

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Padronização do uso da técnica de citometria de fluxo para avaliação de morte celular em cultura organotípica de hipocampo de ratos

Bruna de Melo Menezes

Porto Alegre, 24 de novembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Padronização do uso da técnica de citometria de fluxo para avaliação de morte celular em cultura organotípica de hipocampo de ratos

Bruna de Melo Menezes

Professora Doutora Christianne Gazzana Salbego

Orientadora

Doutora Juliana Bender Hoppe

Coorientadora

Porto Alegre, 24 de novembro de 2014

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a minha mãe, Maria Dominga, por ser minha inspiração como pessoa, o motivo de querer dar orgulho. Por ter paciência em escutar as reclamações, pelo apoio nas decisões, pelo conforto dos momentos difíceis e por ser a melhor amiga para os bons momentos.

À orientadora Christianne, pela oportunidade de ter sido monitora da disciplina de Bioquímica I que me levou posteriormente a Iniciação Científica. Obrigada pela confiança e pela liberdade concedidas principalmente na realização desse trabalho.

À coorientadora Juliana, que sempre foi uma ótima colega no laboratório, sempre disposta e bem humorada e que nesses últimos meses me ensinou e ajudou muito na conclusão dessa etapa.

A todos que conheci através do Laboratório de Neuroproteção e Sinalização Celular, principalmente a Elisa, o André e a Mariana, com os quais eu aprendi praticamente tudo que apliquei nesse trabalho.

A todos do Laboratório 23, inclusive ao pessoal da Professora Cristiane Matté, que estão sempre dispostos a ajudar.

À dupla amada, Carolina Araujo Cirne, que foi a inseparável colega e companhia durante a faculdade, e que hoje é uma irmã pra mim. A faculdade não teria sido a mesma sem ti.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia que com o tempo se tornaram muito mais que colegas, que deram sentido e fizeram valer a pena todas as tantas horas de estudo, esforço e preocupações. Obrigada, Manoela Valmorbida, Andressa Barros, Karoline Massari e Gustavo Goelzer.

Ao meu “paidrasto” Gilson Camargo, por ser uma parceria incansável na correção de textos, correria de formatura, entre tantas outras. Obrigada pela companhia nos almoços durante a semana, e comemorações nos finais de semana.

À Mariele Peruzzi, Danielle Azevedo, Larissa Freire, Lillian Gattelli e Marina de Leone que nesse último ano foram a verdadeira personificação da palavra amizade. “A cumplicidade é tanta que nossas vibrações se complementam”

Ao Gabriel Hennemann Klaser, que foi a companhia tranquila, a recarga de energias positivas e os incentivos infinitos nessa fase final do curso.

Por fim a TODOS os meus familiares que de alguma forma compartilharam dessa caminhada, que sonharam comigo, em especial os meus exemplos de profissionais meu irmão Leonardo, e às tias farmacêuticas Cleci e Edilamar. Sem jamais esquecer o Tio Leonel, exemplo e saudades eternas.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>25</b>
<b>LEGENDA DAS FIGURAS .....</b>	<b>29</b>
<b>FIGURAS E TABELA .....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO I – NORMAS DA REVISTA HIPPOCAMPUS JOURNAL .....</b>	<b>38</b>

Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista "Hippocampus Journal", apresentadas em anexo, à qual será submetido.

**Padronização do uso da técnica de citometria de fluxo para avaliação de morte celular em cultura organotípica de hipocampo de ratos.**

Bruna de Melo Menezes<sup>1</sup>, Mariana Maier Gaelzer<sup>1</sup>, Barbára Paranhos Coelho<sup>1</sup>, Juliana Bender Hoppe<sup>1</sup>, Christianne Gazzana Salbego<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Título Abreviado: Citometria de fluxo em cultura organotípica de hipocampo de ratos.

20 páginas, 5 figuras e 1 tabela.

Autora para correspondência: Bruna de Melo Menezes, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil, Tel: +55 (51) 3308.5547; Fax: +55 (51) 3308.5535; E-mail: [brunamelomenezes@gmail.com](mailto:brunamelomenezes@gmail.com)

## RESUMO

O hipocampo é uma região do cérebro muito estudada por seu envolvimento nos mecanismos de formação de memória e aprendizado, mas principalmente pela incessante investigação dos mecanismos que provocam danos hipocâmpais que comprometem a função e integridade de neurônios. Doenças neurodegenerativas tais como, Alzheimer, Parkinson ou Isquemia Cerebral, envolvem diferentes tipos de morte celular. Os aspectos morfológicos e características histológicas da morte celular necrótica diferem dos observados na morte celular apoptótica, sendo essas distinções importantes para a caracterização dos mecanismos envolvidos na patologia de determinada doença. Nos últimos anos tem havido crescente aperfeiçoamento das técnicas para identificação e quantificação de grupos celulares, dentre estas, a citometria de fluxo vem demonstrando ser uma tecnologia rápida e reproduzível através da qual se pode realizar análises refinadas, permitindo a avaliação de muitos parâmetros simultaneamente. O objetivo deste trabalho foi padronizar a utilização dessa metodologia no modelo *in vitro* de cultura organotípica de hipocampo de ratos, para avaliação do tipo de morte celular. Para isto, utilizamos como indutores de morte celular o glutamato, para morte celular necrótica, e a estaurosporina, para a morte apoptótica. Os resultados mostraram que a metodologia padronizada foi eficiente e permite a distinção entre os diferentes tipos de morte celular induzidos neste modelo experimental. Além disso, confirma o potencial da cultura organotípica como modelo experimental para a análise de morte celular em diferentes desordens que levam ao dano hipocâmpal. E, sobretudo, valida uma técnica rápida e multiparamétrica eficaz para utilização na avaliação de novos agentes neuroprotetores capazes de retardar ou impedir doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: apoptose; necrose; vulnerabilidade celular; glutamato; estaurosporina.

## ABSTRACT

The hippocampus is a brain region extensively studied for its involvement in learning and memory formation mechanisms, but principally by the relentless investigation of the mechanisms that cause hippocampal damage that compromises the integrity and function of neurons. Neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease or Cerebral Ischemia, involve different types of cell death. The morphological and histological characteristics of necrotic cell death are different from those observed in apoptotic cell death, and these are important distinctions for the characterization of the mechanisms involved in the pathology of a certain disease. In recent years, there has been increasing improvement of techniques for identification and quantification of cell groups, among these, flow cytometry, definitely, has proven to be a rapid and reproducible technology by which refined analyzes can be performed by allowing the use of many parameters simultaneously. The aim of this study was to standardize the use of this methodology in the *in vitro* model of organotypic culture of rat hippocampus to appraise the type of cell death. For this purpose, we used as cell death-inducing glutamate to necrotic cell death, and staurosporine to apoptotic death. The results showed that the standardized method was efficient, and allows the distinction between different types of cell death induced in this experimental model. Furthermore, it confirms the potential of organotypic culture as an experimental model for the analysis of cell death in different disorders that lead to a hippocampal damage. Mainly, it validates a rapid and multiparametric technique, effective for use in the evaluation of new neuroprotective agents capable of delaying or preventing neurodegenerative diseases.

Key words: apoptosis; necrosis; cell vulnerability; glutamate; staurosporine.



## INTRODUÇÃO

O hipocampo é uma região do cérebro já bem conhecida por seu papel em certas formas de aprendizado e memória, tanto em roedores quanto em seres humanos (Shipton, 2014). Está associado às memórias de longo prazo, episódica e declarativa, além do envolvimento na cognição (Rubin, 2014) e orientação espacial e temporal (Perouansky, 2011). Embora os mecanismos através dos quais o hipocampo desempenha essas funções não estejam totalmente estabelecidos, várias teorias sugerem que as memórias são, em um primeiro momento, armazenadas no hipocampo, e consolidam-se no córtex pré-frontal (Vida, 2010).

