos procedimentos neurocirúrgicos, e que podem vir a contribuir para a recuperação do controle motor pós-cirúrgico.
- O teste rotarod mostrou-se eficaz para determinar o fenômeno de neuroplasticidade inerente aos procedimentos cirúrgicos realizados em animais adultos-jovens.

Referências

8 REFERÊNCIAS¹

- AKAKIN, A. et al. Three dimensional anatomical microdissection of rat brain using fiber dissection technique. **Journal of the Anatomical Society of India**, v. 63, n. 2, p. 117-124, 2014.
- ALTHAUS, A. L.; ZHANG, H.; PARENT, J. M. Axonal plasticity of age-defined dentate granule cells in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 86, p. 187-96, 2016.
- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. **An Acad Bras Cienc**, p. 0, 2017.
- AXELSON, H. W. et al. Plasticity of the contralateral motor cortex following focal traumatic brain injury in the rat. **Restor Neurol Neurosci**, v. 31, n. 1, p. 73-85, 2013.
- BALCOMBE, J. P. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. **Lab Anim**, v. 40, n. 3, p. 217-35, 2006.
- BAYER, S. A. et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology**, v. 14, n. 1, p. 83-144, 1993.
- BECKER, A. J. Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 44, n. 1, p. 112-129, 2018.
- BONDI, C. O. et al. Found in translation: Understanding the biology and behavior of experimental traumatic brain injury. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 58, p. 123-46, 2015.
- BRUS-RAMER, M.; CARMEL, J. B.; MARTIN, J. H. Motor cortex bilateral motor representation depends on subcortical and interhemispheric interactions. **J Neurosci**, v. 29, n. 19, p. 6196-206, 2009.
- BULTEAU, C. et al. Language plasticity after hemispherotomy of the dominant hemisphere in 3 patients: Implication of non-linguistic networks. **Epilepsy Behav**, v. 69, p. 86-94, 2017.
- BURY, S. D.; JONES, T. A. Unilateral Sensorimotor Cortex Lesions in Adult Rats Facilitate Motor Skill Learning with the “Unaffected” Forelimb and Training-Induced Dendritic Structural Plasticity in the Motor Cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 19, p. 8597-8606, 2002.
- CARVALHO, M. C. et al. Participation of NK1 receptors of the amygdala on the processing of different types of fear. **Neurobiol Learn Mem**, v. 102, p. 20-7, 2013.
- CASTELLAN-BALDAN, L. et al. Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions. **J Chem Neuroanat**, v. 32, n. 1, p. 1-27, 2006.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

- COIMBRA, N. C. et al. Opioid neurotransmission in the post-ictal analgesia: involvement of mu(1)-opioid receptor. **Brain Res**, v. 903, n. 1-2, p. 216-221, 2001.
- CUNHA, A. O. et al. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 141, n. 1, p. 50-7, 2005.
- CYCOWICZ, Y. M. et al. Differential neurophysiological effects of magnetic seizure therapy (MST) and electroconvulsive shock (ECS) in non-human primates. **Clin EEG Neurosci**, v. 39, n. 3, p. 144-9, 2008.
- DANDY, W. E. Removal of Right Cerebral Hemisphere for Certain Tumors with Hemiplegia. **Journal of the American Medical Association**, v. 90, n. 11, p. 823, 1928.
- DAVIDSON, M. K.; LINDSEY, J. R.; DAVIS, J. K. Requirements and selection of an animal model. **Isr J Med Sci**, v. 23, n. 6, p. 551-5, 1987.
- DE ALMEIDA, A. N. et al. Hemispherectomy: a schematic review of the current techniques. **Neurosurg Rev**, v. 29, n. 2, p. 97-102; discussion 102, 2006.
- DE BODE, S. et al. Constraint-induced movement therapy for individuals after cerebral hemispherectomy: a case series. **Phys Ther**, v. 89, n. 4, p. 361-9, 2009.
- DE BODE, S. et al. Locomotor training remodels fMRI sensorimotor cortical activations in children after cerebral hemispherectomy. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 21, n. 6, p. 497-508, 2007.
- DE FARIA, O., JR. et al. Neuroglial interactions underpinning myelin plasticity. **Dev Neurobiol**, 2017.
- DE FREITAS, R. L. et al. The mu1-opioid receptor and 5-HT2A- and 5HT2C-serotonergic receptors of the locus coeruleus are critical in elaborating hypoalgesia induced by tonic and tonic-clonic seizures. **Neuroscience**, v. 336, p. 133-145, 2016.
- DE OLIVEIRA, R. C. et al. Involvement of 5-HT(2) serotonergic receptors of the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis/paragigantocellularis complex neural networks in the antinociceptive phenomenon that follows the post-ictal immobility syndrome. **Exp Neurol**, v. 201, n. 1, p. 144-53, 2006.
- DE RIBAUPIERRE, S.; DELALANDE, O. Hemispherotomy and other disconnective techniques. **Neurosurg Focus**, v. 25, n. 3, p. E14, 2008.
- DELALANDE, O. et al. Vertical parasagittal hemispherotomy: surgical procedures and clinical long-term outcomes in a population of 83 children. **Neurosurgery**, v. 60, n. 2 Suppl 1, p. ONS19-32; discussion ONS32, 2007.
- DELALANDE, O.; DORFMULLER, G. [Parasagittal vertical hemispherotomy: surgical procedure]. **Neurochirurgie**, v. 54, n. 3, p. 353-7, 2008.
- DELALANDE, O.; PINARD, J. M.; BASDEVANT, C. Hemispherotomy: a new procedure for central disconnection. **Epilepsia** v. 33, n. Suppl 3, p. 99-100, 1992.

