

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

**Avaliação da neuroplasticidade em modelos experimentais de
epilepsia do lobo temporal**

VICTOR RODRIGUES SANTOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para concorrer ao título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco.

Co-Orientador: PhD. Steve C. Danzer.

Ribeirão Preto

2011

Santos, Victor Rodrigues

Avaliação da neuroplasticidade em modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal. Ribeirão Preto, 2011. 195p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para concorrer ao título de Mestre em Ciências, área de Fisiologia.

Orientador: Garcia-Cairasco, Norberto.

Palavras-chaves: 1- ELT 2- Neuroplasticidade
3-Neurodegeneração 4- Neurogênese.

“Onde quer que vá, vá com coração.”

Confúcio

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos, que em todas as fases da realização dessa, demonstraram amor incondicional e que sem seu apoio seria impossível a sua realização.

Pela formação de personalidade, caráter e por me ensinarem a nunca desistir de um sonho.

Agradecimentos

Agradeço primeiro a **Deus** por abrir e fechar as portas certas me trilhando para a realização dos meus sonhos e objetivos. Por me dar paz nos momentos que achei que poderia perder a razão.

À **minha família** pelo apoio emocional, afetivo e financeiro que foram de suma importância para que eu pudesse investir na realização dos meus sonhos. Obrigado pela honra de ter uma família maravilhosa que tenho muito orgulho de fazer parte e ter em minha vida.

Obrigado ao professor Dr. **Norberto Garcia Cairasco**, por me aceitar no laboratório e pela excelente orientação durante a realização dessa. Obrigado por confiar em mim e me dar oportunidades ímpares que me permitiram aprender muito mais do que imaginei. Pelas ótimas discussões e por me ensinar a amar a ciência e a pesquisa.

Agradeço ao professor PhD. **Steve C. Danzer**, por aceitar a minha ida ao seu lab e pela ótima orientação durante a realização de parte dessa dissertação. Pela grande paciência em me ensinar coisas básicas. *Thanks!*

Aos professores Dr. **Márcio Flávio Dutra Moraes** e Dr. **João Pereira Leite**, por aceitarem fazer parte da banca avaliadora. Obrigado pelos comentários e críticas que certamente enriquecerão o meu conhecimento.

Aos meus amigos técnicos do LNNE, **Flávio Del Vechio** (“Flávião”) e **José Antônio Cortes de Oliveira** (“Zéééé”, “Joseph Antony”) por me agüentarem, me ajudarem na vida do lab e pela ótima amizade.

Ao **Olagide Castro** que foi o primeiro a realmente acreditar no meu potencial e muitas vezes se mostrar um co-orientador me ajudando a traçar meu caminho durante a realização dessa, aqui e no EUA. Pela amizade e por me dar algumas dicas sobre técnicas como “*hokages*” e demais que foram muito úteis no meu dia a dia fora do lab.

À **Simone Marroni** (“Loira”, “Si”) pela amizade e por acreditar em mim me ajudando em várias etapas dessa. Por me dar o prazer de fazer parte do trabalho dela no qual aprendi muito. Pelas longas e prazerosas conversas/desabafos durante os cafés se mostrando uma ótima amiga nos momentos difíceis.

Ao **Eduardo Umeoka** (“pilantra umeoka”, japonês) pela amizade e muitas vezes alegrar o ambiente do laboratório, pelas conversas no café e amizade dentro e fora do lab.

À **Jéssica dos Santos** (“Jess”) pela amizade e companheirismo dentro e fora do lab, pelo carinho e atenção nos momentos bons e difíceis. Pelas aulas de dança utilizadas como uma terapia e pelas noites que me ajudaram a relaxar.

À **Ana Luiza Donatti** (“Aninha”, “Aninha das caverinhas”) pela amizade, carinho e atenção dentro e fora do lab. Por se mostrar minha amiga nos momentos bons e ruins e por me deixar apertar as bochechas do Pedrinho.

À **Poliana Bertti** (“Poli”) pela amizade e por me ensinar muito sobre epilepsia em humanos e seus fluxogramas e saber que realmente escolher a básica, foi uma decisão correta e um ótimo caminho a se trilhar e ficar bem longe dos seus fluxos. Por tentar me ensinar inglês, tarefa muito muito difícil. Pelos ótimos pudins!

À **Marília Pereira**, pela amizade e paciência em me ajudar com as estatísticas.

Ao **Julian Tejada** (“boliviano”) pela amizade e discussões no laboratório. Pelos chocolates no bandeijão.

Ao **Artur Fernandes** pela amizade e discussões no lab que muitas vezes mostraram um olhar diferente ajudando a ver algumas coisas sobre outra óptica. Pelos chocolates.

Ao **Teddy Talbot** (“Teodoro”) pela amizade e por me fazer rir com seu jeito baiano de ser.

Ao **Guilherme Podolsky** (Poldolsky) pela amizade nos raros momentos que ele aparece no lab e pelas discussões sobre o olhar de um médico na área básica. Pelos chocolates.

À **Luciana Strambi** (“Lu”) e **Guilherme Strambi** pela amizade e carinho.

À Dr^a. **Cristiane Tilelli** (“Cris”) pela amizade e atenção no breve momento que convivemos no lab e por me autorizar a utilizar o tecido de seu doutorado na realização de parte dessa dissertação. Pela ótima ajuda e orientação no começo da realização dessa dissertação

Aos ex-membros do LNNE Gabriel Arisi, Maira Foresti e Franco Rosseti que apesar do pouco tempo de convívio, me apoiaram e ensinaram durante os estágios antes de começar o mestrado.

Às ótimas pessoas da secretaria do departamento de Fisiologia, **Eliza, Cláudia, Fernandinho e Andrea** por me ajudar e salvarem minha pele em alguns momentos de confusão minha e pela amizade no dia a dia no departamento.

Ao **Rubinho**, pela alegre amizade e ótimas dicas sobre histologia.

Aos bioteristas do departamento **Eduardo e Leonardo**, pela amizade e companheirismo e ótimas conversas no dia a dia no departamento.

À senhora **Maria Luiza** pelos ótimos cafés e chás, que me deixavam acordado em momentos críticos.

Aos membros do laboratório do professor Steve Danzer no EUA, PhD. **Raymund Pun**, pela orientação, amizade e acreditar em minha capacidade; PhD. **Brian Murphy**, pelas discussões e auxílio em alguns protocolos; **Niki Faulkner**, pela amizade, carinho e ótimos almoços que me ensinaram muito inglês e sobre o EUA; **Mike Hester**, pela amizade; **Maggie**, pela amizade; **Hiluan Yin**, pelo companheirismo no lab.

Aos amigos **Leonardo, Tiago e Danilo** pela excelente amizade durante esses 3 anos e por me darem um teto para viver no primeiro mês do mestrado.

Ao **Guilherme Barbosa**, pela amizade e por compartilhar de um lar com paciência e favorecer um ambiente tranquilo para se viver.

A minha ex-orientadora **Dr^a. Gláucia Cavasin**, pela ótima orientação durante a graduação, o que me deu base para realização dessa dissertação. Por me ensinar histologia e me dar todas as oportunidades que me fizeram realizar uma ótima graduação. Por me respeitar como profissional e acreditar no meu potencial durante o meu período como monitor e depois como professor substituto na UFG.

Aos amigos que fizeram cursão comigo, **Renata Camargo, Paula Marangon, Ricardo Merino, Rafael Rossi, Davi Moraes, Melina Silva, Priscila Cassolla, André Mecawi, Iracema Araújo, Leandro Nulo**, obrigado por nos ajudar a agüentar a barra durante esse momento difícil, mas enriquecedor.

Aos amigos, alunos, funcionários e professores do departamento de Fisiologia, pelo companheirismo e amizade no dia a dia, pelas aulas no cursão.

Aos demais professores do departamento de morfologia do ICB-UFG e às **Dr^a Walquiria Arruda e Dr^a Ellen Synthia**, pelo que me ensinaram e pelo ótimo momento em que trabalhamos juntos.

A melhor turma de biologia (2003 a 2008) que a UFG já viu e as ótimas pessoas que eu tive o prazer de conviver por 5 anos. Pessoas que vou guardar do lado esquerdo

do peito para o resto da vida. Obrigado pela amizade e pela compreensão, que apesar da saudade, entendem a dificuldade em visitá-los.

Às minhas avós pelo amor e carinho.

Aos meus tios, tias e primos pelo amor e apoio durante toda a vida.

Aos meus amigos de Goiânia, Jean Carlo, Lorena Cintra, Rafaella Tavares, Rosana D'arc, Lucas Breseghelo, Juliana Cardoso, Bárbara Dunk, Ramon Amaral, Fernando Sá que me apoiaram em me mudar de cidade para realizar meus objetivos de vida. Pela ótima amizade e carinho.

Às pessoas que passaram por minha vida durante a realização do meu mestrado, me dando apoio, carinho e incentivando.

A **Jaqueline, Cláudia e Beatriz dos Santos** pela amizade, por acreditarem em mim e pelas visitas que me motivaram a seguir em frente.

À professora Dr^a **Renata Mazzaro** e Dr. **Marcos Fernandes** pela amizade e por me apoiarem a vir para Ribeirão fazer o mestrado.

Aos meus amigos de São Carlos, pelo ótimo ano que convivemos juntos.

A **Sarah Blima**, pela amizade e apoio nos momentos bons e ruins.

À **Micheline Moraes e família** pela amizade e carinho.

Aos meus conterrâneos goianos que estão fazendo pós em Ribeirão Preto e que em muitos momentos compartilham da saudade de casa ajudando uns aos outros.

À Maria de Carmen (**Menchu**), **Elena Montañes**, **Teresa Cañas** e **Gaello Taupiac** pela amizade, atenção e carinho durante meu período em Cincinnati. Pessoas que ficaram marcadas em minha vida apesar do pouco tempo juntos.

Ao meu grande amigo **Wagner Reis** (Waguinho), pela ótima amizade e por acreditar em mim.

Às minhas cunhadas **Dalyla** e **Juliana** pelo amor e carinho que me fazem muito feliz.

À **Nayara Pestana**, pelo amor, companheirismo, carinho e por me fazer tão feliz me dando força para nunca desistir.

Às entidades de fomento **CAPES, CNPQ, FAPESP, NIH, Cincinnati Childrens Hospital Medical Center e University of Cincinnati** pelo financiamento.