A estrutura do hipocampo é altamente conservada entre os mamíferos. A anatomia manteve-se singularmente, considerando as notáveis mudanças de tamanho do cérebro e reorganização cortical (Pika, 2014). Sua arquitetura consiste em duas estruturas curvadas interligadas, o hipocampo propriamente dito e o giro denteado. De estrutura altamente organizada, permite a classificação hipocampal em sub-regiões: CA1, CA2 e CA3, do latim *Cornu ammonis*, e Giro denteado (GD), compostas de tipos celulares específicos, sendo principalmente de células piramidais e de células granulosas,

respectivamente. A interface entre CA e GD, chamada de hilo (*hilus*), contém uma terceira população, as células musgosas (Vida, 2010).

A diversidade celular do tecido implica em uma suscetibilidade desigual dessas regiões a danos. Sabe-se que existe uma vulnerabilidade seletiva a lesões traumáticas de acordo com a população celular e com as regiões hipocâmpais, sendo as regiões de CA3 e do hilo as mais afetadas, enquanto CA1 é poupada. (Lowenstein, 1992; Hicks, 1993; Folkers, 1998). Por outro lado, na isquemia cerebral global, tanto *in vivo* como *in vitro*, as regiões do hipocampo mais afetadas são as do CA1 e do hilo, enquanto CA3 e GD são mais resistentes (Araki, 1989; Schmidt-Kastner, 1991). Isso sugere uma resposta bioquímica diferente desses subtipos celulares a diferentes tipos de lesões hipocâmpais (Geddes, 2003). Fatores como tamanho da célula, densidade, conectividade ou estrutura do citoesqueleto podem afetar a maneira como a célula interpreta um impacto mecânico (Toth, 1997) ou a falta de suprimento de oxigênio e glicose tecidual e suas consequências.

A morte celular pode se manifestar de várias formas e, por isso, pode ser classificada através de diferentes critérios, por exemplo: critérios histológicos, enzimáticos, aspectos funcionais ou características imunológicas (Canu, 2014). Utilizando o critério histológico, temos a apoptose e a necrose, tipos de mortes celulares que serão abordadas nesse trabalho. A morte por apoptose apresenta arredondamento celular, retração de pseudópodes, redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação da membrana nuclear (cariorréxis), pouca modificação estrutural das organelas citoplasmáticas, vesiculação da membrana plasmática. Podendo ocorrer ainda

o englobamento das células por fagócitos (*in vivo*) (Elmore, 2007), translocação de fosfatidilserina para a superfície da membrana celular e formação de corpos apoptóticos (Hassan, 2014). Além disso, a apoptose pode ser desencadeada através da via extrínseca/mediada por receptor, com envolvimento de TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral ou do inglês *tumor necrosis factor alpha*), Caspase 8, entre outras, ou intrínseca/não mediada por receptor, com a participação de Caspase 9 e Apaf -1 (fator de ativação de protease apoptótica ou do inglês *apoptotic protease activating factor 1*), por exemplo) (Elmore, 2007).

A necrose celular é caracterizada por aumento do volume celular, turgidez das organelas citoplasmáticas, ruptura da membrana plasmática e consequente perda do conteúdo intracelular. Apesar de já ter sido descrita como uma morte celular não regulada, atualmente se sabe que é finamente regulada, e ocorre mesmo em homeostase de tecidos em desenvolvimento e adultos. (Golstein e Kroemer, 2007).

O aumento da expectativa de vida da população mundial vem desencadeando uma frequência maior de casos de pessoas acometidas por doenças neurodegenerativas. Doenças como Alzheimer (DA) e Parkinson (DP) são importantes representantes desses dados, sendo a primeira a mais prevalente enquanto a segunda é responsável por acometer 1% da população mundial acima dos 65 anos de idade. Além disso, o envelhecimento também está associado com o aumento do risco de doenças vasculares como a isquemia cerebral, uma das principais causas de morte no mundo (Bherer, 2013).

Essas desordens têm em comum a profunda perda neuronal (Daviaud, 2013).

Dessa forma, a necessidade de estudar alternativas aos tratamentos atuais se

torna imperativa dada a crescente prevalência dessas doenças. Apesar da existência de alguns tratamentos no caso da DA e da DP, eles não impedem e nem mesmo atrasam a progressão da doença. Para tanto, é preciso que os mecanismos através dos quais a morte celular ocorre sejam bem esclarecidos para viabilizar o estudo de substâncias farmacológicas como novas alternativas terapêuticas.

Nesse contexto, utilizamos culturas organotípicas. Trata-se de um método que mantém fatias de um determinado tecido em cultivo sobre uma interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo assim amadurecer e permanecer viável por diversas semanas (Stoppini, 1991). Uma das principais características da cultura organotípica é a de manter a organização e a arquitetura do tecido, o que não ocorre em culturas convencionais, além de permitir uma manipulação mais flexível do que em modelos *in vivo* e uma redução significativa no número de animais utilizados (Stahl, 2009).

Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram estudar e caracterizar a morte celular em cultura organotípica de hipocampo de ratos através da padronização da análise por citometria de fluxo, utilizando para isso os indutores glutamato e estaurosporina como marcadores positivos de morte necrótica e apoptótica, respectivamente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Materiais*

Para a preparação da cultura organotípica foi utilizado o fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper). Para preparação dos meios de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium*), HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), soro equino inativado e anfotericina B (Fungizone®) da Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA), gentamicina (Garamicina®) da Schering-Plough (Rio de Janeiro, RJ, BR). As membranas utilizadas foram Millicell® de 0,4 µm adquiridas da Millipore (Bedford, MA, USA). As placas de seis poços, compradas da TPP® (Trasadingen, Switzerland). Na preparação da amostra foram utilizadas as enzimas DNase e colagenase da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e tripsina da Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA). O tratamento das amostras foi feito com glutamato e estaurosporina da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). Para análise por citometria, foi utilizado o kit comercial Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 & Propidium Iodide da Life Technologies® (Carlsbad, CA, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## *Animais*

Todos os procedimentos de manipulação com animais experimentais seguem as normas descritas na Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei N° 11.794 (08.10.2008). Os cuidados com relação à biossegurança seguem os critérios recomendados pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Foram utilizados ratos Wistar machos de 6-8 dias, obtidos no Centro de Produção e Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## *Cultura Organotípica de Hipocampo*

A cultura organotípica de hipocampo foi preparada de acordo com o método descrito por Stoppini e colaboradores (1991), com algumas modificações (Hoppe, 2010). As fatias de hipocampo foram obtidas na espessura de 400 µm com o auxílio de um fatiador de tecidos McIlwain e separadas em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) gelado composto de glicose 36 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,26 mM, KCl 5,36 mM, NaCl 136,89 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,34mM, MgCl<sub>2</sub> 0,49mM, MgSO<sub>4</sub> 0,44mM, HEPES 25 mM, adicionado de 1% de fungizona e 0,035% de garamicina, pH 7,2.

As fatias foram colocadas sobre membranas Millicell® e transferidas para placas de cultura de 6 poços. Cada poço contendo 1 mL de meio de cultivo constituído de 50% de MEM (Minimum Essential Medium), 25% de HBSS e 25% de soro equino inativado contendo 1% de fungizona e 0,035% de garamicina e suplementado com 4 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 36 mM de glicose e 25 mM

de HEPES, pH 7,3. As culturas organotípicas foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 14 dias, com troca total de meio de cultivo a cada três dias.

#### *Tratamento das Fatias de Hipocampo*

No 13º dia de cultura, a estaurosporina e o glutamato foram preparados, sendo utilizado como veículo água milli-Q. As concentrações finais adicionadas aos poços foram de 5 mM de glutamato e 1 µM de estaurosporina, durante 24 horas.

#### *Preparação das Amostras*

Primeiramente transferiu-se as fatias das membranas Millicell com a ajuda de um pincel para tubos de citometria de fluxo contendo tampão PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) adicionado de 1% de colagenase, 1% de DNase e 0,2% de tripsina. Após, procedeu-se a dissociação mecânica das fatias com o auxílio de pipeta de Pasteur de vidro de ponta bastante afilada, seguido de filtração com o auxílio de filtros específicos com tamanho de poros de 0,4 µm.