- DESESSO, J. M.; SCIALLI, A. R.; HOLSON, J. F. Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. **American Journal of Medical Genetics**, v. 87, n. 2, p. 143-162, 1999.
- DEVLIN, A. M. Clinical outcomes of hemispherectomy for epilepsy in childhood and adolescence. **Brain**, v. 126, n. 3, p. 556-566, 2003.
- DUBOIS, J. et al. Primary cortical folding in the human newborn: an early marker of later functional development. **Brain**, v. 131, n. Pt 8, p. 2028-41, 2008.
- DUNBAR, D. C. et al. Neural control of quadrupedal and bipedal stance: implications for the evolution of erect posture. **Am J Phys Anthropol**, v. 69, n. 1, p. 93-105, 1986.
- EADIE, M. J. Victor Horsley's contribution to Jacksonian epileptology. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1836-40, 2005.
- ELLENBROEK, B.; YOUN, J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? **Dis Model Mech**, v. 9, n. 10, p. 1079-1087, 2016.
- FACHIM, H. A. et al. Neurobiological activity of Parawixin 10, a novel anticonvulsant compound isolated from Parawixia bistriata spider venom (Araneidae: Araneae). **Epilepsy Behav**, v. 22, n. 2, p. 158-64, 2011.
- FEENEY, D. M. et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. **Brain Research**, v. 211, n. 1, p. 67-77, 1981.
- FISCHER, M. L. et al. Enriquecimento ambiental como princípio ético nas pesquisas com animais. **Revista Bioética**, v. 24, n. 3, p. 532-541, 2016.
- FISHER, R. S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522-530, 2017.
- FOUAD, K.; HURD, C.; MAGNUSON, D. S. Functional testing in animal models of spinal cord injury: not as straight forward as one would think. **Front Integr Neurosci**, v. 7, p. 85, 2013.
- FOURNIER, N. M. et al. Impaired social cognition 30 years after hemispherectomy for intractable epilepsy: the importance of the right hemisphere in complex social functioning. **Epilepsy Behav**, v. 12, n. 3, p. 460-71, 2008.
- FREITAS, R. L. et al. 5-HT1A/1B, 5-HT6, and 5-HT7 serotonergic receptors recruitment in tonic-clonic seizure-induced antinociception: role of dorsal raphe nucleus. **Exp Neurol**, v. 217, n. 1, p. 16-24, 2009.
- GARCIA GARCIA, M. E.; GARCIA MORALES, I.; MATÍAS GUIU, J. Experimental models in epilepsy. **Neurología (English Edition)**, v. 25, n. 3, p. 181-188, 2010.
- GELFUSO, E. A. et al. Parawixin2, a novel non-selective GABA uptake inhibitor from Parawixia bistriata spider venom, inhibits pentylentetrazole-induced chemical kindling in rats. **Neurosci Lett**, v. 543, p. 12-6, 2013.
- HAARTSEN, R.; JONES, E. J. H.; JOHNSON, M. H. Human brain development over the early years. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 10, p. 149-154, 2016.