SUMÁRIO

RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO.....	20
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL	24
1.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL EM MODELOS DE ELT.....	28
1.3. AMÍGDALA.....	30
1.4. HIPOCAMPO.....	33
2. DEFINIÇÃO DO PROBLEMA (JUSTIFICATIVA) E HIPÓTESE	42
OBJETIVOS GERAIS.....	45
3. OBJETIVOS GERAIS.....	46
MATERIAS E MÉTODOS	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTE DE ELETRODOS	49
4.2. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA AMÍGDALA	50
4.3. INDUÇÃO DE <i>STATUS EPILEPTICUS</i>	50
4.4. PERFUSÃO DOS ANIMAIS	51
4.5. PÓS-FIXAÇÃO E CONGELAMENTO DOS CÉREBROS	51
4.6. CORTES DOS CÉREBROS EM CRIOSTATO	52
4.7. DROGAS	52
4.8. VISUALIZAÇÃO, AQUISIÇÃO DE IMAGENS E ANÁLISE DAS HISTOLOGIAS	53
CAPÍTULO 1 - A SUPERATIVIDADE LEVA A MORTE?	54
5. CAPÍTULO 1- A SUPERATATIVIDADE LEVA A MORTE?	55
5.1. EXPRESSÃO DE FOS.....	55
6. MORTE NEURONAL.....	57
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
8. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61

8.1. ENSAIO IMUNOHISTOQUÍMICO	61
8.1.1. IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	61
8.2. HISTOQUÍMICAS.....	62
8.2.1. NISSL	62
8.2.2. FLUOROJADE C.....	63
8.2.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	64
<u>9. RESULTADOS.....</u>	<u>65</u>
9.1. EXPRESSÃO DE C-FOS.....	66
9.2. DISCUSSÃO.....	71
9.3. RESULTADOS NEURODEGENERAÇÃO	75
9.4. DISCUSSÃO.....	81
<u>10. CONCLUSÕES</u>	<u>86</u>
<u>CAPÍTULO 2 – UM NOVO COMEÇO - NEUROGÊNESE</u>	<u>88</u>
<u>11. UM NOVO COMEÇO - NEUROGÊNESE</u>	<u>89</u>
11.1. MARCADORES DE NEUROGÊNESE.....	97
<u>12. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	<u>99</u>
<u>13. MATERIAIS E MÉTODOS.....</u>	<u>100</u>
13.1. IMUNOFLOURESCÊNCIAS.....	100
13.2. IMUNOHISTOQUÍMICAS COM DAB	101
13.3. CONTAGEM DAS CÉLULAS.....	102
13.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	102
<u>14. RESULTADOS.....</u>	<u>103</u>
14.1. PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	103
14.1.1. GRUPO 3 HORAS APÓS SE	103
14.1.2. GRUPO 24 HORAS APÓS SE.....	108
14.2. NEUROGÊNESE	112
14.3. CÉLULAS GRANULARES ECTÓPICAS	119
<u>15. DISCUSSÃO.....</u>	<u>125</u>
15.1. PROLIFERAÇÃO CELULAR NA CAMADA SUBGRANULAR.....	125
15.2. NEUROGÊNESE	127
15.3. CÉLULAS GRANULARES ECTÓPICAS	130
<u>16. CONCLUSÕES</u>	<u>132</u>
<u>17. INTRODUÇÃO</u>	<u>135</u>

18. OBJETIVOS.....	137
18.1. OBJETIVO GERAL	137
18.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	137
19. MATERIAIS E MÉTODOS.....	138
19.1. ANIMAIS.....	138
19.2. INJEÇÃO DE BRDU E PILOCARPINA	138
19.3. PERFUSÃO.....	139
19.4. DESENHO EXPERIMENTAL.....	140
19.5. PÓS-FIXAÇÃO E CONGELAMENTO DOS CÉREBROS.....	141
19.6. IMUNOHISTOQUÍMICAS.....	141
19.7. MICROSCOPIA CONFOCAL	141
19.8. RECONSTRUÇÃO	142
19.9. CONTAGEM DE ESPINHOS DENDRÍTICOS	143
19.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	143
20. RESULTADOS.....	144
20.1. CÉLULAS GRANULARES MADURAS EXPOSTAS AO SE	147
20.1.1. ESTRUTURA DENDRÍTICA	147
20.1.2. ESPINHOS DENDRÍTICOS.....	151
20.2. CÉLULAS GRANULARES IMATURAS EXPOSTAS AO SE	154
20.2.1. ESTRUTURA DENDRÍTICA	154
20.2.1. ESPINHOS DENDRÍTICOS.....	158
21. DISCUSSÃO.....	161
21.1. MUDANÇAS PLÁSTICAS NAS CÉLULAS GRANULARES IMATURAS EXPOSTAS AO SE	
162	
22. CONCLUSÕES	165
23. NEUROPLASTICIDADE E EPILEPSIA.....	166
24. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170
<u>VAN GROEN T, MIETTINEN P, KADISH I.(2003). THE ENTORHINAL CORTEX OF THE MOUSE: ORGANIZATION OF THE PROJECTION TO THE HIPPOCAMPAL FORMATION. HIPPOCAMPUS. 2003;13(1):133-49.</u>	<u>194</u>

Lista de Figuras

- Figura 1. Circuitaria básica do complexo amigdalóide em ratos mostrando os núcleos lateral (NL ou L), basal (NB ou B) e acessório basal (NAB ou BA) como os principais núcleos de entrada de estímulos no complexo amigdalóide e o núcleo central (NCA ou CE) como o principal núcleo de saída. Barra de calibração 1 mm (Pitkänen *et al.*, 1997).....32
- Figura 2. Dissecção de hipocampo humano sendo comparado com um cavalo marinho (*Hippocampus leiria*) devido à sua forma. Figura retirada do Livro “*The Hippocampus Book*”, Anderson *et al.*, 2007. (Cortesia do Professor Laszlo Seress, *University of Pecs*).34
- Figura 3. Esquema mostrando os principais componentes da formação hipocampal e as vias de entrada e entre as áreas hipocampais (via trisináptica) (Deng *et al.*, 2008).....35
- Figura 4. Esquema representando as subdivisões da camada molecular do giro denteado e as principais aferências. IML, camada molecular interna, MML, camada molecular média e OML, camada molecular externa. (Murphy *et al.*, 2011).37
- Figura 5. Esquema mostrando os principais componentes do hipocampo e as vias de entrada e saída de informação, evidenciando CA 1 e CA3. (Harry & d’Hellencourt, 2004).39
- Figura 6. Principais vias aferentes e eferentes da formação hipocampal. (Neves *et al.*, 2008).....40
- Figura 7. Índice comportamental durante SEAS dos animais eletricamente estimulados na amígdala basolateral esquerda, representando a diferença entre as gravidades de crises nos dois grupos de animais estudados (Tilelli *et al.*, 2005).42
- Figura 8. Registro eletrencefalográfico durante SEAS dos animais eletricamente estimulados na amígdala basolateral esquerda, representando a diferença entre as gravidades de crises nos dois grupos de animais estudados (Tilelli *et al.*, 2005).43
- Figura 9. Desenho experimental resumindo as principais etapas de manuseio dos animais, executados pela doutoranda Cristiane Q. Tilelli, 2003.51
- Figura 10. Imunofluorescência para c-Fos mostrando áreas corticais ativadas 3 horas após indução de SE. Podemos notar que na primeira coluna (A, B, C e D) mostrando os animais que sofreram SE tipo I, o mais grave, a marcação para c-Fos foi maior e mais forte (estatisticamente diferente para amígdala e neocórtex, A e B), podendo ser vista em ambos os hemisférios cerebrais, contra e ipsilaterais a estimulação. Já nas outras colunas estão os lados ipsi (A’, B’, C’ e D’) e contra-lateral (A”, B”, C” e D”), dos animais que sofreram SE tipo II mais brando, mostrando assim que o lado estimulado está mais ativado que o lado contralateral (A- Amígdala, B- Neocórtex, C- Córtex Entorrinal e D- Córtex Piriforme). Aumento de 100 vezes e barra de calibração 100 μ m.67
- Figura 11. Áreas cerebrais ativadas após estimulação elétrica do complexo amigdalóide. A expressão de c-Fos na amígdala em ambos os hemisférios cerebrais se mostrou estatisticamente diferente nos animais que apresentaram comportamentos mais graves de crise do que em relação aqueles com índice de gravidade de crise mais baixo. Amígdala, *** $p < 0.0001$; Student *t-test*.68
- Figura 12. Áreas cerebrais ativadas após estimulação elétrica do complexo amigdalóide. A expressão de c-Fos no neocórtex se mostrou estatisticamente diferente nos animais que apresentaram comportamentos mais graves de crise do que em relação aqueles com índice de gravidade de crise mais baixo, SE tipo II, * $p = 0.0390$, Student *t-test*.....68
- Figura 13. Imunofluorescência para Fos mostrando áreas hipocampais ativadas 3 horas após indução de SE. Podemos notar que na primeira coluna (A, B e C), que ilustra os animais que sofreram SE tipo I, o mais grave, sendo que nessa, a marcação para c-Fos foi maior e mais forte (não estatisticamente diferente). Já nas outras colunas estão os lados ipsi (A’, B’ e C’) e contra-lateral (A”, B” e C”), dos animais que sofreram SE tipo II mais brando, apresentando assim que o lado ipsi está mais ativado que o lado contralateral (A-Giro Denteado e *Hilus*, B-CA1, C-CA3). Aumento de 100 vezes e barra de calibração 100 μ m.70