#### *Citometria de Fluxo*

Para a marcação e classificação de morte celular apoptótica e necrótica adicionou-se às amostras devidamente processadas Anexina V conjugada a Alexa Fluor 488 (FL-1) e Iodeto de Propídio (FL-3), de acordo com

especificações do fabricante (Life Technologies), e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz para posterior análise no citômetro de fluxo.

A Anexina V conjugada a Alexa Fluor® 488 se liga por afinidade ao fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS) que normalmente se encontra no lado interno da membrana. Quando a célula se encontra em apoptose inicial PS é translocada para o lado externo, dessa forma liga a Anexina V e a emissão de fluorescência pode ser analisada através da técnica de citometria (Thuret, 2003).

O Iodeto de Propídio (IP) é capaz de penetrar na célula quando há alteração na permeabilidade da membrana e, uma vez dentro da célula, se liga ao DNA, produzindo fluorescência. Alteração de permeabilidade da membrana é uma característica da necrose celular e também da apoptose tardia. (Frezza, 2009; Franz, 2014).

O citômetro de fluxo utilizado nas análises foi FACS Calibur BD Bioscience.

As eventos foram classificados da seguinte forma: eventos viáveis (Anexina - /IP), eventos em apoptose inicial (Anexina+/IP-), eventos em apoptose tardia (Anexina +/IP+) e eventos em necrose (Anexina-/IP+). Foram contados 30 000 eventos por amostra.

### *Quantificação e Análise Estatística*



A análise dos resultados foi feita através da utilização do software FCS Express 4 Flow®. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e a análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey, usando o programa GraphPad Prism 5. Diferenças entre as médias serão consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### *Caracterização da população celular hipocampal*

A análise por citometria de fluxo das culturas organotípicas de hipocampo permitiu estabelecer uma caracterização da população celular do tecido. Em relação ao tamanho e à granulosidade, observamos que a maior parte da população de eventos hipocampais se encontra em uma mesma faixa de tamanho, com uma pequena população com tamanho maior e maior granulosidade (Figura 1). Em relação à granulosidade e complexidade, observamos grande variação nessa característica. Esse perfil heterogêneo de tamanho e granulosidade eram esperados, visto que as culturas organotípicas de hipocampo mantêm a arquitetura e os diversos tipos celulares do tecido (Stahl, 2009).

### *Quantificação da morte celular hipocampal*

Para a análise de morte celular por citometria de fluxo nas fatias de hipocampo, utilizamos o glutamato como indutor de necrose e a estaurosporina como indutor de apoptose (Danbolt, 2001 e Thuret, 2002). No grupo controle (Figura 2 e Tabela 1) obtivemos  $98,25\% \pm 0,7528\%$  de eventos viáveis (FL1-/FL3-). No grupo tratado com glutamato,  $48,47\% \pm 2,316\%$  ( $p < 0,001$ ) dos eventos marcaram somente com Iodeto de Propídio (FL-1-/FL-3+), caracterizando morte por necrose. No grupo tratado com estaurosporina, houve uma marcação de  $44,17\% \pm 4,51\%$  ( $p < 0,001$ ) dos eventos apenas com Anexina V (FL-1+/FL-3-), caracterizando morte por apoptose inicial. No grupo da estaurosporina houve marcação dupla para Anexina V e IP (FL-1+/FL-3+) em  $7,268\% \pm 3,158\%$  ( $p < 0,05$ ) dos eventos analisados, caracterizando morte por apoptose tardia. A elevada porcentagem de eventos viáveis no grupo controle demonstra que o nosso protocolo foi reprodutível, como pode ser observado pelos baixos valores de desvio padrão e erro padrão da média (Tabela 1).

#### *Caracterização celular conforme o tipo de morte*

Na figura 3, temos os dot plots representativos da caracterização da população celular no tecido hipocampal quando relacionamos as características de tamanho e granulosidade com o tipo de morte observada nos grupos. Nas figuras 4 e 5 temos os dot plots quantitativos dessa caracterização. Em relação ao tamanho (Figura 4) e à granulosidade (Figura 5) dos eventos hipocampais não é possível visualizar diferenças nesses parâmetros de acordo com tipo de morte através da marcação por Anexina V e Iodeto de Propídio.

## **DISCUSSÃO**

A necessidade de aprofundar os estudos acerca das mais diversas patologias exige o aprimoramento das técnicas utilizadas na pesquisa, e aliado a isso, se observa uma tendência atual na otimização da utilização de experimentação animal (Bouvier d'Yvoire, 2012). A técnica de citometria de fluxo foi responsável por um grande desenvolvimento científico nos últimos 20 anos. Essa tecnologia tem permitido a realização de análises refinadas de múltiplos parâmetros simultaneamente. Além disso, uma de suas grandes vantagens é a rapidez no processamento do experimento em comparação a outras metodologias, (Silva, 2012), por exemplo, a microscopia. Além da possibilidade de avaliar um grande número de células sem o viés do observador.

A demanda crescente em identificar populações celulares com maior precisão conduziu à necessidade da utilização de análises multiparamétricas, como

ocorre na citometria de fluxo, e com isso a disponibilidade de mais informações sobre uma mesma célula dificulta a geração de falsos positivos (Silva, 2012).

Nesse trabalho, os diferentes tipos de morte celular foram identificados através da marcação por Anexina V e Iodeto de Propídio. As células foram previamente expostas aos indutores positivos estaurosporina e glutamato, que induziram a apoptose e necrose respectivamente.

A estaurosporina é um alcaloide obtido através da cultura de *Streptomyces staurosporesa*. Ela atua como um inibidor não seletivo de algumas proteínas cinases (proteína cinase C, PKA, PKG e MLCK, por exemplo) e induz apoptose tanto em células neuronais como não neuronais e por isso é amplamente utilizado em modelos de estudo de morte celular (Tamaoki, 1986 e Thuret, 2003). A fosforilação de substratos proteicos por enzimas do tipo proteína cinase é uma importante via de transdução de sinal. Existem diferentes maneiras de se promover a inibição de proteínas cinases, entre elas, a ligação do inibidor ao sítio de ligação de ATP, mecanismo através do qual atua a estaurosporina (Wolf 1988 e Krohn, 1998). O bloqueio dessas vias de sinalização pela inibição dessas enzimas encaminha as células a apoptose. (Shugar, 1995 e Evans, 1993).

O L- glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC), portanto está presente naturalmente em grande quantidade dentro das células (5-15 mM por kg, dependendo da região), mas em pequena quantidade extracelular (Chen, 2000 e Danbolt 2001). Sabe-se que o aumento da concentração extracelular de glutamato afeta profundamente a atividade neuronal principalmente pela ativação de receptores ionotrópicos e

metabotrópicos. (Choi, 1988), modulando a função astrocitária por aumento de inositol trifosfato, e pela abertura dos canais de voltagem dependentes de cálcio elevando a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Pearce, 1986). O cálcio por sua vez, promove a ativação de várias enzimas como ATPases, fosfolipases, proteases e endonucleases, que promovem a depleção de ATP, de proteínas do citoesqueleto, ruptura da membrana plasmática, além de causar lesões na cromatina (Nelson, 2011). Alterações na membrana celular geram desequilíbrios dos íons intra e extracelulares, causando a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria caracterizando o quadro de necrose. (Kromer, 1998).

A heterogeneidade celular encontrada nas amostras refletiu a multiplicidade celular das células hipocâmpais, como era esperado, o que demonstrou que nosso protocolo de dissociação de culturas hipocâmpais preserva essa característica do tecido. Um dos desafios de fazer a análise das células de cultura organotípica por citometria de fluxo estava justamente na promoção satisfatória da dissociação do tecido, a fim de obter dados representativos da população em questão.

Outro fator importante dessa parte da análise foi o número de eventos avaliados nos experimentos. A utilização de 30.000 eventos assegurou uma representatividade dos diferentes tipos celulares da amostra, isto é, quanto maior o número de eventos menor o erro (Shapiro, 2003).