- HAMAD, A. P. et al. Hemispheric surgery for refractory epilepsy in children and adolescents: outcome regarding seizures, motor skills and adaptive function. **Seizure**, v. 22, n. 9, p. 752-6, 2013.
- HASHIZUME, K.; TANAKA, T. Multiple subpial transection in kainic acid-induced focal cortical seizure. **Epilepsy Research**, v. 32, n. 3, p. 389-399, 1998.
- HERTZ-PANNIER, L. et al. Late plasticity for language in a child's non-dominant hemisphere: a pre- and post-surgery fMRI study. **Brain**, v. 125, n. Pt 2, p. 361-72, 2002.
- HICKS, S. P.; D'AMATO, C. J. Motor-sensory and visual behavior after hemispherectomy in newborn and mature rats. **Exp Neurol**, v. 29, n. 3, p. 416-38, 1970.
- HICKS, S. P.; D'AMATO, C. J. Motor-sensory cortex-corticospinal system and developing locomotion and placing in rats. **Am J Anat**, v. 143, n. 1, p. 1-42, 1975.
- HUA, X. Y. et al. Enhancement of Contralesional Motor Control Promotes Locomotor Recovery after Unilateral Brain Lesion. **Sci Rep**, v. 6, p. 18784, 2016.
- ISMAIL, F. Y.; FATEMI, A.; JOHNSTON, M. V. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. **Eur J Paediatr Neurol**, v. 21, n. 1, p. 23-48, 2017.
- JAYALAKSHMI, S. et al. Epilepsy surgery in children. **Neurol India**, v. 65, n. 3, p. 485-492, 2017.
- JAYALAKSHMI, S. et al. Surgery for childhood epilepsy. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 17, n. Suppl 1, p. S69-79, 2014.
- KIM, J. S. et al. Hemispherotomy and Functional Hemispherectomy: Indications and Outcomes. **J Epilepsy Res**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2018.
- KISHIMA, H. et al. Which is the Most Appropriate Disconnection Surgery for Refractory Epilepsy in Childhood? **Neurologia medico-chirurgica**, v. 53, n. 11, p. 814-820, 2013.
- KJELL, J.; OLSON, L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. **Dis Model Mech**, v. 9, n. 10, p. 1125-1137, 2016.
- KOLB, B.; GIBB, R. Brain plasticity and recovery from early cortical injury. **Dev Psychobiol**, v. 49, n. 2, p. 107-18, 2007.
- LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, p. 511-517, 1990.
- LENZ, M. et al. Pilocarpine-Induced Status Epilepticus Is Associated with Changes in the Actin-Modulating Protein Synaptopodin and Alterations in Long-Term Potentiation in the Mouse Hippocampus. **Neural Plast**, v. 2017, p. 2652560, 2017.
- LEVINE, D.; BARNES, P. D. Cortical maturation in normal and abnormal fetuses as assessed with prenatal MR imaging. **Radiology**, v. 210, n. 3, p. 751-8, 1999.
- LEW, S. M. Hemispherectomy in the treatment of seizures: a review. **Transl Pediatr**, v. 3, n. 3, p. 208-17, 2014.

- LOPEZ-ALONSO, V.; CHEERAN, B.; FERNANDEZ-DEL-OLMO, M. Relationship Between Non-invasive Brain Stimulation-induced Plasticity and Capacity for Motor Learning. **Brain Stimul**, v. 8, n. 6, p. 1209-19, 2015.
- LOSCHER, W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. **Neurochem Res**, v. 42, n. 7, p. 1873-1888, 2017.
- LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-68, 2011.
- MACHADO, A. G. et al. Mapping of the Rat's Motor Area after Hemispherectomy: The Hemispheres as Potentially Independent Motor Brains. **Epilepsia**, v. 44, n. 4, p. 500-506, 2003
- MARINO, R., JR.; MACHADO, A. G.; TIMO-IARIA, C. Functional recovery after combined cerebral and cerebellar hemispherectomy in the rat. **Stereotact Funct Neurosurg**, v. 76, n. 2, p. 83-93, 2001.
- MARRAS, C. E. et al. Hemispherotomy and functional hemispherectomy: indications and outcome. **Epilepsy Res**, v. 89, n. 1, p. 104-12, 2010.
- MARTÍNEZ, S. et al. Molecular Regionalization of the Developing Neural Tube. In: WATSON, C.; PAXINOS, G., et al (Ed.). **The Mouse Nervous System**. 1: Academic Press, 2012. cap. 1 p.2-18.
- MEJIA, J. et al. Preclinical molecular imaging: development of instrumentation for translational research with small laboratory animals. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 14, n. 3, p. 408-414, 2016.
- MERRICKS, E. M. et al. Single unit action potentials in humans and the effect of seizure activity. **Brain**, v. 138, n. Pt 10, p. 2891-906, 2015.
- MOROSANU, C. O. et al. Experimental cerebral hemispherectomy in rodent models. A systematic review of current literature. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 78, n. 1, p. 14-20, 2018.
- NISHIBE, M. et al. Reorganization of motor cortex after controlled cortical impact in rats and implications for functional recovery. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 12, p. 2221-32, 2010.
- NUDO, R. J. Recovery after brain injury: mechanisms and principles. **Front Hum Neurosci**, v. 7, p. 887, 2013.
- OTTE, W. M. et al. Altered contralateral sensorimotor system organization after experimental hemispherectomy: a structural and functional connectivity study. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 35, n. 8, p. 1358-67, 2015.
- PASUPULETI, M. K.; MOLAHALLY, S. S.; SALWAJI, S. Ethical guidelines, animal profile, various animal models used in periodontal research with alternatives and future perspectives. **J Indian Soc Periodontol**, v. 20, n. 4, p. 360-368, 2016.
- PAXINOS G; C, W. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th. San Diego, 2007. 456.
- PEARL, P. L. Epilepsy Syndromes in Childhood. **Continuum (Minneap Minn)**, v. 24, n. 1, Child Neurology, p. 186-209, 2018.