Figura 14. Animais que sofreram SEAS mais grave (SE tipo I) apresentam maior neurodegeneração hipocampal FJC ⁺ em relação com aqueles que apresentaram índice de comportamento de crises mais baixo (SE tipo II). ** p=0.0092, Student <i>t-test</i>	76
Figura 15. Histoquímica para FluoroJade C, revelando células em processo de degeneração na formação hipocampal (A- CA1, B- Giro Denteado e C- CA3), podemos notar uma maior marcação na primeira (A, B e C) e segunda coluna (A', B' e C' - <i>zoom</i>), mostrando os animais que sofreram SE tipo I, mais grave. Já as colunas duas linhas (A'', B'' e C'') e três linhas (A''', B''' e C'''), estão mostrando os lados ípsi e contralateral, respectivamente, dos animais que sofreram SE tipo II, mais brando, onde podemos notar pouca marcação do lado estimulado e ausência de células marcadas no hemisfério contralateral a estimulação. Barra de calibração 100 µm, <i>zoom</i> 50 µm.	78
Figura 16. Imunofluorescência para marcador neuronal mostrando que animais controle juntamente com os animais que apresentaram comportamentos de crise mais brandos, apresentaram semelhante marcação de neurônios NeuN ⁺ no <i>hilus</i> (células NeuN ⁺), onde podemos ver um número significativo de células (A e B). No grupo de animais SE tipo I (C e D) podemos notar diminuição de neurônios marcados no <i>hilus</i> , revelando morte celular nessa região. Barra de calibração A: 100 µm; B, 20 µm; C, 100 µm e D, 50µm.....	80
Figura 17. Neurogênese na camada subventricular. (Ming & Song, 2011).	91
Figura 18. Detalhamento do processo de neurogênese na camada subgranular do giro denteado. (Ming & Song, 2011).....	93
Figura 19. Níveis hipocampais (AP - 2.64 mm; AP - 3.12 mm; AP - 4.44 mm; AP - 5.40 mm) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1996), selecionados para contar as células Ki-67 ⁺ e DCX ⁺ presentes na camada subgranular e granular do giro denteado.	102
Figura 20. A imunofluorescência para marcador de células em proliferação (Ki-67 ⁺ , vermelho) na camada subgranular do giro denteado de animais que foram sacrificados 3 horas após SE e animais controles. A dupla marcação com DAPI demonstra a expressão dessa proteína no núcleo das células mitose. Barra de calibração = 25 µm.	103
Figura 21. Na análise das células em proliferação, encontramos localização das células ki-67 ⁺ restritas a borda do <i>hilus</i> na camada subgranular (SGZ) do giro denteado. Barra de calibração = 15 µm.	104
Figura 22. Aumento significativo no número de células em proliferação (ki-67 ⁺), 3 horas após indução de SE, em comparação aos animais controles. p**0.001 ANOVA <i>Two-Way</i> aplicando <i>pós hoc</i> de <i>Bonferroni</i>	105
Figura 23. Aumento em porcentagem de células ki-67 ⁺ (250%), no grupo SE em comparação ao grupo controle.....	105
Figura 24. Diferença do número de células em proliferação para cada tipo de SE. Os dois tipos de SE foram significativamente maiores que o grupo controle. P*0.05; ANOVA <i>Two-Way</i> com <i>pós hoc</i> de <i>Bonferroni</i>	106
Figura 25. Podemos observar um aumento de 16% de células em proliferação no grupo que apresentou SE com crises mais grave.	107
Figura 26. Dados normalizados, mostrando aumento de 327% no número de células nos animais do grupo SE-I e 277% nos animais do grupo SE-II, em relação ao grupo controle.	107
Figura 27. Aumento significativo no número de células ki-67 ⁺ em proliferação, 24 horas após indução de SE, em relação ao grupo controle. P*** 0.001; ANOVA <i>Two-Way</i> com <i>pós hoc</i> de <i>Bonferroni</i>	108
Figura 28. No grupo de animais perfundidos 24 h após SE, a análise das células em proliferação, encontramos localização das células ki-67 ⁺ (vermelho) restrita a borda do <i>hilus</i> na camada subgranular (SGZ) do giro denteado. A marcação ortogonal revela a expressão restrita no núcleo das células em proliferação, co-localizando com marcador nuclear DAPI (azul). Barra de calibração = 15 µm.	109
Figura 29. Diferença do número de células em proliferação para cada tipo de SE. Os dois tipos de SE foram significativamente maiores que o grupo controle. P* 0.05; ANOVA <i>Two-Way</i> com <i>pós hoc</i> de <i>Bonferroni</i>	110

- Figura 30. Não houve diferença estatística e entre os animais SEAS nas duas janelas temporais estudadas ($p=0.10$, *Student t-test* e *ANOVA one-way*), embora todos os animais SEAS apresentaram diferença em relação aos animais controles.111
- Figura 31. A imunohistoquímica para DCX revelou aumento no número de novos neurônios granulares no GD de animais que sofreram status tipo I e tipo II, em comparação aos animais controle. Barra de calibração= 250 μm113
- Figura 32. Dias após SE, ocorre aumento significativo de novos neurônios hipocâmpais (DCX^+), na camada granular. $P^{***}0.001$; *ANOVA Two-Way* com *pós hoc* de *Bonferroni*.114
- Figura 33. Aumento significativo de novas células (DCX^+) no hipocampo em ambos os tipos de SE, quando comparado com o controle. Essa diferença estatística não foi vista entre os dois tipos de SE. $P^{***}0.001$; *ANOVA Two-Way* com *pós hoc* de *Bonferroni*.115
- Figura 34. Alguns neurônios DCX^+ (seta preta), nos animais SEAS apresentaram migração ectópica se inserindo no hilus do giro denteado. Barra de calibração = 100 μm116
- Figura 35. Neurônios DCX^+ de animais que sofreram SEAS, apresentaram formação de fino e longo dendrito basal (setas pretas) através do *hilus* 14 dias após SE. Barra de Calibração = 100 μm117
- Figura 36. Tripla marcação mostrando novos neurônios após SE, marcados com Tuj-1 (em vermelho), co-localizando com marcador de neurônios maduros NeuN (em verde) e marcador nuclear DAPI (em azul), setas brancas. Podemos visualizar a expressão da proteína Tuj-1 no soma e nos dendritos apicais dos novos neurônios granulares e a expressão da proteína NeuN nos núcleos dos novos neurônios. Barra de calibração = 150 e 100 μm118
- Figura 37. Os animais controle apresentaram marcação de células granulares (Prox-1, vermelho) restrita a camada de células granulares (GCL), com raras células encontradas no *hilus* ou na camada molecular (ML). As células marcadas com NeuN (verde) se co-localizam com neurônios Prox-1+, apenas na camada granular. Barra de Calibração = 100 μm119
- Figura 38. Os animais que sofreram SEAS apresentaram marcação para Prox-1 nas células presentes na camada granular e em várias células presentes no *hilus* (setas brancas). A maioria das células Prox-1+ (vermelho) presentes no *hilus* não colocalizaram com NeuN+ (verdes). Barra de calibração = 50 μm120
- Figura 39. Os animais que apresentaram SE tipo II, apresentaram menor perda neuronal (NeuN^+ verde) e poucas células granulares inseridas no *hilus* do giro denteado (Prox-1 vermelho, seta branca). Algumas células Prox-1+ estão presentes na camada molecular (seta branca), co-localizadas com NeuN imagem ortogonal. Barra de calibração = 20 μm121
- Figura 40. Os animais que sofreram crises mais graves apresentam dispersão das células da camada granular, inserção de neurônios granulares no *hilus* e na camada molecular do giro denteado (seta branca). Essas células apresentaram co-localização entre os marcadores de células granulares (Prox-1+ vermelho), neurônios maduros (NeuN^+ verde) e marcador para núcleos celulares DAPI (azul). Barra de calibração = 50.5 μm122
- Figura 41. Animais SE tipo I, apresentam dispersão das células da camada granular, inserção de neurônios granulares no *hilus* (seta branca). Algumas células apresentaram co-localização entre os marcadores de células granulares (Prox-1+ vermelho), neurônios maduros (NeuN^+ verde) e marcador para núcleos celulares DAPI (azul), seta branca e imagem ortogonal. Barra de calibração = 15 μm123
- Figura 42. Destaque para neurônio granular, expressando marcador de neurônios granular no núcleo da célula (Prox-1+ vermelho), co-localizando com marcador de neurônios maduros (NeuN^+ verde) e marcador de nuclear (DAPI azul). A co-localização é comprovada através da imagem ortogonal, demonstrando que ambas as marcações pertencem à mesma célula. Barra de calibração = 10 μm124
- Figura 43. Desenho experimental para grupo de animais que foram analisadas as células que estavam em estágio imaturo no momento que o animal sofreu o SE (células Imatura+SE).....140

Figura 44. Desenho experimental para grupo de animais que foram analisadas as células que estavam em estágio maduro no momento que o animal sofreu o SE (células Maduras+SE).	140
Figura 45. Imagem panorâmica da região hipocampal de camundongos submetidos ao SE por injeção sistêmica de PILO, mostrando células BrdU ⁺ (vermelho) e GFP ⁺ (verde). Células co-localizadas com BrdU ⁺ (vermelho), marcação nuclear utilizada para datar o dia de nascimento das células e células GFP ⁺ (verde) mostrando a morfologia das células.	145
Figura 46. Desenho experimental dos grupos utilizados.....	146
Figura 47. Reconstrução digital de neurônios maduros de animais controle e animais epilépticos. Não encontramos diferenças estatísticas na morfologia entre os dois grupos analisados. Barra = 500 µm.	148
Figura 48. Densidade de espinhos dendríticos reduzida em células com 12 semanas que os animais foram submetidos ao SE quando estavam com 8 semanas após nascimento (maduras). Podemos notar a redução da densidade dendrítica nas 3 subregiões da camada molecular (IML, MML, OML) nas células dos animais SE (azul) em relação às células controle (marrom). IML, p=0.006; MML, p=0.004; OML, p=0.044.	152
Figura 49. Imagens de confocal de dendritos nas camadas molecular interna (IML), média (MML) e externa (OML), usadas para reconstrução e contagem de espinhos dendríticos em células de 12 semanas, mostrando redução da densidade de espinhos nas três subregiões da camada molecular (IML, MML e OML). Barra de calibração = 10 µm.	153
Figura 50. Correlação entre área do soma e densidade de espinhos dendríticos encontrada nas subregiões da camada molecular. As células maduras (Mature+SE) apresentam relação direta entre a área do soma e densidade de espinhos, sugerindo que células menores apresentam menos densidade de espinhos.	154
Figura 51. Reconstrução digital de células imaturas submetidas ao SE, encontramos alterações na morfologia da árvore dendrítica apical (preto) e presença de dendritos basais (azul) e axônio (verde).	155
Figura 52. Mostrando que a densidade de espinhos dendríticos reduz em células com 5 semanas de animais que foram submetidos ao SE quando estas células estavam com 1 semana após nascimento (imaturas). Podemos notar a redução da densidade dendrítica nas 3 camadas da camada molecular (IML, MML, OML) nas células imaturas+SE (vermelho) em relação às células controle (verde). IML, ***p<0.001; MML, ***p<0.001; OML, **p=0.002; ANOVA two-way.....	159
Figura 53. Imagens de microcópico confocal de dendritos nas camadas molecular interna (IML), média (MML) e externa (OML), usadas para reconstrução e contagem de espinhos dendríticos em células de 5 semanas, mostrando redução da densidade de espinhos nas três subregiões da camada molecular (IML, MML e OML) de células expostas ao status epiléptico. Barra de calibração = 10 µm.	160

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Índice comportamental de crises límbicas de Racine (1972), modificado por Pinel e Rovner (1978). 28
- Tabela 2. Escala Arbitrária Semi-quantitativa de células marcadas FluoroJade C (FJC⁺) e c-Fos⁺, validada por 3 observadores cegos aos grupos experimentais analisados (VRS, OWC e CQT). 64
- Tabela 3. Mapeamento de c-Fos e FJC nos diferentes tipos de SE tipo I (Típico) e SE tipo II (Ambulatório). Podemos observar que todas as áreas estudadas apresentaram certo grau de ativação e neurodegeneração, com tendências de valores maiores para SE tipo I em comparação com SE tipo II. O * representa áreas estatisticamente diferentes de acordo com *Student t-test* (*p<0.05). 76
- Tabela 4. Distribuição qualitativa na expressão de c-Fos nos dois tipos de SE, mostrando uma predominância de marcação bilateral no grupo SE I (XX) e unilateral SE II (X). Observe a distribuição de células FJC⁺ bilateral (XX) nos animais SE tipo I, unilateralmente (X) e ausência de morte neuronal (ϕ) nas áreas estudadas dos animais tipo II. 77
- Tabela 5. Os valores são correspondentes as médias \pm SEM ou medianas. 150
- Tabela 6. Os valores são médias \pm SEM ou medianas; *P<0.05, **P<0.01; ANOVA *two-way*. Os valores significativos estão destacados em negrito. 157