Com a análise de morte celular conseguimos demonstrar que tanto o glutamato como a estaurosporina foram eficazes indutores positivos de morte celular. O que possibilitou demonstrar a morte por necrose, apoptose inicial e apoptose

tardia, através da marcação, estatisticamente significativa, por Iodeto de Propídio e Anexina V, ilustrando a morte celular nas células de hipocampo. Além disso, a porcentagem de eventos viáveis nos grupos controle corrobora com os resultados da dissociação bem sucedida, que demonstrou ser reprodutível entre os experimentos.

Ao correlacionarmos o tipo de morte ocorrida com tamanho e granulosidade dos eventos não foi possível identificar diferenças de acordo com a marcação dos dois fluoróforos. Ou seja, os parâmetros usados não possibilitaram uma identificação de tamanho e complexidade celulares mais suscetíveis aos tipos de morte estudada.

Entretanto, sabe-se que a população neuronal do hipocampo é composta essencialmente de duas classes: células principais ou neurônios e células não principais ou interneurônios. As células principais incluem os neurônios piramidais presentes nas regiões de CA, as células granulosas do GD e as células musgosas do hilo (Vida, 2010 e Schneider, 2014). Os interneurônios são a população minoritária em relação aos neurônios e apresentam um alto grau de heterogeneidade morfológica e fisiológica (Vida, 2010 e Booker, 2014).

Em linhas gerais os neurônios possuem longos prolongamentos e apresentam morfologia complexa. Dentre as células da glia, as maiores são os astrócitos, com núcleos esféricos e diversos prolongamentos, enquanto as menores são as células da micróglia, que fazem parte do sistema mononuclear fagocitário. (Kettenmann, 2008). Na maioria dos casos os neurônios são menos resistentes a danos do que os interneurônios (Schmidt-Kastner, 1991).

Ao percebermos que a população majoritária das nossas amostras está na faixa de  $10^2$ , mas que uma pequena subpopulação possui maior tamanho e granulosidade, poderíamos a partir de dados da literatura (Vida, 2010; Kettenmann, 2008 e Booker, 2014), supor que se trata de neurônios. No entanto, esses dados devem ser obtidos através da utilização de marcadores específicos viabilizando assim, a identificação das células presentes.

A associação da citometria de fluxo à cultura organotípica representa uma contribuição importante na redução no número de animais utilizados (Stahl, 2009). Essa combinação vem demonstrando ser um bom método para a caracterização e quantificação da morte celular nas fatias hipocâmpais de ratos, tendo em vista ainda, um grande potencial no acréscimo de parâmetros a serem avaliados para viabilizar a contribuição no avanço do conhecimento a respeito de desordens hipocâmpais.



## REFERÊNCIAS

Araki, T, Kato, H, Kogure, K. 1989. Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. *Acta Neurol. Scand.* 80, 548–553.

Bherer L, Erickson KI, Liu-Ambrose T. 2013. A review of the effects of physical activity and exercise on cognitive and brain functions in older adults. *J Aging Res* 2013:657508.

Booker SA, Song J, Vida I. 2014. Whole-cell patch-clamp recordings from morphologically- and neurochemically-identified hippocampal interneurons. *J Vis Exp*(91): e51706.

Bouvier d'Yvoire M, Bremer S, Casati S, Ceridono M, Coecke S, Corvi R, Eskes C, Gribaldo L, Griesinger C, Knaut H and others. 2012. ECVAM and new technologies for toxicity testing. *Adv Exp Med Biol* 745:154-80.

Canu N, Ciotti MT, Pollegioni L. 2014. Serine racemase: a key player in apoptosis and necrosis. *Front Synaptic Neurosci* 6:9.

Chen CJ, Liao SL, Kuo JS. 2000. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J Neurochem* 75(4): 1557-65.

Choi DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8):623-34.

Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65(1):1-105.

Daviaud N, Garbayo E, Schiller PC, Perez-Pinzon M, Montero-Menei CN. 2013. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Exp Neurol* 248:429-40.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.

- Evans VG. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int* 17(5):461-76.
- Folkerts, MM, Berman, RF., Muizelaar, JP, Rafols, JA. 1998. Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 15, 349–363.
- Franz S, Munoz LE, Heyder P, Herrmann M, Schiller M. 2014. Unconventional apoptosis of polymorphonuclear neutrophils (PMN): Staurosporine delays exposure of phosphatidylserine and prevents phagocytosis by MPhi-2 macrophages of PMN. *Clin Exp Immunol*. 10.1111/cei.12412.
- Frozza RL, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran RA, Salbego CG. 2009. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res* 34(2):295-303.
- Geddes DM, LaPlaca MC, Cargill RS. 2003. Susceptibility of hippocampal neurons to mechanically induced injury. *Exp Neurol* 184(1): 420-7.
- Golstein P, Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences* 32:37-43.
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international* 2014:150845.
- Hicks RR, Smith DH, Lowenstein DH, Saint Marie R, McIntosh TK. 1993. Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus. *J Neurotrauma* 10, 405-414.
- Hoppe JB, Frozza RL, Horn AP, Comiran RA, Bernardi A, Campos MM, Battastini AM, Salbego C. 2010. Amyloid-beta neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3beta, tau and neuroinflammation. *J Pineal Res* 48(3): 230-8.
- Kettenmann H, Verkhratsky A. 2008. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 31(12):653-9.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60:619-42.
- Krohn AJ, Preis E, Prehn JH. 1998. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J Neurosci* 18(20):8186-97.

Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK. 1992. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci.* 12, 4846–4853.

Nelson DL, Cox MM. 2011. Biossinalização. In: Nelson D L, editor. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed

Pearce B, Albrecht J, Morrow C, Murphy S. 1986. Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neurosci Lett* 72(3):335-40.

Perouansky M, Pearce RA. 2011. How we recall (or don't): the hippocampal memory machine and anesthetic amnesia. *Can J Anaesth* 58(2):157-66.

Pyka M, Cheng S. 2014. Pattern association and consolidation emerges from connectivity properties between cortex and hippocampus. *PLoS One* 9(1):e85016.

Rubin RD, Watson PD, Duff MC, Cohen NJ. 2014. The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Front Hum Neurosci* 8:742.

Schmidt-Kastner R, Freund TF. 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40(3):599-636.

Schneider CJ, Cuntz H, Soltesz I. 2014. Linking macroscopic with microscopic neuroanatomy using synthetic neuronal populations. *PLoS Comput Biol* 10(10):e1003921.

Shapiro, HM. 2003. Data Analysis. In: Shapiro H M. *Practical Flow Cytometry*, Hoboken, New Jersey :John Wiley & Sons, Inc. p 225-226.

Shugar D. 1995. Protein kinase inhibitors--potential chemotherapeutic agents. *Acta Biochim Pol* 42(4):405-18.

Shipton OA, El-Gaby M, Apergis-Schoute J, Deisseroth K, Bannerman DM, Paulsen O, Kohl MM. 2014. Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(42):15238-43.

Silva BCM, Vasconcelos DM, Sales MM. 2013. Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. In: Sales MM, editor. *Citometria de Fluxo Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa*. São Paulo: Atheneu. p 21-28.

Stahl K, Skare Ø, Torp R. 2009. Organotypic cultures as a model of Parkinsons disease. A twist to an old model. *ScientificWorldJournal* 9:811-21.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37(2):173-82.

Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135(2):397-402.

Thuret G, Chiquet C, Herrag S, Dumollard JM, Boudard D, Bednarz J, Campos L, Gain P. 2003. Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *Br J Ophthalmol* 87(3):346-52.

Toth Z, Hollrigel GS, Gorcs T, Soltesz I. 1997. Instantaneous perturbation of dentate interneuronal networks by a pressure wave-transient delivered to the neocortex. *J Neurosci* 17(21): 8106-17

Vida I, Frotscher M. 2000. A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1275-80.

Vida I. 2010. Morphology of hippocampal neurons. In: Cutsuridis V, Graham B, Cobb S, editor. *Hippocampal microcircuits a computational modeler's resource book*. New York: Springer. p 27-70.

Wolf M, Baggiolini M. 1988. The protein kinase inhibitor staurosporine, like phorbol esters, induces the association of protein kinase C with membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 154(3):1273-9.