RASMUSSEN, T. Hemispherectomy for seizures revisited. **Can J Neurol Sci**, v. 10, n. 2, p. 71-8, May 1983.

RIBEIRO, S. J. et al. Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: involvement of GABAA and mu1-opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain. **J Chem Neuroanat**, v. 30, n. 4, p. 184-200, 2005.

RICE, D.; BARONE, S., JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, v. 108 Suppl 3, p. 511-33, 2000.

ROSATI, A.; DE MASI, S.; GUERRINI, R. Antiepileptic Drug Treatment in Children with Epilepsy. **CNS Drugs**, v. 29, n. 10, p. 847-63, 2015.

SANO, N. et al. Enhanced Axonal Extension of Subcortical Projection Neurons Isolated from Murine Embryonic Cortex using Neuropilin-1. **Front Cell Neurosci**, v. 11, p. 123, 2017.

SANTOS, M. V.; MACHADO, H. R. Extratemporal disconnective procedures for the treatment of epilepsy in children. **Epilepsia**, v. 58 Suppl 1, p. 28-34, 2017.

SAVE-PEDEBOS, J. et al. The development of pragmatic skills in children after hemispherotomy: Contribution from left and right hemispheres. **Epilepsy Behav**, v. 55, p. 139-45, 2016.

SCHRAMM, J. Hemispherectomy techniques. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 13, n. 1, p. 113-134, 2002.

SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol**, v. 106-107, p. 1-16, Jul- 2013.

SILVA, M. T. A.; GUERRA, L. G. G. C.; ALVES, C. R. R. Modelos Comportamentais Em Neurociências. **Revista Brasileira de Análise do Comportamento**, v. 1, n. 2, 2016

SNYDER, J. M. et al. Nervous System. In: PRESS, A. (Ed.). **Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas**. London: Mica Haley, v.2, 2018. cap. 20, p.403-444.

SONG, M.; MARTINOWICH, K.; LEE, F. S. BDNF at the synapse: why location matters. **Mol Psychiatry**, v. 22, n. 10, p. 1370-1375, 2017.

SOZMEN, E. G.; HINMAN, J. D.; CARMICHAEL, S. T. Models that matter: white matter stroke models. **Neurotherapeutics**, v. 9, n. 2, p. 349-58, 2012.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychol Rev**, v. 20, n. 4, p. 327-48, 2010.

SUGANO, H.; ARAI, H. Epilepsy surgery for pediatric epilepsy: optimal timing of surgical intervention. **Neurol Med Chir (Tokyo)**, v. 55, n. 5, p. 399-406, 2015.

SWANSON, L. W. **Brain maps : structure of the rat brain**. 1. Amsterdam: Elsevier, 1992. 240.

- TAKAHASHI, M. et al. Large-scale reorganization of corticofugal fibers after neonatal hemidecortication for functional restoration of forelimb movements. **Eur J Neurosci**, v. 30, n. 10, p. 1878-87, 2009.
- TAKAKUSAKI, K. Functional Neuroanatomy for Posture and Gait Control. **J Mov Disord**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2017.
- TANAKA, T. et al. Basic science and epilepsy: experimental epilepsy surgery. **Stereotact Funct Neurosurg**, v. 77, n. 1-4, p. 239-44, 2001.
- TERRA-BUSTAMANTE, V. C. et al. Rasmussen encephalitis: long-term outcome after surgery. **Childs Nerv Syst**, v. 25, n. 5, p. 583-9, 2009.
- UMEDA, T.; FUNAKOSHI, K. Reorganization of motor circuits after neonatal hemidecortication. **Neurosci Res**, v. 78, p. 30-7, 2014.
- VAN MEER, M. P. et al. Recovery of sensorimotor function after experimental stroke correlates with restoration of resting-state interhemispheric functional connectivity. **J Neurosci**, v. 30, n. 11, p. 3964-72, 2010.
- VEENMAN, C. L.; REINER, A.; HONIG, M. G. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 41, n. 3, p. 239-254, 1992.
- VIANNA, E. P. et al. Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. **Epilepsia**, v. 46 Suppl 5, p. 166-73, 2005.
- VILLEMURE, J. G.; MASCOTT, C. R. Peri-insular hemispherotomy: surgical principles and anatomy. **Neurosurgery**, v. 37, n. 5, p. 975-81, 1995.
- WANAKHACHORNKRAI, O. et al. Reorganization of sensory pathways after neonatal hemidecortication in rats. **Neurosci Res**, v. 79, p. 94-8, 2014.
- WILLEMSE, R. B. et al. Magnetoencephalographic study of hand and foot sensorimotor organization in 325 consecutive patients evaluated for tumor or epilepsy surgery. **Neuroimage Clin**, v. 10, p. 46-53, 2016.
- WINSTON, K. R. et al. Cerebral hemicortectomy for epilepsy. **J Neurosurg**, v. 77, n. 6, p. 889-95, Dec 1992.
- XERRI, C.; BENELHADJ, M.; HARLAY, F. Deficits and recovery of body stabilization during acrobatic locomotion after focal lesion to the somatosensory cortex: a kinematic analysis combined with cortical mapping. **Arch Ital Biol**, v. 142, n. 3, p. 217-36, 2004.
- XERRI, C.; ZENNOU-AZOGUI, Y. Early and moderate sensory stimulation exerts a protective effect on perilesion representations of somatosensory cortex after focal ischemic damage. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99767, 2014.
- YANG, X. et al. Altered Expression of Intersectin1-L in Patients with Refractory Epilepsy and in Experimental Epileptic Rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 35, n. 6, p. 871-80, 2015.
- YOON, Y. S. et al. The effect of electric cortical stimulation after focal traumatic brain injury in rats. **Ann Rehabil Med**, v. 36, n. 5, p. 596-608, 2012.