Lista de Abreviações e siglas

- (AC) Ácido Caínico.
(AHA) Área Amígdala-Hipocampal.
(AHA) *Hippocampal Amygdala Área*.
(Amg) Amígdala.
(BA ou NAB) Núcleo Acessório Basal.
(B ou NBA) Núcleo Basal da Amígdala
(CAmg) Complexo Amigdalóide.
(CA) Corno de Ammon.
(CA1) Corno de Ammon 1.
(CA2) Corno de Ammon 2.
(CA3) Corno de Ammon 3.
(CAmg) Complexo Amigdalóide.
(CB) Calbindina.
(CeA ou NCA) Núcleo Central da Amígdala.
(CEnt) Córtex Entorrinal.
(CPiri) Córtex Piriforme.
(CR) Calretinina.
(CRE) Crises Recorrentes Espontâneas.
(CS) Colaterais de Schaffer.
(DCX) *Doublecortin*.
(DCX⁺) Neurônios *doublecortin* positivos
(DGC) Camada Granular do Giro Denteado.
(EC) *Entorhinal Córtex*.
(EEG) Eletrencefalograma.
(ELT) Epilepsia de Lobo Temporal.
(EH) Esclerose Hipocampal.
(FJC) FluoroJade C.
(GABA) Àcido Gama Amino-butírico.
(GAD) Glutamato Descarboxilase.
(GCL) *Granular Cell Layer*.
(GEPR) *Genetically Epilepsy-Prone Rat*
(GD) Giro Denteado.
(GFAP) *Glial Fibrillar Acid Protein*.
(GFP) *Green Fluorescent Protein*.
(Hipo) Hipocampo.
(IEG) *Immediate early genes*.
(IEG) genes de início imediato.
(IML) *Inner Molecular Layer*.
(IML) Camada Molecular Interna.
(L ou NLA) Núcleo Lateral da Amígdala.
(MF) *Mossy Fiber*.
(ML) Camada Molecular do GD.
(MML) *Médium Molecular Layer*.
(MML) Camada Molecular Média.
(NeuN) *Neuronal Nuclei*.
(NPY) Neuropeptídeo Y.
(OML) *Outer Molecular Layer*.
(OML) Camada Molecular Externa.
(PV) Parvalbumina.
(PILO) Pilocarpina.
(PP) *Perforant Pathway*.
(RMS) *Rostral Migratory Stream*.
(SE) *Status Epilepticus*.
(SG) *stratum glomerulare*.
(SGZ) *Subgranular zone*.
(SL) *stratum lucidum*.
(SLM) *stratum lucidum moleculare*.
(SM) *stratum moleculare*.
(SNC) Sistema Nervoso Central.
(SO) *stratum oriens*.
(SR) *stratum radiatum*.
(SST) Somatostatina.
(SVZ) *Subventricular zone*.
(Tuj-1) β -Tubulina III.
(VP) Via Perfurante.
(WAR) *Wistar Audiogenic Rat*.

Resumo

As epilepsias acometem entre 1-2% da população mundial. De um modo geral, de todas as epilepsias quase um terço deste total de pacientes apresenta a síndrome epiléptica conhecida como Epilepsia de Lobo Temporal (ELT), a qual se instala geralmente após um insulto inicial ou em decorrência de outras patologias como, por exemplo, trauma ou tumor, e parece ser decorrente de anormalidades intrínsecas do lobo temporal tais como, amígdala, hipocampo e córtex piriforme. Depois de um período de latência variado, promove o surgimento de crises convulsivas. Dentre os pacientes que apresentam ELT, cerca de 20 a 30% deles apresentam resistência ao tratamento farmacológico.

Para melhor estudar os processos plásticos envolvidos no processo de epileptogênese ocorridos após a instalação do insulto inicial que levam ao aparecimento de crises recorrentes espontâneas, ratos Wistar foram eletricamente estimulados na amígdala para indução de *Status Epilepticus* (SE). Foram feitas histoquímicas e imunohistoquímica para marcar neurônios ativados (c-Fos⁺), novos neurônios (*Doublecortin* – DCX⁺) e em degeneração (FluoroJade C - FJC⁺) após as crises.

Após a indução do SE observamos que quanto mais graves as crises, maior o número de áreas ativadas (c-Fos⁺) e maior número de neurônios em degeneração (FJC⁺). Além disso, não houve associação direta entre as áreas cerebrais ativadas e grau de neurodegeneração, nem associação entre gravidade do SE e intensidade de neurogênese (DCX).

A segunda fase deste projeto, executada na *University of Cincinnati*, refere-se ao estudo do impacto do SE, induzido por pilocarpina (PILO) sistêmica, sobre a neurogênese hipocampal. Utilizando a injeção de BrdU, para marcar o dia do nascimento de novos neurônios granulares, em camundongos *Thy1-GFP* foram submetidos ao SE por PILO. Foram analisadas a plasticidade dendrítica de neurônios granulares em fase de maturação (imaturas, 1 semana) e maduras (8 semanas). As células imaturas sofreram drásticas modificações na sua morfologia e na densidade dendrítica. Por outro lado, as células maduras não sofreram alterações morfológicas na árvore dendrítica, mas apresentaram uma intensa redução na densidade dos espinhos dendríticos, mostrando assim que as células imaturas estão mais susceptíveis ao impacto das crises epilépticas.

Palavras-chaves: 1- ELT 2- Neuroplasticidade 3-Neurodegeneração 4- Neurogênese.

Abstract

The epilepsies affect between 1-2% of the world. In general, all epilepsies almost a third of total patients had an epilepsy syndrome known as temporal lobe epilepsy (TLE), which usually settles after the initial insult or due to other pathologies such as, for example, trauma or tumor, and seems to be due to intrinsic abnormalities such as temporal lobe, amygdala, hippocampus and piriform cortex. After latency period varied, promotes the emergence of seizures. Among the patients with TLE, about 20 to 30% of them are resistant to pharmacological treatment.

To better study the processes involved in plastic epileptogenesis occurred after the installation of the initial insult leading to the appearance of spontaneous recurrent seizures, rats were electrically stimulated in the amygdala to induce *status epilepticus* (SE). Histochemical and immunohistochemistry were done to mark neurons activated (c-Fos⁺), newborn neurons (Doublecortin - DCX⁺) and degenerating (FluoroJade C - FJC⁺) after the crisis.

After SE induction observed that the more serious crises, the greater the number of activated areas (c-Fos⁺) and greater number of degenerating neurons (FJC⁺). In addition, there was no direct association between the brain areas activated and the degree of neurodegeneration, or association between the severity and intensity of the SE of neurogenesis (DCX⁺).

The second phase of this project, performed at the University of Cincinnati, refers to study the impact of SE induced by pilocarpine (Pilo) system on hippocampal neurogenesis. Using the injection of BrdU, to label the daybirth of new granule neurons in *Thy1-GFP* mice subjected to SE. We analyzed the dendritic plasticity of granule neurons undergoing maturation (immature, 1 week) and mature (8 weeks). The immature cells have undergone drastic changes in their dendritic morphology and density. On the other hand, the mature cells did not undergo morphological changes in dendritic tree but showed a marked decrease in the density of dendritic spines, thus showing that immature cells are more susceptible to the impact of epileptic seizures.

Key-words: 1- TLE 2- Neuroplasticity 3-Neurodegeneration 4- Neurogenesis

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A palavra epilepsia é derivada do verbo grego “*epilavainem*”, que significa “ser tomado ou dominado”. Esse significado reflete uma antiga, mas duradoura idéia sobre as epilepsias, como em outras doenças, ela ocorreria como resultado de ação de deuses ou espíritos, frequentemente associados à punição. Cerca de 400 anos a.C., a epilepsia era considerada como “doença sagrada” por se acreditar na relação entre as crises e possessões demoníacas ou benção de deuses. Nessa mesma época, escrituras gregas, tradicionalmente associadas a Hipocrates, transmitem com clareza o conceito de que a epilepsia era “uma doença decorrente do cérebro e deveria ser tratada pela dieta e drogas e não encantos religiosos” (Yacubian, 2000; Scharfman & Pedley, 2006).

Os primeiros estudos que associaram a epilepsia como desordem neurológica decorrente da disfunção cerebral, datam somente do final do século 19, quando John H. Jackson primeiro definiu biologicamente epilepsia como “uma ocasional, excessiva e desordenada descarga do tecido neural”. Jackson também foi o primeiro a propor que as diferentes manifestações clínicas das crises, eram resultados de específicas áreas cerebrais que se tornavam corrompidas pelas “descargas desordenadas” do tecido nervoso (Scharfman & Pedley, 2006).

Nos dias atuais, as epilepsias são definidas como descargas paroxísticas anormais de neurônios cerebrais em processos que afetam a excitabilidade cortical e do encéfalo como um todo e se caracterizam pela ocorrência periódica de crises epilépticas, que podem ser convulsivas ou não (Lothman *et al.*, 1991; McNamara, 1994; 1999). Também podem ser definidas como, condição neurológica crônica caracterizada por crises espontâneas recorrentes (Engel, 1995). Atualmente as epilepsias são consideradas geneticamente transmitidas (epilepsias idiopáticas ou primárias) ou podem ser conseqüências de distúrbios ou insultos cerebrais específicos (epilepsias sintomáticas ou secundárias). Tais insultos podem ser: febre, infecção ou até mesmo hipóxia durante a gestação (Engel, 2001).

No decorrer da história a classificação das epilepsias tem sido discutida e redefinida (Engel, 2001). Crise é uma manifestação comportamental anormal, desordenada, espontânea e sincrônica de populações neuronais disparando em alta freqüência no sistema nervoso central. (Lothman *et al.*, 1991; McNamara, 1994, 1999; DeLorenzo, 2005). Pode ser também definida como, eventos paroxísticos tempo-

limitados que resultam de descargas rítmicas neuronais involuntárias anormais no cérebro. Exceto nos casos de epilepsias reflexas, as crises são eventos imprevisíveis que podem ocorrer em momentos inconvenientes, embaraçosos e até mesmo perigosos como no caso de pessoas quando estão dirigindo. Crises são geralmente curtas, durando menos que 5 minutos e podem ser seguidas de uma longa fase pós-ictal, durante a qual há um retorno gradual à linha de base. As crises geralmente terminam espontaneamente sem intervenção. Outros termos podem ser encontrados na literatura como convulsão, ictos, ataque e acesso. As convulsões geralmente descrevem as contrações musculares que podem ocorrer durante alguns tipos de crises, mas nem todas as crises são convulsivas e nem todas as convulsões são crises epiléticas (ex. *syncopal convulsion*) (Shnecker & Fountain, 2003). Epileptogênese é o conjunto de alterações plásticas sofridas pelo cérebro que tornam o cérebro normal em epilético (McNamara, 2006).