### **Agradecimentos:**

Esse trabalho recebeu apoio das agências de fomento CNPq e FAPERGS.

## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 1 Caracterização da população celular das culturas organotípicas de hipocampo de ratos por citometria de fluxo.** **A)** Gráfico representativo da densidade populacional das fatias hipocampais\*. **B)** Contour Plot da população celular das fatias hipocampais\*. **C)** Dot Plot da população celular das fatias de hipocampo, representativo de todos os eventos detectados com seus respectivos tamanhos e granulosidades. **FSC-H:** tamanho celular; **SSC-H:** granulosidade celular. \* A região em amarelo representa maior concentração celular.

**Figura 2 Quantificação do tipo de morte celular em culturas organotípicas de hipocampo de ratos.** **A)** Dot Plots representativos dos grupos controle, tratado com glutamato (5 mM/ 24h) e tratado com estaurosporina (1  $\mu$ M/ 24h) e respectivas porcentagem de não marcação ou marcação das células hipocampais por Anexina V e Iodeto de Propídio. **B)** Gráfico da quantificação do tipo de morte celular.

**Tabela 1 Descrição estatística da morte celular nas fatias de cultura organotípica de hipocampo de ratos.** Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e a análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey, usando o programa GraphPad Prism 5. Diferenças entre as médias serão consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

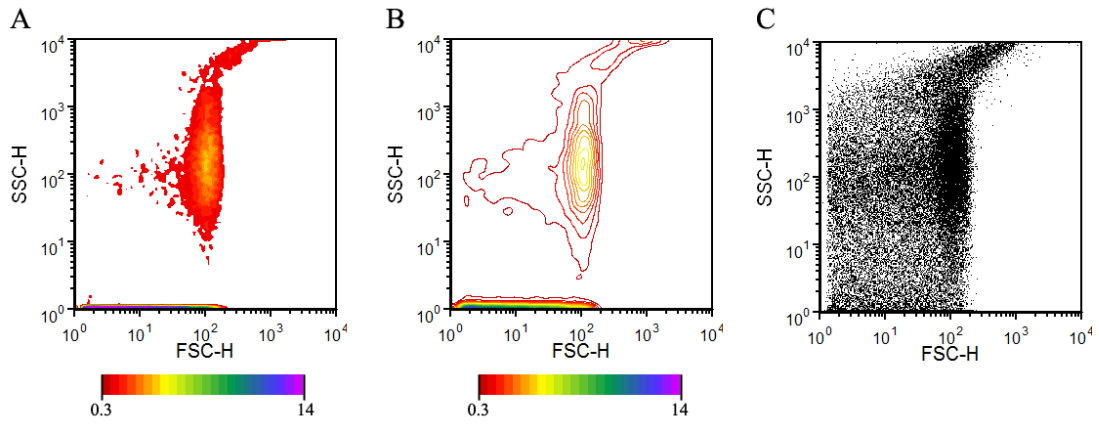
**Figura 3 Caracterização do tamanho e da granulosidade conforme o tipo de morte celular em fatias de cultura organotípica de hipocampo de ratos por citometria de fluxo.** Dot plot de tamanho (FSC-H) por granulosidade (SSC-H). Células viáveis (*alive*) estão representadas em preto, em vermelho a representação da marcação de células por Iodeto de Propídio (FL-3), em verde a representação das células marcadas por Anexina V (FL-1) e em azul a co-marcação por Anexina V e Iodeto de Propídio (FL-1/FL-3), conforme o tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H).

**Figura 4 Dot Plots de correlação entre tamanho das células hipocampais e marcadores de morte celular (FL-1 ou Anexina V e FL-3 ou Iodeto de Propídio).** **A)** Relação do tamanho das células (FSC-H) com marcação por Anexina V (FL-1), indicativo de apoptose. **AI)** Tamanho de células do grupo controle x marcação por Anexina V. **AII)** Tamanho de células no grupo tratado com glutamato (5 mM/ 24h) x marcação por Anexina V. **AIII)** Tamanho de células no grupo tratado com estaurosporina (1 $\mu$ M/ 24h) x marcação por Anexina V. **B)** Relação do tamanho das células com marcação por Iodeto de Propídio (FL-3), indicativo de necrose. **BI)** Tamanho de células no grupo controle x marcação por PI. **BII)** Tamanho de células no grupo tratado com

glutamato (5 mM/ 24h) x marcação por PI. **BIII)** Tamanho de células no grupo tratado com estaurosporina (1  $\mu$ M/ 24h) x marcação por PI.

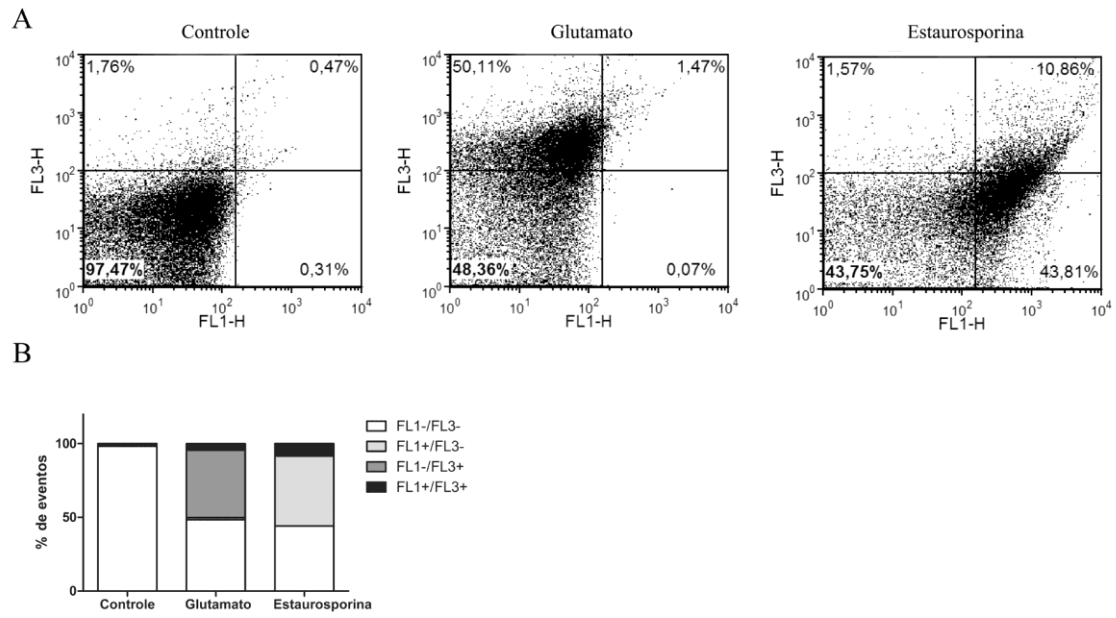
**Figura 5 Dot Plots de correlação entre granulosidade das células hipocampais e marcadores de morte celular (FL-1 ou Anexina V e FL-3 ou Iodeto de Propídio).** **A)** Relação da granulosidade das células (SSC-H) com marcação por Anexina V (FL-1), indicativo de apoptose. **AI)** Granulosidade de células do grupo controle x marcação com Anexina V. **AII)** Granulosidade de células no grupo tratado com glutamato (5 mM/ 24h) x marcação por Anexina V. **AIII)** Granulosidade de células no grupo tratado com estaurosporina (1 $\mu$ M/ 24h) x marcação por Anexina V. **B)** Relação da granulosidade das células com marcação por Iodeto de Propídio (FL-3), indicativo de necrose. **BI)** Granulosidade de células no grupo controle x marcação por IP. **BII)** Granulosidade de células no grupo tratado com glutamato (5 mM/ 24h) x marcação por PI. **BIII)** Granulosidade de células no grupo tratado com estaurosporina (1  $\mu$ M/ 24h) x marcação por PI.