YOSHIKAWA, A. et al. A retrograde tracing study of compensatory corticospinal projections in rats with neonatal hemidecortication. **Dev Neurosci**, v. 33, n. 6, p. 539-47, 2011. (Electronic)

9 ANEXOS

9.1 Certificado da Comissão de Ética em uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 054/2015, sobre o projeto intitulado "*Desenvolvimento de modelo experimental de hemisferotomia em ratos*", sob a responsabilidade da **Professora Doutora Luiza da Silva Lopes** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de setembro de 2015.

We certify that the protocol n° 054/2015, entitled "*Experimental model of development in rats hemispherotomy*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/28/2015.

Ribeirão Preto, 28 de setembro de 2015.


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CÉUA – FMRP – USP

9.2 Publicação de artigo científico - *Doutorado*

JNS

LABORATORY INVESTIGATION

A new model of experimental hemispherotomy in young adult *Rattus norvegicus*: a neural tract tracing and SPECT in vivo study

Ivair Matias Jr., ScM,^{1,2} Daoud Hibráhim Elias-Filho,² Camila Araújo Bernardino Garcia, ScM,¹ Guilherme Henrique Silva,³ Jorge Mejia, ScD,³ Francisco Romero Cabral, ScD,³ Ana Cláudia Camargo Miranda, ScM,³ Sérgio Gomes da Silva, ScD,^{3,4} Luíza da Silva Lopes, MD, ScD,⁵ Norberto Cysne Coimbra, MD, ScM, ScD,^{3,4} and Hélio Rubens Machado, MD, ScM, ScD^{1,4}

¹Laboratory of Pediatric Neurosurgery and Developmental Neuropathology, Department of Surgery and Anatomy, ²Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, and ³Neuroelectrophysiology Multicenter and Neurobiology of Pain and Emotions Laboratory, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo; ⁴Hospital Israelita Albert Einstein; and ⁵Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT), Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil

OBJECTIVE The objective of this study was to describe a new experimental model of hemispherotomy performed on laboratory animals.

METHODS Twenty-six male young adult Wistar rats were distributed into two groups (surgery and control). The nonfluorescent anterograde neurotracer biotinylated dextran amine (BDA; 10,000 MW) was microinjected into the motor cortex area (M1) according to *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* atlas to identify pathways and fibers disconnected after the experimental hemispherotomy. SPECT tomographic images of ^{99m}Tc hexamethylpropyleneamine oxime were obtained to verify perfusion in functioning areas of the disconnected and intact brain. A reproducible and validated surgical procedure is described in detail, including exact measurements and anatomical relationships. An additional 30 rodents (n = 10 rats per group) were divided into naïve, sham, and hemispherotomy groups and underwent the rotarod test.

RESULTS Cortico-cortical neural pathways were identified crossing the midline and contacting neuronal perikarya in the contralateral brain hemisphere in controls, but not in animals undergoing hemispherotomy. There was an absence of perfusion in the left side of the brain of the animals undergoing hemispherotomy. Motor performance was significantly affected by brain injuries, increasing the number of attempts to maintain balance on the moving cylinder in the rotarod test at 10 and 30 days after the hemispherotomy, with a tendency to minimize the motor performance deficit over time.

CONCLUSIONS The present findings show that the technique reproduced neural disconnection with minimal resection of brain parenchyma in young adult rats, thereby duplicating the hemispherotomy procedures in human patients.