Atualmente, segundo a *International League Against Epilepsy* (ILAE), as crises epiléticas podem ser divididas em dois grupos; crises parciais ou generalizadas (ILAE Commission, 1981). As crises epiléticas parciais são aquelas com início em parte de um hemisfério cerebral, assim, essas crises apresentam a ativação de um sistema neuronal limitado, sendo que esse tipo de crise pode se generalizar envolvendo áreas do córtex temporal, como amígdala e hipocampo, prejudicando, desta forma, a memória e a consciência do indivíduo. Estas crises são divididas em simples, quando não ocorre perda da consciência, ou complexas, quando o indivíduo apresenta perda da consciência. As crises generalizadas são aquelas que envolvem ambos os hemisférios cerebrais e podem ser divididas de acordo com os eventos presentes: (i) eventos convulsivos, incluindo convulsão tônico-clônica, bem como convulsões puramente tônicas ou puramente clônicas e (ii) eventos não convulsivos, os quais incluem crises típicas e atípicas de ausência, crises mioclônicas, crises atônicas e breves crises tônicas (Engel, 1995). Nas crises generalizadas, acredita-se que todo o córtex participa do evento desde o início da crise, sendo assim, o comportamento do indivíduo é totalmente modificado e a consciência perdida (McNamara, 1994; 1999). Ambos os tipos de epilepsias podem ser assintomáticas, sem etiologias definidas, ou sintomáticas, com etiologia definida (Engel, 2001).

A epilepsia é uma doença caracterizada por crises recorrentes espontâneas (Engel, 1995; McNamara, 1999; Shnecker & Fountain, 2003). Crises epiléticas e epilepsia são diferentes manifestações e não devem ser usados alternadamente para expressar o mesmo sentido. Crises são sintomas, considerando que epilepsia é uma doença

caracterizada por crises recorrentes. Crises podem resultar de alterações temporárias do metabolismo cerebral, como ocorre na hipoglicemia, insulto neuronal agudo, drogas ou febre e em outras condições que podem provocar crise no cérebro normal (Shnecker & Fountain, 2003). Síndromes epiléticas são definidas por vários fatores, incluindo o tipo de crise, idade na qual começaram as crises, históricos familiares e achados em exames físicos como eletroencefalogramas (EEG) nos períodos ictal e inter-ictal e exames de neuroimagem (ILAE Commission, 1989).

Crises são mais comuns do que geralmente se tem conhecimento: aproximadamente 10 % da população terão pelo menos uma crise durante a vida (Hauser *et al.*, 1996; Shnecker & Fountain, 2003). No entanto, crises generalizadas são mais comuns em crianças e crises parciais acontecem mais em adultos (Shnecker & Fountain, 2003).

Quaisquer processos que causem alterações estruturais (macroscópicas ou microscópicas) ou funcionais que alterem o funcionamento normal dos neurônios cerebrais podem predispor às epilepsias. Foco epilético pode ser constituído de um agregado de células disparando anormalmente, desenvolvido por uma lesão física ou por algum mecanismo desconhecido, nesses casos são conhecidas como epilepsias idiopáticas (Sloviter, 1987). A atividade excitatória neuronal originada do foco epilético espalha para outras regiões cerebrais, podendo ficar restrita no mesmo hemisfério cerebral do foco (crises parciais) ou pode recrutar áreas cerebrais do hemisfério contralateral (crises generalizadas) (McNamara, 1994; Engel, 2001). Estudos populacionais mostraram que 68% dos casos de epilepsia são de causas desconhecidas e podem ocorrer devido a alguma causa remota sintomática, como por exemplo, 31% devido a alguma lesão cerebral anterior. Entre essas causas remotas presume-se que a epilepsia ocorre devido às doenças cérebro-vasculares em 13,2% dos pacientes, tumor cerebral em 3,6% dos pacientes, infecção em 2,6% dos casos, processos neurodegenerativos em 1,8% e devido a outras causas em 5% dos pacientes (Hauser *et al.*, 1991, 1993 e 1996; Shnecker & Fountain, 2003).

As epilepsias acometem entre 1-2% da população mundial (McNamara, 1999). De um modo geral, de todas as epilepsias quase um terço deste total de pacientes apresenta a síndrome epilética conhecida como Epilepsia de Lobo Temporal (ELT). Esta última se instala geralmente após um insulto inicial ou em decorrência de outras patologias como, por exemplo, trauma ou tumor, e parece ser decorrente de anormalidades intrínsecas em estruturas do lobo temporal tais como, amígdala, hipocampo e córtex piriforme. Dentre os pacientes que apresentam ELT, cerca de 20 a 30% deles apresentam resistência ao tratamento farmacológico (Baker *et al.*, 1993).

1.1. Epilepsia do lobo temporal

A ELT tem como principais características a ocorrência de crises epiléticas que se iniciam em estruturas do lobo temporal como hipocampo, complexo amigdalóide e adjacências (Lothman *et al.*, 1991; Hudson *et al.*, 1993; Bertram, 1997; Sloviter, 1999; Schwabe *et al.*, 2000), a ocorrência de um insulto inicial que precede o aparecimento da ELT (Mathern *et al.*, 2002), após esse insulto inicial segue um período de latência variado, promovendo o surgimento de crises convulsivas (McNamara, 1999). Este é o tipo mais comum de epilepsia e caracteriza-se por crises focais que podem ou não evoluir para generalização secundária (Shorvon, 1990), com fenômenos motores, dificultando a integração do indivíduo com a sociedade. A sua origem pode estar ligada a uma anomalia cerebral ou a uma patologia atual ativa, tal como, derrame ou tumor cerebral. O aumento da excitabilidade do tecido nervoso tem sido associado a anormalidades neuroquímicas, tais como aumento de neurotransmissores excitatórios e/ou da redução de neurotransmissores inibitórios, ou ainda a ambos os mecanismos (Meldrum, 1984; 1991).

Epilepsias adquiridas que começam com um insulto epileptogênico inicial, requerem um tempo indefinido para se desenvolverem. O período no qual esse insulto inicial dá origem a processos que levam à condição de crises espontâneas é referido como período latente. Durante esse período os vários eventos plásticos que tornam o cérebro normal em epilético, apresentando várias crises recorrentes, recebe o nome de epileptogênese (McNamara *et al.*, 2003). Pode ser definida também como o conjunto de alterações estruturais, neuroquímicas e de conexão entre neurônios que ocorre desde algum insulto inicial até o surgimento das crises espontâneas (Leite *et al.*, 1990). Dentre as alterações fisiopatológicas ocorridas, podemos ressaltar algumas como morte seletiva de células hipocampais (Turski *et al.*, 1989; Cavalheiro *et al.*, 1991; Furtado *et al.*, 2002; Castro *et al.* 2011), brotamento de colaterais das fibras musgosas (Mello *et al.*, 1993), dispersão de células granulares (Mello *et al.*, 1993), aumento de células granulares ectópicas no *hilus* (Parent *et al.*, 1997) e neurogênese (Parent *et al.*, 1997). Esses processos parecem promover mudanças na circuitaria do lobo temporal promovendo descargas hipersincrônicas espontâneas que através do tempo recrutam outras áreas límbicas e estruturas distantes do processo epileptogênico. Algum tempo depois, podendo variar de dias a anos, crises recorrentes espontâneas (CRE) podem

surgir. Essa hipótese de mecanismo epileptogênico tem sido modelada em animais usando agentes ou técnicas que causem similares alterações hipocampais, tais como injeção de ácido caínico (AC), pilocarpina (PILO) e *Status Epilepticus* auto-sustentando (SEAS) por estimulação elétrica de áreas cerebrais específicas (Lothman *et al.*, 1989; VanLandingham & Lothman, 1991; Handforth & Ackerman, 1993; Nissinen *et al.*, 2000; Tilelli *et al.*, 2005).

A possibilidade de reproduzir doenças humanas em modelos animais representa uma grande vantagem para a medicina experimental moderna é cada vez mais frequente nos dias de hoje. Para melhor entender os eventos que levam ao surgimento de crises recorrentes espontâneas, modelos experimentais de epilepsia têm dado grande contribuição no estudo da ELT. Existem várias classificações para os modelos experimentais que de maneira geral podem ser subdivididos em modelos *in vitro* (fatias cerebrais, culturas dissociadas ou organotípicas) e *in vivo* (animais de experimentação), que também podem ser agudos ou crônicos. Os modelos experimentais também podem diferir de acordo com os mecanismos de indução de crises podendo ser farmacológicos ou químicos, por estimulação elétrica (por exemplo: eletrochoque e abrasamento), e manipulação ou seleção genética (Fisher, 1989; Pitkanen, 2006).

Os modelos audiogênicos em roedores são baseados em linhagens de animais selecionados, como WAR (*Wistar Audiogenic Rat*) e GEPR (*Genetically Epilepsy-Prone Rat*), por sua resposta convulsiva ao estímulo sonoro (Doretto *et al.*, 2003; Ross & Coleman, 2000). As convulsões audiogênicas agudas são utilizadas como modelo experimental de epilepsia tônico-clônica generalizada.

O abrasamento (*kindling*) é o método de indução de crises epiléticas baseado na ativação repetida e periódica de vias neurais definidas, geralmente límbicas (Goddard, 1967; Goddard *et al.*, 1969). A ativação pode ser realizada por estímulos elétricos, químicos ou sensoriais. Neste processo realiza-se um estímulo sub-convulsivante e o processo de repetição leva a respostas progressivamente mais graves, culminando na emergência das crises generalizadas (Racine, 1972). Devido a esta característica de promover uma diminuição do limiar convulsivo, o abrasamento é referido como um modelo de epileptogênese e crises crônicas. As estruturas do sistema límbico estão entre as mais susceptíveis ao abrasamento (Gilbert, 2001). O abrasamento audiogênico é um modelo para o estudo das interações comportamentais, eletrencefalográficas e moleculares que ocorrem entre a circuitaria mesencefálica epilética e estruturas límbicas durante o processo de epileptogênese secundária nessas últimas áreas

(Marescaux *et al.*, 1987; Naritoku *et al.*, 1992; Garcia-Cairasco *et al.*, 1996; Moraes *et al.*, 2000; Romcy-Pereira & Garcia Cairasco, 2003; Galvis-Alonso *et al.*, 2004).

Na maioria dos pacientes com ELT, há evidente ocorrência de crises prolongadas ou SE, principalmente nos primeiros anos de vida (Lothman & Bertram, 1993). A definição de SE é controversa, segundo Sloviter (1999), o SE pode ser definido como o estado onde crises contínuas ocorrem por pelo menos 5 minutos, ou crises distintas ocorrem sem recuperação entre elas. Pode ser definida também como, fixa e duradoura condição epiléptica (Treiman, 1998). Entretanto, estudos com animais (Lemos & Cavalheiro, 1995) e em humanos (De Lorenzo *et al.*, 1999), indicam que nas crises convulsivas com duração de até 30 minutos não há evidência de seqüelas. Isto corrobora a definição mais comumente aceita de que um SE teria duração de 30 minutos ou mais (Lowenstein, 1999), assim podemos inferir que o dano neuronal está diretamente relacionado com a duração do SE (Lemos & Cavalheiro, 1995).

Após o SE ocorre um período latente (também chamado erroneamente na literatura de período silencioso) que pode variar entre dias a meses, em animais, chegando até anos em humanos. Este período, por sua vez, é seguido por uma fase na qual as crises epilépticas recorrentes espontâneas (CRE) aparecem (Leite *et al.*, 1990; Lothman & Bertram, 1993; Delgado-Escueta *et al.*, 1999; Sloviter, 1999).