**FIGURA 1**





**FIGURA 2**



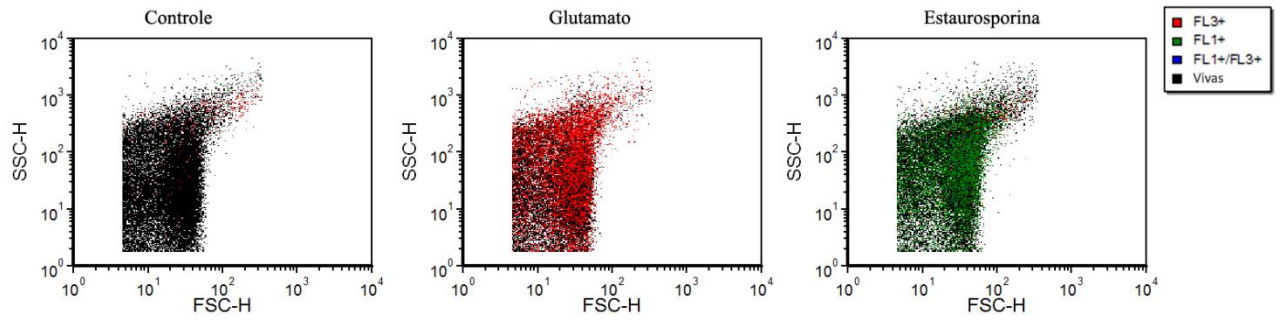
## TABELA 1

**Tabela 1** Estatística Descritiva da porcentagem de morte celular.

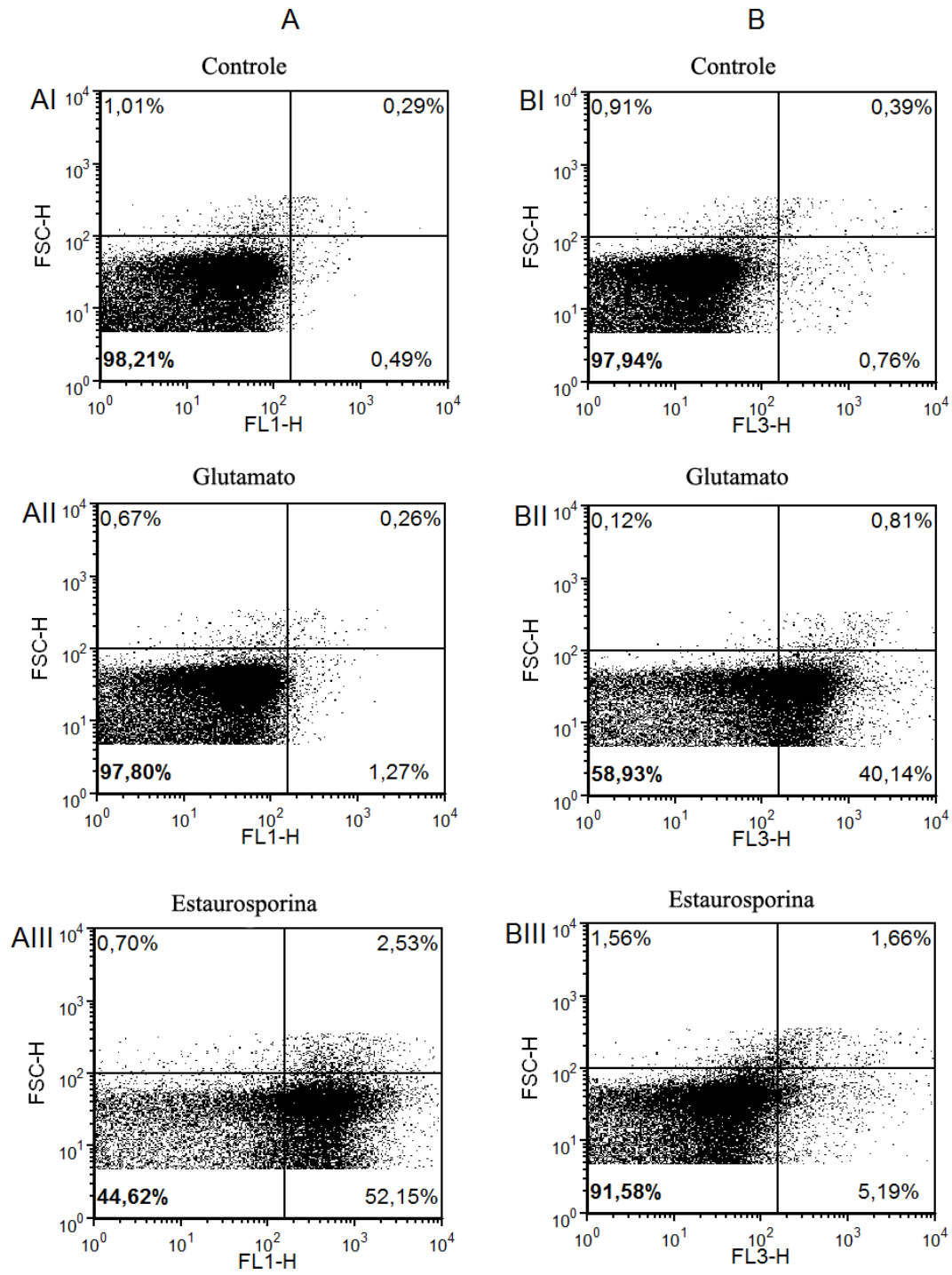
	FL1-/FL3-	FL1+/FL3-	FL1-/FL3+	FL1+/FL3+
<b>Controle</b>				
Média (%)	98.25	0.4788	1.063	0.2088
DP	0.7528	0.5817	0.7577	0.1953
EPM	0.2662	0.2057	0.2679	0.06906
<b>Glutamato</b>				
Média (%)	48.47***	1.346	45.74***	4.442
DP	2.316	1.740	5.739	4.754
EPM	1.036	0.7780	2.567	2.126
<b>Estaurosporina</b>				
Média (%)	44.17***	47.52***	1.045	7.268*
DP	4.510	6.810	0.5030	3.158
EPM	2.255	3.405	0.2515	1.579

DP: Desvio Padrão; EPM: Erro Padrão da Média; \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  em relação ao controle; resultados correspondentes de no mínimo 4 experimentos independentes.

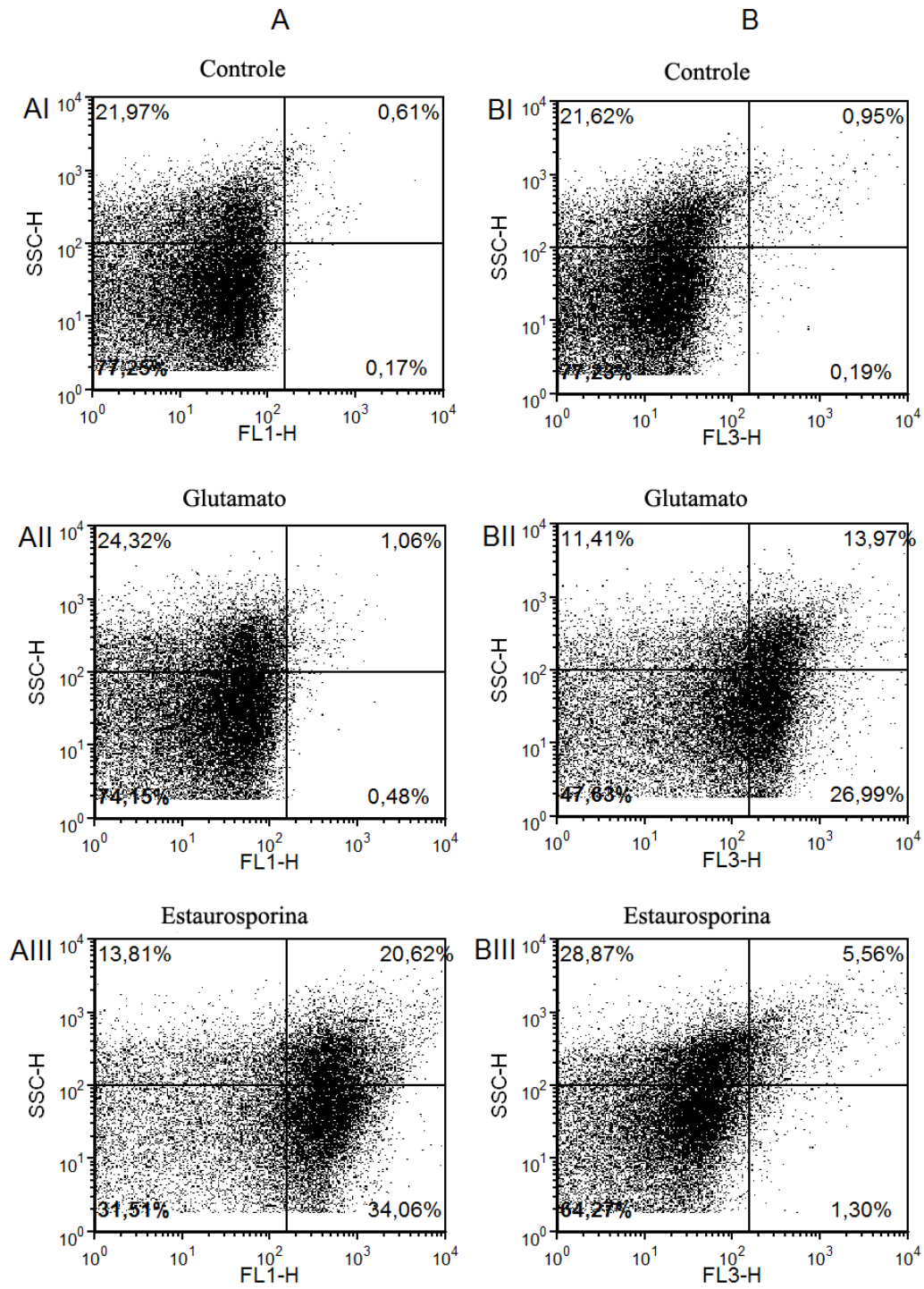
**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**