<https://thejns.org/doi/abs/10.3171/2017.12.JNS171150>

KEYWORDS hemispherotomy; biotinylated dextran amine neurotracer; cerebral cortex; corpus callosum; small-animal SPECT; epilepsy

HEMISPHERECTOMY has been used for decades in the treatment of children with refractory epilepsy and unilateral hemispheric lesions. While anatomical hemispherectomy is still performed, other techniques, such as hemispherotomy and functional hemispherectomy, are now also used to disconnect a cerebral hemisphere.^{37,48}

Introduced in the 1990s, hemispherotomy has been de-

scribed as an effective surgical technique for hemispheric disconnection.^{14,48} This technique allows a complete disconnection between both brain hemispheres with good results regarding seizure control; it also causes minimal intraoperative bleeding and the shortest possible surgical time, with small skin incisions, craniotomies, and the least possible resection of the cerebral parenchyma.¹³ A system-

ABBREVIATIONS BDA = biotinylated dextran amine; CPU = caudatus/putamen; HMPAO = hexamethylpropyleneamine oxime.

SUBMITTED May 9, 2017. **ACCEPTED** December 11, 2017.

INCLUDE WHEN CITING Published online June 8, 2018; DOI: 10.3171/2017.12.JNS171150.

©AANS 2018, except where prohibited by US copyright law

J Neurosurg June 8, 2018 1

9.3 Publicação de artigo científico - *colaboração científica*

Accepted Manuscript

Aerobic exercise in adolescence results in an increase of neuronal and non-neuronal cells and in mTOR overexpression in the cerebral cortex of rats

Angélica Begatti Victorino, Fernando Tadeu Serra, Pâmella Pimentel Piñero, Alexandre Aparecido de Almeida, Glauber Menezes Lopim, Ivair Matias Junior, Helio Rubens Machado, Roberto Lent, Francisco Romero Cabral, Fernando Gomez-Pinilla, Ricardo Mario Arida, Sérgio Gomes da Silva

PII: S0306-4522(17)30560-2

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.002>

Reference: NSC 17951

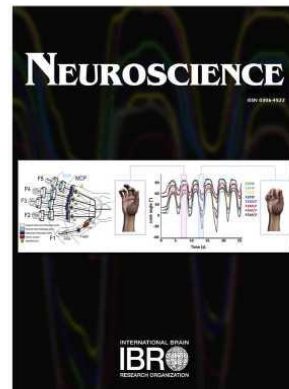
To appear in: *Neuroscience*

Received Date: 5 December 2016

Accepted Date: 1 August 2017

Please cite this article as: A.B. Victorino, F.T. Serra, P.P. Piñero, A.A. de Almeida, G.M. Lopim, I.M. Junior, H.R. Machado, R. Lent, F.R. Cabral, F. Gomez-Pinilla, R.M. Arida, S.G. da Silva, Aerobic exercise in adolescence results in an increase of neuronal and non-neuronal cells and in mTOR overexpression in the cerebral cortex of rats, *Neuroscience* (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.002>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Aerobic exercise in adolescence results in an increase of neuronal and non-neuronal cells and in mTOR overexpression in the cerebral cortex of rats

Angélica Begatti Victorino¹, Fernando Tadeu Serra², Pâmella Pimentel Piñero², Alexandre Aparecido de Almeida¹, Glauber Menezes Lopim¹, Ivair Matias Junior³, Helio Rubens Machado³, Roberto Lent⁴, Francisco Romero Cabral⁵, Fernando Gomez-Pinilla⁶, Ricardo Mario Arida¹, Sérgio Gomes da Silva^{2,5}.

(1) Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). São Paulo - SP, Brazil.

(2) Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). Mogi das Cruzes - SP, Brazil.

(3) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). São Paulo - SP, Brazil.

(4) Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro - RJ, Brazil.

(5) Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). São Paulo - SP, Brazil.

(6) University of California Los Angeles (UCLA). Los Angeles - CA, USA.

Corresponding author:

Sérgio Gomes da Silva (sgomesilva@hotmail.com)

Instituto do Cérebro (INCE)

Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein

Hospital Israelita Albert Einstein

Av. Albert Einstein, 627/701. Morumbi.

CEP: 06780-110. São Paulo - SP, Brasil.



Edaravone reduces astrogliosis and apoptosis in young rats with kaolin-induced hydrocephalus

Camila Araújo Bernardino Garcia¹ · Carlos Henrique Rocha Catalão² · Hélio Rubens Machado¹ · Ivair Matias Júnior¹ · Thais Helena Romeiro¹ · José Eduardo Peixoto-Santos² · Marcelo Volpon Santos¹ · Luiza da Silva Lopes¹

Received: 1 March 2016 / Accepted: 1 December 2016 / Published online: 17 December 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract

Purpose We investigated the possible neuroprotective effects of the free radical scavenger edaravone in experimental hydrocephalus.

Methods Seven-day-old Wistar rats were divided into three groups: control group (C), untreated hydrocephalic (H), and hydrocephalic treated with edaravone (EH). The H and EH groups were subjected to hydrocephalus induction by 20% kaolin intracisternal injection. The edaravone (20 mg/kg) was administered daily for 14 days from the induction of hydrocephalus. All animals were daily weighed and submitted to behavioral test and assessment by magnetic resonance imaging. After 14 days, the animals were sacrificed and the brain was removed for histological, immunohistochemical, and biochemical studies.