A dificuldade inerente em estudar pacientes para o entendimento dos processos epileptogênicos, dá aos modelos experimentais animais um valor imensurável. Os modelos produzem tipos de alterações estruturais semelhantes à aquelas encontradas em tecidos humanos retirados de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento. Vários modelos experimentais farmacológicos ou químicos têm sido bem utilizados e de várias formas mimetizam alterações fisiopatológicas ocorridas em pacientes com ELT, por exemplo, a administração intraperitoneal ou intracranial de drogas que depois de injetadas produzem rapidamente crises agudas através da sua ação agonista de receptores excitatórios ou antagonistas de receptores inibitórios.

O AC é o análogo glutamatérgico mais comum utilizado para gerar crises agudas em modelos animais (McGeer *et al.*, 1978; Ben-Ari, 1985). Sua principal rota de administração é intraperitoneal, i.p. (Ben-Ari, 1985) e também pode ser injetado diretamente em estruturas cerebrais tais como hipocampo (Nadler *et al.*, 1978) e amígdala (Ben-Ari *et al.*, 1978). Esse modelo é amplamente aceito e utilizado graças à sua característica de causar um estado de epilepsia crônica produzido após um aparente período latente seguido do SE. Como principais estágios esse modelo apresenta uma

fase inicial caracterizada por crises severas agudas repetidas, SE, seguido de um período latente de dias ou semanas livre de crises e depois um desenvolvimento gradual e progressivo de CRE. Este estágio final geralmente é permanente e serve para definir a condição de epilepsia crônica (Dudek, 2006).

A PILO é outro agente farmacológico amplamente utilizado na tentativa de mimetizar eventos fisiopatológicos presentes na ELT (Turski *et al.*, 1989; Cavalheiro *et al.*, 1991; Furtado *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2011). Assim como na administração de ácido caínico a PILO leva rapidamente ao aparecimento de crises agudas caracterizadas por um duradouro SE associado com descargas eletrográficas sustentadas em estruturas límbicas (Tursky *et al.*, 1984). Logo após esse período agudo de crises os animais apresentam um período livre de crises e após dias ou semanas começam a apresentar CRE que tendem a aumentar a frequência com o tempo. A PILO é um agonista muscarínico, que induz um quadro semelhante a outros modelos de ELT no qual o SE é seguido de um período latente ausente de crises com aparente comportamento normal e sem alterações eletrográficas. Entender as alterações plásticas desenvolvidas durante o período latente que leva ao surgimento de CRE é de fundamental importância para tentar explicar o surgimento da condição crônica que é a ELT e assim estudar a implementação de medidas que evitem o aparecimento dessas crises (Leite *et al.*, 1991).

A indução do SE leva a uma ampla perda celular em várias áreas cerebrais e tem mimetizado várias alterações ocorridas na ELT humana (Turski *et al.*, 1984; Furtado *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2011). Outra maneira amplamente utilizada para gerar crises vem da estimulação elétrica de áreas cerebrais específicas podendo essas crises se manter auto-sustentadas após a remoção do estímulo (Lothman *et al.*, 1989; Nissinen *et al.*, 2000, Tilelli *et al.*, 2005). Entender quais mudanças são críticas para a transição de crises associadas ao estímulo elétrico para aquelas que se auto-sustentam após a retirada do estímulo pode nos ajudar a entender em qual ponto o SE se torna intratável e como o SE altera o cérebro de uma condição normal saudável para a condição epilética, levando às CRE.. As principais áreas límbicas utilizadas para estimulação elétrica são amígdala (Handforth & Ackermann, 1993; Lothman *et al.*, 1989; Nissinen *et al.*, 2000, Tilelli *et al.*, 2005), hipocampo (Lothman *et al.*, 1989) e via perfurante (Sloviter, 1987; 1991).

1.2. Análise comportamental em modelos de ELT

A descrição comportamental de crises epilépticas vem sendo há muito tempo estudada (Racine, 1972; Pinel & Rovner, 1978; Garcia Cairasco *et al.*, 1992). Foram criados índices baseados no comportamento que retratariam, de forma arbitrária, porém crescente, a gravidade de crises, inicialmente tipo abrasamento (Racine 1972 modificado por Pinel & Rovner, 1978). Estes índices foram paulatinamente adaptados para avaliação de SE (Leite *et al.*, 2002; Tilelli, 2003; Tilelli *et al.*, 2005; Castro, 2006; Castro *et al.*, 2011).

Tabela 1. Índice comportamental de crises límbicas de Racine (1972), modificado por Pinel e Rovner (1978).

Índice	Comportamento(s)
0	Imobilidade
1	Automatismos faciais
2	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonias de patas anteriores
4	Elevação sobre as patas posteriores
5	Elevação e queda
6	Várias classes 5 (>3)
7	Comportamentos anteriores + corrida
8	Comportamentos anteriores + corrida + convulsão tônico-clônica

O trabalho de Pinel & Rovner (1978) adiciona ao índice de severidade de crises sugerido por Racine (1972), como mostrado na Tabela 1, alguns eventos que passam a descrever comportamentos tipicamente evocados pela ativação de estruturas do sistema límbico e mesencefálico.

No trabalho de Tilelli, 2003 e posteriormente publicado Tilelli *et al.*, (2005), foi utilizado esse índice estabelecido por Pinel e Rovner (1978) para analisar a gravidade do SE e assim foi possível classificar os animais e dividir de acordo com os índices de gravidade de crise em dois grandes grupos. No grupo I, chamado de **SE tipo I ou**

Típico estão aqueles animais que apresentaram índices mais elevados de crise, permanecendo a maior parte do tempo nas classes 4 e 5, semelhante SE tipicamente visualizado em outros modelos como os de PILO ou CA, podendo progredir para classes 6 a 8. No grupo II, chamado de **SE tipo II ou Ambulatório**, estão os animais que não progrediram no índice de comportamento apresentando classes 1 ou 2. Esses últimos animais também apresentaram um comportamento deambulatório, no qual eles permaneciam a maior parte do tempo andando na caixa de registro durante o SE. O presente trabalho utiliza os mesmos animais produzidos pela Dra. Cristiane Q. Tilelli, durante a execução da sua Tese de Doutorado (veja detalhes em Tilelli, 2003 e Tilelli *et al.*, 2005).

1.3. Amígdala

O Lobo Temporal é composto pela Amígdala (Amg), Hipocampo (Hipo), Córtex Piriforme (CPiri), Córtex Entorrinal (CEnt) e córtices envolventes. Essas áreas são interconectadas por várias vias organizadas topograficamente as quais orquestram uma variedade de funções processadas pelo lobo temporal, incluindo a formação de memória e emoções (Amaral & Witter, 2004).

A amígdala, também chamada de Complexo Amigdalóide (CAmg), é uma heterogênea coleção de grupamentos de núcleos formada por mais de dez núcleos e áreas corticais adjacentes com diferentes características moleculares, cito-arquitetônicas, químicas e diferentes conexões, localizados no lobo temporal (Pitkanen *et al.*, 1997; Amaral & Witter, 2004). Uma variedade de funções tem sido atribuída à amígdala, incluindo memória, atenção, interpretação do significado emocional dos estímulos sensoriais, percepção dos movimentos corporais e geração dos aspectos emocionais dos sonhos (para revisão; Pitkanen *et al.*, 1997, LeDoux, 1998). Penfield & Jasper em 1954, demonstraram, através da estimulação da amígdala de pacientes durante cirurgia de ELT, o envolvimento da amígdala na sintomatologia das crises de lobo temporal. Assim o foco epiléptico poderia residir tanto no hipocampo quanto na amígdala ou em ambas as áreas (Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008; Pitkanen *et al.*, 1998). Alguns estudos utilizando neuroimagem têm demonstrado a presença de extensa neuropatologia envolvendo a amígdala em pacientes com epilepsia de lobo temporal (Salmenpera *et al.*, 2001, Pitkanen *et al.*, 1998). Em alguns casos clínicos, a resecção da amígdala sozinha é o suficiente para eliminar as crises (Wieser, 2000). Além do mais, a amígdala é o local de origem de crises em 7 a 13% das crises em pacientes com ELT ou é rapidamente recrutada em atividade de crises em 70% dos pacientes refratários às drogas (Spanedda *et al.*, 1997).

Estudos em modelos animais sugerem que a amígdala é ainda mais propícia a gerar atividades de crise do que o hipocampo, baseado no fato dela apresentar um dos mais baixos limiares para indução elétrica de crises e ao *kindling* (Goddard, 1967; Goddard *et al.*, 1969). Após administração de agentes convulsivantes, a amígdala exhibe rápido aumento da concentração de glutamato extracelular, sugerindo um prematuro envolvimento dessas no desenvolvimento, geração e propagação das crises (Lallement *et al.*, 1991).

Muito tem se especulado a respeito do verdadeiro papel da amígdala nas crises de pacientes com epilepsia de lobo temporal e são várias as hipóteses propostas. A amígdala recebe aferências de grandes áreas dos córtices frontal e temporal que poderiam gerar e propagar atividade de crises para amígdala vindas de focos localizados nessas áreas. Devido à grande densidade neuronal vista nos núcleos amigdalianos, a ativação de uma pequena porção de um núcleo poderia recrutar rapidamente um grande número de neurônios próximos, facilitando assim a propagação da atividade epiléptica. Projeções originadas na amígdala para regiões tais como o sistema extrapiramidal, córtex e hipocampo são mais amplas do que as provenientes dessas regiões. Da mesma maneira, essas vias de saída poderiam fornecer rotas pelas quais a amígdala rapidamente recrutaria outras áreas cerebrais e propagaria facilmente a atividade epileptiforme. Outro fator importante é que, em ratos as duas amígdalas estão diretamente interconectadas (mono-sinápticamente), o que explicaria a rápida ativação contralateral durante as crises (Savander *et al.*, 1997, Pitkanen *et al.*, 1998).

A anatomia da amígdala está intimamente associada às suas funções no desenvolvimento e propagação de crises, devido ao grande número de projeções recebidas por ela e enviadas às várias áreas cerebrais. Estudos utilizando traçadores neuronais em ratos e primatas mostraram que informação de diferentes áreas cerebrais entram no complexo amigdalóide através de núcleos específicos (Amaral *et al.*, 1992) O principal núcleo de entrada de informação na amígdala são os núcleos laterais, recebendo, por exemplo, conexões vindas do córtex sensorial e tálamo. Já projeções vindas do hipocampo e córtex frontal penetram pelos núcleos basais (Pitkanen *et al.*, 1998). Após entrar na amígdala pelos núcleos laterais ou basais, a informação pode trafegar para outros locais dentro da amígdala através de conexões intra-amigdalianas. Muitas comunicações dentro da amígdala são recíprocas: após a informação adentrar a amígdala pelos núcleos laterais, estes enviam projeções para os núcleos basais, acessório basal e córtex peri-amigdalóide que projetam de volta para os núcleos laterais (Pitkanen *et al.*, 1998). Alguns núcleos, tais como área amígdala-hipocampal e núcleo central, recebem projeções de vários núcleos internos da amígdala, mas não enviam significativo número de projeções de volta para outros núcleos dentro da amígdala. Dessa forma esses núcleos são considerados estações de saída da amígdala para outras áreas cerebrais (**Figura 1**).