## **ANEXO I**

### **NORMAS DA REVISTA HIPPOCAMPUS JOURNAL**

#### **Author Guidelines**

Online Submission and Peer Review

Wiley's Journal Styles and EndNote

Hippocampus is now receiving submitted manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/hipo>.

All manuscripts should now be submitted online. To submit a manuscript, launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/hipo> . Check for an existing user account by entering your email address in the space beneath the box that reads "Password Help." If you are submitting for the first time, and you do not find an existing account, create a new account by clicking on the words "Create Account" in the top right corner of the screen. Instructions are posted under the heading "Resources" on the login page and also within the site itself. Please be sure to read them carefully. If you experience difficulty during the submission process, contact technical support at [ts.mcsupport@thomson.com](mailto:ts.mcsupport@thomson.com).

Hippocampus is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium. The Consortium is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from each other. If you submit a revision of your manuscript to another Consortium journal, we can forward the reviews of your manuscript to that journal, should you decide this might be helpful. You can find a list of Consortium journals and details about forwarding reviews at <http://nprc.incf.org> .

#### **File Format Instructions for Online Submission**

Manuscript file, tables, and figures must be submitted separately.

## TEXT

Submit your text in DOC or RTF format. Do not embed figures or tables in this document; these should be submitted as separate files.

## TABLES

Tables should be created with a word processor and saved in either DOC or RTF format. Do not embed tables in your text.

## FIGURES

To ensure the highest print quality, your figures must be submitted in TIF format according to the following minimum resolutions:

1200 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)

300 dpi for halftones (black and white photographs)

600 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

Vector-based figures (e.g., figures created in Adobe Illustrator) should be submitted in EPS format.

Authors are encouraged to visit <http://cpc.cadmus.com/da/> for more information regarding supported artwork formats.

## COLOR FIGURES

In addition to the above resolution guidelines, color figures must be submitted in a CMYK colorspace. Do not submit color figures as RGB.

## UNACCEPTABLE FIGURE FORMATS

Do not submit figures in any of the following formats: JPG, GIF, PSD, CRD, PCT, PPT, PDF, XLS, DOC, BMP, 123 (or other Lotus formats).

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at [ts.mcsupport@thomson.com](mailto:ts.mcsupport@thomson.com).

## General Information

Because of space constraints in publication of the journal, original research papers must be limited to 10 printed pages, based on an expectation of approximately 50,000 characters and 4-6 one-quarter to half page figures. During review, the editors may require shortening of text or limiting of figures if the composite exceeds 10 printed pages. The cost of reproduction of all color illustrations, however, must be borne by the author

### **Forms of Manuscripts**

Papers reporting original research will be the major substance of the journal, but occasional short Commentaries will also be published. The Commentaries will be of three types: Historical Reviews of individual careers or areas of research; Updating Reviews that briefly summarize the state of knowledge in a particular subject area; and Speculative Reviews, in which new perspectives or hypotheses are outlined. The Speculative Reviews may take the form of Point-Counterpoint presentations by two or more authors with differing viewpoints on a topic area. The publication of a Commentary in *Hippocampus* will normally follow an invitation to the author(s) from the Editor. However, anyone interested in contributing a Commentary or suggesting a topic for one is invited to contact the Editor. The Editor also wishes to encourage neurobiologists to contribute to the journal by writing short letters, which will be considered for publication in a separate Letters to the Editor section. This section will provide a medium for communication and discussion, not only of points that arise from papers published in *Hippocampus*, but also of topics of general interest to the readership of the journal. The Editor reserves the right to invite replies or comments to such letters at his discretion.

### *Rapid Communications*

Papers submitted as Rapid Communications will receive an expedited review and priority for publication once accepted. Rapid Communications should occupy no more than three journal pages including references (generally no more than 30) and figures. A typical journal page contains approximately 1,200 words. Thus, articles containing one page of illustrative material should normally be confined to approximately 2,000 words excluding references.

Rapid Communications should begin with an Abstract or Introductory Paragraph of less than 200 words summarizing the background, goals of the research, and conclusions. The body of the text should include an expanded background and rationale for the research and a brief overview of methods that reference papers providing detailed descriptions of methods. The bulk of the text should be devoted to the results and a brief discussion of the significance and implications of the research. No section headings (e.g., Materials and Methods, Results) should be used in this format. If, on the rare occasion, a more extensive description of methods is essential for understanding the results of the



research, this text should be included at the end of the paper and titled, Detailed Methods. References should be cited and formatted as in standard Research Papers published in Hippocampus .

### *Review and Production Process*

In general, submitted manuscripts will be confidentially refereed by at least two members of the Editorial Board. If the reviewers disagree on the acceptability of the manuscript, a third evaluation will be sought. In those cases in which the content of a manuscript is outside the field of expertise of members of the Editorial Board, it will be forwarded to qualified reviewers. To facilitate the review process, authors are encouraged to suggest the names of reviewers in addition to members of the Editorial Board whose expertise qualifies them to referee the paper. The actual selection of the reviewers, however, will be determined by the Editor, acting on the advice of the Section Editor and the Editorial Board. Based on the findings of the reviewers, a decision will be made by the Editor, and the author will be notified as soon as possible. In the case that revision of the manuscript is required, it should be noted that manuscripts not resubmitted within 3 months may be treated as new submissions.

Submission of a paper to Hippocampus will be taken to imply that it represents original research not previously published, except as an abstract, and that it is not being considered for publication elsewhere in similar form. At the time of submission, each manuscript should be accompanied by a statement from the submitting author that all coauthors agree to having their names listed as authors and that colleagues whose unpublished work is referred to, or who are acknowledged, agree to that.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA                      Terms                      and                      Conditions  
[http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

**For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Electronic proofs will be sent to the first author or the author designated for proofreading. All corrections should be clearly marked on the proofs, which should be returned to the publisher's office within 3 days. Costs for alterations in the proofs other than corrections of printer's errors may be charged to the authors. There will be no proofs for the Letters section. Reprints: Reprints may be purchased at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=hipo>.