Results The gain weight was similar between groups from the ninth post-induction day. The open field test performance of EH group was better ($p < 0.05$) as compared to untreated hydrocephalic animals. Hydrocephalic animals (H and EH) showed ventricular ratio values were higher ($p < 0.05$), whereas magnetization transfer values were lower ($p < 0.05$), as compared to control animals. Astrocyte activity (glial fibrillary acidic protein) and apoptotic cells (caspase-3) of EH group were decreased on the corpus callosum ($p > 0.01$), germinal matrix ($p > 0.05$), and cerebral cortex ($p > 0.05$), as compared to H group.

Conclusions We have demonstrated that administration of edaravone for 14 consecutive days after induction of hydrocephalus reduced astrocyte activity and that it has some beneficial effects over apoptotic cell death.

Keywords Hydrocephalus · Young rats · Edaravone · Neuroprotection

Introduction

The pathophysiology of hydrocephalus is quite complex, characterized mainly by an imbalance between production and reabsorption of cerebrospinal fluid (CSF). The dilated ventricles induce parenchymal distortions therefore compressing the brain hemispheres against the internal surface of the skull [1, 2].

The brain oxidative damage may represent a contributing factor to the pathogenesis of hydrocephalus. Socci et al. [3] showed a significant relationship between the progress of ventriculomegaly and increased lipid peroxidation and the generation of reactive oxygen species (ROS) in important brain areas of H-Tx rats. Stretching and compressing forces leverage injury to the brain tissue by reducing cerebral blood flow [4–7]. Subsequently, this lack of oxygen leads to a raised production of free radicals, mostly due to lipid peroxidation, whose toxic effect on the cerebral arteries perpetuates this harmful cycle and ultimately contributes to the so-called oxidative stress [8, 9].

Hydrocephalus treatment consists in implanting drainage systems (shunts) or by the third ventriculostomy. Various shunt systems have been used in an attempt to restore CSF dynamics, draining the excessive fluid into the right cardiac atrium or into the peritoneal cavity [10, 11]. Nevertheless, factors such as poor clinical condition [12, 13], high infection rates [14, 15], and possibility of spontaneous reabsorption of

✉ Luiza da Silva Lopes
luslopes@fmrp.usp.br

¹ Department of Surgery and Anatomy, Division of Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 3900 Av. dos Bandeirantes, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

² Department of Neurosciences and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil



Research Paper

The use of standards for integration and interoperability in HIS

Hilton Vicente César¹, Gérson Silva Santos-Neto², Rodrigo Antonio Pessini², Rafael Menezes Reis², Ivair Matias Junior² and Paulo Mazzoncini Avezedo-Marques³

Accepted 5th September, 2017

ABSTRACT

¹Doctor of the Bioengineering Program, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto (SP), Brazil.

This article aims to present the results of a bibliographic narrative review on the use of standardization standards in health informatics for data integration and semantic interoperability among heterogeneous and distributed health information systems, a review, bibliographic, descriptive, qualitative and exploratory study of literature in the last five years (2011 to 2016). The study of anteriority returned a total of twenty-seven articles. Of this total, only eight were elected according to the inclusion and exclusion criteria for full reading. The results found in the literature point to the potential of adopting standardization standards for data integration and interoperability in healthcare systems.

² Department of Clinical Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo - FMRP / USP, Ribeirão Preto (SP), Brazil.

³3rd Division of Image Sciences and Medical Physics, Department of Clinical Medicine, University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School - FMRP / USP, Ribeirão Preto (SP), Brazil.

Keywords: Medical informatics, semantics, knowledge bases, information technology, data collect.

*Corresponding author. E-mail: hiltonvc81@gmail.com.

INTRODUCTION

In the field of health generally, structured data repository information resulting from experimental research, clinical investigations and semantic interoperability is the basis for the construction of clinical knowledge (CDC, 2001).

System interoperability stands out mainly when it provides information exchange between Electronic Health Records (EHR), allowing a longitudinal follow-up of the patient (CDC, 2001). Thus, it is possible that the health services, in their various specialties, exchange information about the same patient, enabling an improvement in patient care.

One of the most important characteristics of interoperability is the ability to share information between systems. Technically, this requires aggregation between systems information and systems that share this information. Interoperability levels can be identified in systems that use Web Service (Berler et al., 2004) communication standards and XML schemas, among others. So, why is adopting standardization and integration of standards in health informatics (IS) important? The reasons for adopting standardization and integration of standards in health informatics are:

- 1) Because it uses standards that accept structures for new versions of structures and for sharing patient health information among professionals in this area;
- 2) To share patient health information among clinicians in a multidisciplinary and distributed environment;
- 3) To interoperate data between organizations within a company, from municipal, state or national health systems, or in the future, across national boundaries.