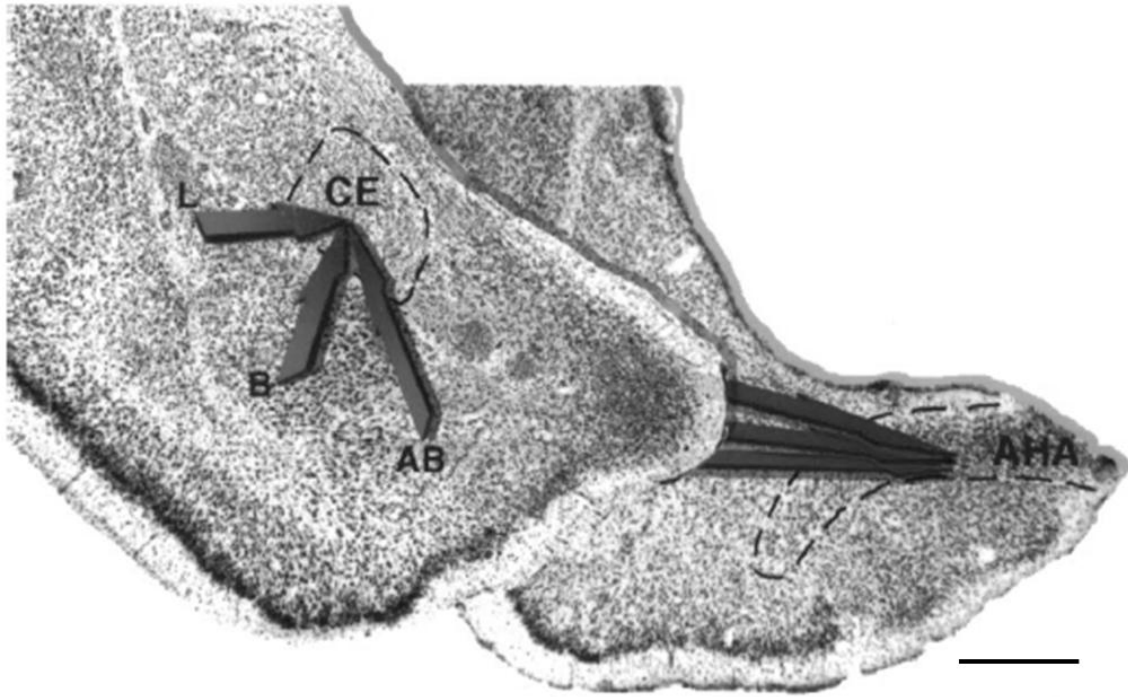


Figura 1. Circuitaria básica do complexo amígdaloide em ratos mostrando os núcleos lateral (NL ou L), basal (NB ou B) e acessório basal (NAB ou BA) como os principais núcleos de entrada de estímulos no complexo amígdaloide e o núcleo central (NCA ou CE) como o principal núcleo de saída. Barra de calibração 1 mm (Pitkänen *et al.*, 1997).

Dentre os vários núcleos que compõem a amígdala os basolaterais executam a mais importante função em iniciar e propagar crises (McDonald, 2003; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008). Alguns estudos demonstraram que mesmo em modelos animais, nos quais crises são evocadas em regiões extra-amígdalóides, a ativação dos núcleos basolaterais é primariamente responsável pela geração e propagação do SE (White & Price, 1993). Finalmente, uma prolongada estimulação elétrica da amígdala basolateral desencadeia mais rapidamente o SE, quando comparado à estimulação nos núcleos central e ou medial (Mohapel *et al.*, 1996; Aroniadou-Anderjaska *et al.*, 2008).

1.4. Hipocampo

Localizado profundamente dentro do Lobo Temporal Medial (LTM) no cérebro, existe um grupo de milhões de neurônios organizados em uma rede de maneira totalmente diferente daquela encontrada em qualquer outro lugar do sistema nervoso. É uma estrutura com formato de rocambole (*bulb-like shape*) projetando-se para os ventrículos laterais, e tem cativado anatomistas desde o Egito antigo, quando há registros das primeiras disseções (Anderson et al., 2002; Anderson *et al.*, 2007). Essa estrutura vem sendo estudada intensamente nas últimas décadas e são várias as razões pelas quais o hipocampo tem atraído interesse dos cientistas nas diversas áreas da neurociência. Uma surpreendente descoberta há aproximadamente 50 anos despertou ainda mais a curiosidade sobre essa estrutura. Durante o tratamento do paciente HM com epilepsia intratável, foram removidos os lobos temporais incluindo os hipocampos, lobectomia temporal bilateral. Após a cirurgia o paciente ficou livre das crises, mas como efeito colateral ficou incapaz de formar novas memórias explícitas, mas as lembranças anteriores à cirurgia foram mantidas, sem perder a capacidade de aprendizado, revelando assim uma relação direta dessa área com a formação de novas memórias (Scoville, 1954).

Outro fator importante, que justifica o grande interesse nessa região do cérebro é o seu envolvimento em patologias. A morte de neurônios hipocampais conhecida como Esclerose Hipocampal (EH), é um achado comum entre os pacientes com (ELT) (Olney, 1984). Bouchet e Cazauvieilh em 1825, foram os primeiros a observar atrofia hipocampal relacionada com esta patologia. A remoção do hipocampo esclerótico leva a um satisfatório controle das crises (Spencer *et al.*, 1993), em casos de epilepsias resistentes aos tratamentos farmacológicos.

O hipocampo faz parte de um conjunto de estruturas prosencefálicas conectado direta ou indiretamente com várias outras partes do encéfalo, seja através de aferências ou eferências e pode ser considerado um dos maiores centros do sistema límbico (Gloor, 1997; Amaral, 1992; Anderson *et al.*, 2007). O sistema límbico forma uma borda (*limbus*) em torno da extremidade anterior do tronco cerebral, do diencéfalo e corpo caloso do cérebro humano. Os principais componentes do sistema límbico são a formação hipocampal, os córtices límbicos associativos e o complexo amígdaloide. A amígdala juntamente com a formação hipocampal estão localizados na porção medial do lobo temporal, adjacente ao giro parahipocampal no cérebro humano.

A formação hipocampal foi primeiramente identificada e descrita pelo anatomista Arantius no século XVI. Foi assim denominada por sua semelhança com um cavalo marinho (hipocampo, em grego), (**Figura 2**), quando observada no assoalho das projeções temporais dos ventrículos laterais do cérebro humano. No rato a formação hipocampal aparece uma grande alongada estrutura em forma de “C” delimitado rostrodorsalmente pelo núcleo septal basal do prosencéfalo, atrás do diencéfalo e caudalmente dentro do lobo temporal (Amaral, 2006; Anderson *et al.*, 2007).

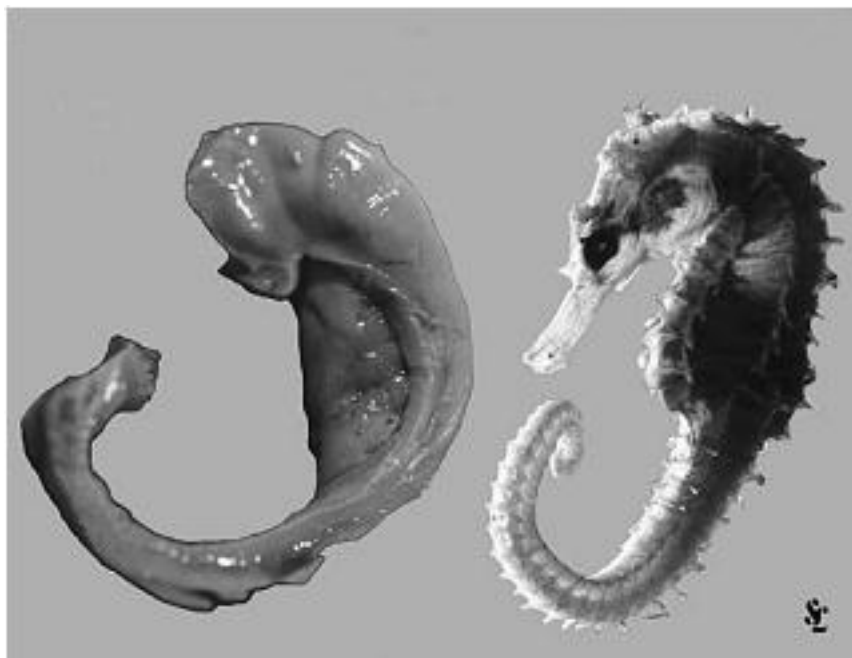


Figura 2. Dissecção de hipocampo humano sendo comparado com um cavalo marinho (*Hippocampus leiria*) devido à sua forma. Figura retirada do Livro “*The Hippocampus Book*”, Anderson *et al.*, 2007. (Cortesia do Professor Laszlo Seress, *University of Pecs*).

A região hipocampal é constituída por dois grupos de estruturas corticais, a Formação Hipocampal e a Região Parahipocampal. As principais diferenças entre essas duas estruturas são os números de camadas corticais presentes e suas características de conectividade. A formação hipocampal compreende três estruturas citoarquitetônicas distintas: o Giro Denteado (também chamado *fascia dentata*), o Hipocampo propriamente dito que é subdividido em três áreas (Corno de Ammon (CA): CA3, CA2 e CA1; definição abaixo), e o Subiculum ou Complexo Subicular (Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007) (**Figura 3**).

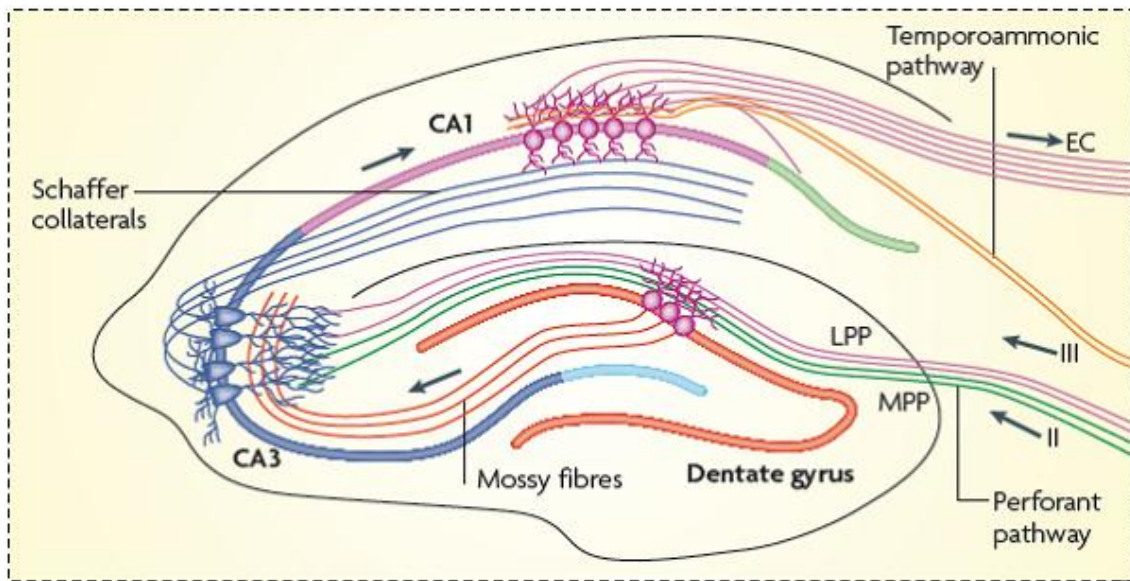


Figura 3. Esquema mostrando os principais componentes da formação hipocampal e as vias de entrada e entre as áreas hipocampais (via trisináptica) (Deng *et al.*, 2008).