## **Preparation of the Manuscript**

The manuscripts should be typed double-spaced throughout with a 1" (2.5 cm) margin on all sides. All pages should be numbered consecutively, beginning with the title page. Manuscripts should be written using standard American spelling. The spelling of nontechnical terms should preferably follow that indicated in Webster's Third International Dictionary. The numbers one through nine should be spelled out; Arabic numerals should be used for numbers greater than nine and units of time and measure. All numbers should be spelled

out when they appear as the first word of a sentence. Abbreviations should never be used at the beginning of a sentence.

Research papers should include a Title Page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Acknowledgments, and Figure Legends. Tables and figures should be submitted as separate files. Footnotes should not be used. If absolutely essential, they should be incorporated in the text, in parentheses.

**Title Page.** The Title Page should include the complete title of the paper, together with the name(s) of the author(s) and institutional affiliations (to department level); a running (abbreviated) title, not exceeding 60 characters and spaces; the number of text pages, figures, and tables; and the name, full address, telephone number, and E-mail address of the author to whom correspondence, including proofs, should be sent, and all grant information in the following format: Grant sponsor:\_\_\_\_\_; Grant number:\_\_\_\_\_. A list of five key words that do not occur in the title should be included for abstracting purposes. The title should represent the contents of the paper and should not include technical jargon, chemical formulas, or arbitrary abbreviations.

**Abstract.** The Abstract should be clearly written in 300 words or less and should succinctly state the objectives of the study, experimental design, major observations and conclusions, and their major significance. The abstract should be intelligible to neuroscientists in general and should thus be free of specialized jargon and abbreviations. References should generally not be cited in the abstract, but if they are, the complete citation should be given (e.g., Conti F et al., J Comp Neurol 1994; 343:554–565).

**Introduction.** The Introduction section should provide sufficient background information to make clear the rationale and objectives of the reported studies. Extensive literature reviews are generally not necessary.

**Materials and Methods.** The Materials and Methods section should be concise but should adequately describe experimental procedures to allow for replication of the reported experiments. Wherever possible, references should be made to published protocols. Excessively detailed descriptions of widely used techniques or details of procedures that will not be of general interest to the reader should be avoided. Submission of a paper to Hippocampus implies that all animal experimentation reported in the paper has been conducted in accordance with the guidelines laid down by the NIH ( NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals ) in the USA or by the European Communities Council. When human subjects are used, adequate documentation should be included in the manuscript that the experiments were undertaken with the understanding and consent of each subject. It is assumed that with the publication of a paper in Hippocampus the authors will make available,

whenever possible, reagents, such as antibodies, that were used in the research and are not commercially available.

**Results and Discussion.** In the Results section, findings should be described without discussion of their significance. Authors are encouraged to use subheadings to clarify the organization of this section. In the Discussion, authors should provide an interpretation and validation of their findings, conclusions, and their significance in relation to previously published work. Repetition of the results or extensive review of the literature should be avoided.

**References.** It is the responsibility of the author(s) that each reference in the text appears in the References section and that each reference listed in this section is correct and cited in the text. References should be cited in the text by author's name followed by year of publication, thus: Ben-Ari (1981) or (Ben-Ari, 1981); Squire and Zola (1983) or (Squire and Zola, 1983). In the case that there are more than two co-authors: Lopes da Silva et al. (1989) or (Lopes da Silva et al., 1989). A typical citation should follow the form: Data reported by Ben-Ari (1981) have recently been confirmed by others (Lopes da Silva et al., 1989). When more than one reference is cited, the references should be listed in chronological order. A paper that is in preparation or submitted to a journal but not yet accepted for publication should not be included in the References section; reference to a paper of this type should be cited as "unpublished observations", and the initials and surname(s) must be listed in the text for the author(s) whose unpublished experiments are cited.

In the References section, papers should be listed in alphabetical order according to the name of the first author. In the case of several references with the same first author but more than one co-author, the references should be listed in chronological order. When references are made to more than one paper by the same first author published in the same year, the postfix a, b, c, etc., should be used both in the text and in the References section; for papers published in different years, the references should be listed in chronological order. The name of the author(s) should be followed by the full title of the paper, and the complete source of the reference (abbreviations of journals should follow those used in Index Medicus), including the year of publication, volume number, and the first and last pages. The form used in the References section should be the following:

Journal article:

Hyman JM, Zilli EA, Paley AM. 2005. Medial prefrontal cortex cells show dynamic modulation with the hippocampal theta rhythm dependent on behavior. *Hippocampus* 15:739-749.

Book chapter:

Gilmor ML, Rouse ST, Heilman CJ, Nash NR, Levey AI. 1998. Receptor fusion proteins and analysis. In: Ariano MA, editor. *Receptor localization*. New York: Wiley-Liss. p 75-90.

Book:

Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons. 1223 p.

**Preparation of Illustrations.** Illustrations submitted for publication should be the exact size that they will appear in print. The size of illustrations should not exceed the dimensions of the journal itself (7" x 9 3/8", or 17.8 cm x 23.8 cm). All figures, both line drawings and halftones, should be appropriately lettered and labeled. Lettering should remain at least 1/4" (6 mm) from the edges of figures to allow for trimming. The cost for printing color art is \$950 for the first page and \$500 for each additional page up to four pages. The cost will be higher if the color art is submitted other than as specified above. Figures considered to be of insufficient quality for publication will be returned to the author(s) for correction. All figures must be referred to in the text and must be numbered and cited consecutively (Fig. 1, Fig. 2, etc.). Each figure should be accompanied by an explanatory legend that makes the illustration understandable without need for reference to the text.

**Preparation of Tables.** Each table should be typed, double-spaced, as a separate doc or rtf file. The table should include an informative title and a legend that makes the table comprehensible without resorting to the text. Each column in the table should have a heading, and the columns should be formatted to be easily distinguishable by the compositor. If the table is highly complex, it should be submitted as a graphic in tiff or eps format so as to avoid introduction of errors during typesetting that would be difficult to detect in the proofreading stage. In this case, tables should be prepared using the same considerations one would apply to a line drawing illustration. All tables must be referred to in the text and must be numbered and cited consecutively (Table 1, Table 2, etc.).

**Units, Symbols, and Abbreviations** . For symbols of physical units, the SI system (Système International d' Unités) should be used. Abbreviations should not be used excessively in the text, and in all cases the word or words to be abbreviated should be written in full on the first occurrence, followed by the abbreviation in parentheses. The same abbreviations should be used in both the text and figures. If many abbreviations are used, including those used repeatedly in the tables or figures, they should be listed on a separate sheet, entitled Abbreviations.

Posters deposited in public access collections will not be considered as prior publication for the purposes of our acceptance at Hippocampus. However, the editors reserve the right to ask for the poster to insure that the information contained in the paper goes beyond or is different from that contained in the poster in some way and is not a duplicate publication.

**Data Set Access.** Authors are encouraged to make available the data sets relevant to the study and add reference to how the repository can be accessed.

Referrals to the Open Access Journal, Brain and Behavior

Hippocampus works together with Wiley's Open Access journal, Brain and Behavior, to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. The editor of Hippocampus may offer the authors the option to have their manuscript directly transferred to Brain and Behavior. The transfer will occur on-line and guarantee the anonymity of the peer-review process. It will not require reformatting or rewriting the manuscript at this stage. Brain and Behavior will render an editorial decision within a short time after the transfer. The Editor of Brain and Behavior will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. Accepted papers can be published rapidly, typically within 15 days of acceptance. Brain and Behavior is an Open Access journal and article publication fees apply. For more information please go to <http://www.brain-behavior.com/info>.

Peer Review Scorecard Pilot

Hippocampus is participating in Wiley's pilot of transferable peer review in which reviewers complete a standard scorecard in addition to their usual review. Authors of original research articles rejected with completed scorecards will be invited to transfer the manuscript, reviews, and scorecard to any of the other participating journals in the pilot. Authors will have the opportunity to revise their manuscript according to the review comments prior to transfer if they wish to do so. A list of participating journals and more information about the pilot can be found here. We believe that this system of preserving original peer review for the next journal's use will decrease repetitious review, save authors, reviewers

and editors valuable time and significantly increase the speed to publication for many papers.