In this context, this article aims to verify the results of work on the use of IS standardization standards for data integration and semantic interoperability between heterogeneous and distributed SIS.

MATERIALS AND METHODS

It is a review, bibliographical, descriptive, qualitative and exploratory study of the literature in the last five years. The observed period comprises the period from 2011 to 2016, in English, Portuguese and Spanish.

The scientific bases of the health and the exact areas as

9.5 Artigos Submetidos – Aceitos para publicação



ONLINE MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript ID	20180055
Subject	[Neurospine] Complete submissions. Temporary number [20180055]
Send Type	Manuscripts Revision
Receipt Date	14-Mar-2018 2nd Revision Date :23-Nov-2018



ONLINE MANUSCRIPT SUBMISSION

[Neurospine] Complete submissions

Sender:	Korean Spinal Neurosurgery Society
Corresponding author:	Rafael Menezes-Reis
First author:	Ivair Matias Júnior
Date Submitted:	14-Mar-2018 06:37
Temporary number:	20180055
Category of Submission:	New
Type of Manuscript :	Original article (Basic)
2nd Revision Date :	23-Nov-2018
3rd Revision Date:	30-Nov-2018
Situation:	Accept (30-Nov-2018)

Abstract

Effective parameters for gait analysis in experimental models evaluation of peripheral nerve injury in rats

Objective: The aim of this study was through the use of machine learning methods, to identify the best parameters in the gait analysis for evaluation of peripheral nerve injury. **Methods:** Twenty-one male Wistar rats were used in the present study. Two groups were performed to the same model but with lite bit difference while procedure to development of peripheral mononeuropathy: CCI 4 ligatures of sciatic nerve (CCI - 4L; n=7) proposed by Bennett and Xie in 1988, a modified CCI 1 ligature (CCI - 1L; n=7) and Sham group (n=7). **Results:** In the analysis of gait parameters in each group, there was a statistical difference only for the pre-swing parameter ($F = 16.78$, $R^2 = 0.66$, $p < 0.0001$), significant differences were observed between the Sham group and the lesions: CCI-4L $t = 7.72$, 95% CI = 21.65-59.11) and CCI-1L ($t = 3.53$, 95% CI = 6.47-45.46). There was no difference between the pre-swing between the two types of injury ($t = 1.96$, 95% CI = -33.9-5.08). **Conclusion:** Pre-swing angle of the ankle was the better gait parameter to differentiate non-lesion from nerve injury and different injury levels.

04/12/2018

Gmail - Manuscript ID [NS-18-040] Letter of decision 3rd - Accept



ivair matias Junior <ivairmatias@gmail.com>

Manuscript ID [NS-18-040] Letter of decision 3rd - Accept

Neurospine <theneurospine@gmail.com>
 Para: "ivairmatias@gmail.com" <ivairmatias@gmail.com>

30 de novembro de 2018 06:10

Neurospine

ONLINE MANUSCRIPT SUBMISSION

[Neurospine] Review result : 3rd

Date sent : November 30, 2018

Date Decisioned : November 30, 2018

Manuscript ID : **NS-18-040**

Title : Effective parameters for gait analysis in experimental models evaluation of peripheral nerve injury in rats

Corresponding Author : Rafael Menezes-Reis

Review result : **Accept**

Comments to Authors (Editorial Office) :

Dear Author

With pleasure, we would like to inform you that your manuscript titled above has been accepted for publication in *Neurospine*.

Your manuscript will be checked by English and/or bibliographic experts and will be delivered to you if there are any minor changes necessary. In that case, please return the final version through the online submission system.

Thank you for your worthy contribution to *Neurospine*.

We look forward to your continued contributions to the journal.

Sincerely,

Yoon Ha, M.D.,Ph.D.
Editor-in-Chief

Neurospine Editorial Office
Department of Neurosurgery, Yonsei University College of Medicine
50-1, Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea

TEL : +82-2-2228-2172
E-mail : theneurospine@gmail.com
Website : <http://submit.e-neurospine.org>

Reviewer's comments

#1 reviewer :
In the revised manuscript by Matias et al., the authors have addressed some questions and have corrected the issues according to the reviewer's comments, which clearly improved the manuscript.

9.5 Artigos Submetidos – *Em processo de avaliação pelos pares*

9.4.1. Mestrado

Disability and Rehabilitation



Early intensive inpatient rehabilitation for children undergoing hemispherotomy

Journal:	<i>Disability and Rehabilitation</i>
Manuscript ID	TIDS-08-2018-087
Manuscript Type:	Research Paper
Keywords:	Rehabilitation, Epilepsy, Gait, Hemispherotomy, Mobility

SCHOLARONE
Manuscripts