As três regiões hipocampais compartilham duas características em comum, três camadas corticais, considerada uma característica do arqueocórtex e sua conectividade unidirecional (Amaral, 1999, Witter & Amaral, 2004). Apesar dessa característica de unidirecionalidade na qual a informação trafega no hipocampo, alguns autores consideram o córtex entorrinal (CEnt), como parte integrante da formação hipocampal, devido ao fato deste, fornecer a principal via de entrada para as células granulares do giro denteado, a chamada Via Perfurante (VP) não recebendo aferências recíprocas das células granulares (Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007).

O Hipocampo propriamente dito é denominado *Cornu Ammonis* ou Corno de Amon (CA), por sua forma lembrar um chifre de carneiro presente na cabeça do deus egípcio Amon (Amaral, 1999; Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007). As estruturas que durante o desenvolvimento originam o Corno de Amon juntamente com os neurônios que dão origem ao giro denteado dobram-se formando duas estruturas interdigitadas em forma de “C” (rocambole) (Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007).

No hipocampo, a população neuronal pode ser dividida em duas amplas classes: neurônios principais, denominados assim quando recebem e realizam sinapses com neurônios externos ao núcleo ou região em que estão situados e são principalmente excitatórios e usam o glutamato como neurotransmissor. E os interneurônios são aqueles que realizam sinapses locais, sendo na maioria das vezes neurônios inibitórios

utilizando GABA como neurotransmissor (Freund & Buzsáki, 1996; Bernard *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2007). Em tecido normal, células principais representam em média 90% da população neuronal no hipocampo e estão sob controle inibitório dos interneurônios (Freund & Buzsáki, 1996; Bernard *et al.*, 1998).

No giro denteado a camada formada pelos corpos celulares dos neurônios principais ou neurônios granulares (entre quatro e 8 fileiras de células, ~60 μm) é chamada de camada granular do giro denteado (*Dentate Granule Cell Layer - DGCL*). Os dendritos apicais dos neurônios granulares formam a camada molecular (*Molecular Layer - ML*) ou *stratum moleculare*. As células granulares e a camada molecular formam uma estrutura em forma de “V” ou “U” que delimita internamente a camada polimórfica do giro denteado ou *hilus*, formado por interneurônios e para onde as células granulares enviam os dendritos basais. O *hilus* constitui a terceira camada do giro denteado. A transição entre a camada granular e camada polimórfica, recebe o nome de zona ou camada subgranular (*subgranular zone - SGZ*). As duas lâminas de células granulares usualmente podem ser distintas entre si. A porção da camada molecular que está adjacente a CA1 é nomeada lâmina supra-piramidal ou lâmina dorsal e a porção remanescente próxima a fissura hipocampal é chamada de lâmina infra-piramidal ou lâmina ventral. A região que une as duas lâminas em “V” ou “U” é chamada de crista (Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007).

A camada molecular do giro denteado de roedores é subdividida de acordo com aferências recebidas em três regiões: camada molecular interna (*inner molecular layer - IML*), camada molecular média (*medium molecular layer - MML*) e camada molecular externa (*outer molecular layer - OML*). A interna, compreende cerca de 17% iniciais adjacente a camada de células granulares da camada molecular e recebe sinapses dos interneurônios do *hilus* e colaterais axonais das células granulares. A camada média recebe aferências de neurônios presentes na camada II do córtex entorrinal e compreende, do restante da molecular, 50% médios. Os 50% restantes da camada molecular são formados pela camada externa e recebem sinapses dos axônios de neurônios do córtex entorrinal presentes nas camadas IV (West & Andersen, 1980; Deller *et al.*, 1999; van Groen *et al.*, 2003; Danzer *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2011). Essas subdivisões são aproximadas, já que as divisões exatas entre as camadas não são claramente perceptíveis (**Figura 4**).

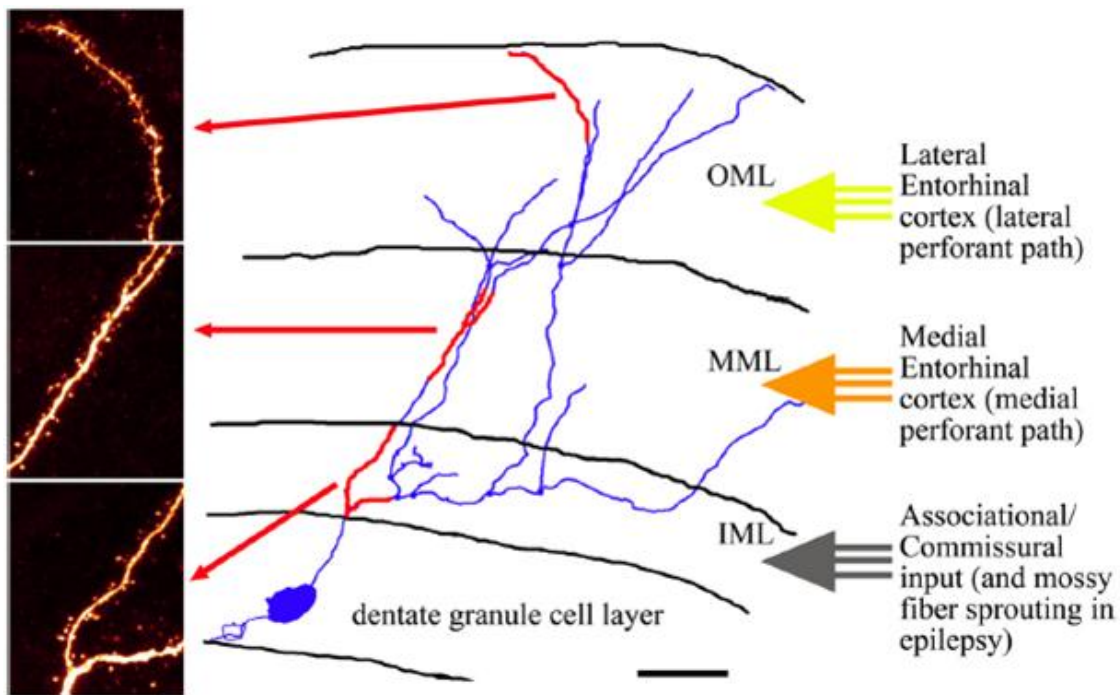


Figura 4. Esquema representando as subdivisões da camada molecular do giro denteado e as principais aferências. IML, camada molecular interna, MML, camada molecular média e OML, camada molecular externa. (Murphy *et al.*, 2011).

A camada molecular, de aproximadamente 250 μm de espessura (em ratos), é ocupada principalmente por dendritos apicais das células granulares que recebem aferências dos neurônios do córtex entorrinal e interneurônios do *hilus*. Nessa camada também são encontradas as células em cesto (*basket cells*), normalmente localizadas na transição entre as camadas granular e molecular interna ou também podem ser encontradas entre as camadas granular e *hilus*. A maioria dessas células são GABAérgicas sendo consideradas como a primeira via de controle inibitório das células granulares, presentes numa taxa de ~1:100 a 1:180 para as células granulares (Kosaka *et al.*, 1984; Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007). As células em candelabro (*chandelier cells*) são outros tipos de neurônios encontrados na camada molecular que enviam seus axônios descendentes através da camada granular, onde emitem colaterais que terminam exclusivamente nos segmentos iniciais dos axônios das células granulares. Desde que essas células são imunorreativas para marcadores de GABA, tais como, glutamato descarboxilase (GAD) e parvalbumina, e forma sinapses com células granulares, que tem função de controle inibitório das células granulares (Kosaka, 1983; Han *et al.*, 1993; Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007). Outras células

polimórficas podem ser encontradas na camada molecular, contudo o número de células nessa camada é reduzido e na maioria das vezes são inibitórias (Sloviter, 1987; Freund & Buzsáky, 1996; Witter & Amaral, 2004).

As células granulares do giro denteado apresentam um soma elíptico com largura aproximada de 10 μm e altura de 16 μm (Claiborne *et al.*, 1990; Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007). Essas células apresentam dendritos apicais projetando para camada molecular com média de 2800 a 3500 μm . Os dendritos basais nos neurônios granulares são muito raros roedores e mais frequentes em primatas (Ribak *et al.*, 1990; Ribak, 1992; Seress, 1992), e são projetados através dos interneurônios no *hilus*.

A camada polimórfica do giro denteado ou *hilus* é formada por pelo menos vinte a 40 tipos diferentes de interneurônios já identificados (Sloviter, 1987; Freund & Buzsáky, 1996). As células musgosas é o tipo mais comum e importante de células encontradas nessa região. Seus dendritos são grossos e normalmente estão restritos ao *hilus* podendo alcançar algumas células granulares. Esses interneurônios são excitatórios e apresentam como principal característica, complexos espinhos dendríticos grandes com formato de musgo (“*thorny excrescences*”) (Amaral, 1978; Ribak *et al.*, 1985; Witter & Amaral, 2004). A população de interneurônios na camada polimórfica apresenta uma grande variedade histoquímica com a expressão de diversas proteínas como calretinina, parvalbumina (PV), calbindina e neuromoduladores como neuropeptídeo Y (NPY) (Freund & Buzsáky, 1996; Sloviter, 1987).

Lorente de Nó dividiu o hipocampo propriamente dito (denominado doravante apenas por hipocampo) em três subregiões (CA3, CA2 e CA1) (**Figura 5**). A organização laminar no hipocampo é semelhante para todas as subregiões. A camada onde estão localizados os corpos celulares dos neurônios piramidais (ou neurônios principais) é chamada de camada piramidal ou *stratum pyramidale*. Os dendritos apicais dos neurônios piramidais do CA formam o *stratum radiatum* e seus dendritos basais e axônios, o *stratum oriens*. No caso de CA3 uma estreita zona acelular localizada acima do *stratum radiatum*, ocupada axônios de células musgosas do *hilus*, é chamada de *stratum lucidum* (Witter & Amaral, 2004; Anderson *et al.*, 2007).

revisão, Witter & Amaral, 2004). A via perfurante pode ser dividida em duas partes baseada na sua região de origem no rato. A via perfurante medial inerva principalmente dendritos localizados na camada molecular média e se origina da porção medial do córtex entorrinal. Já a via perfurante lateral originada na porção lateral do córtex entorrinal forma sinapses principalmente com dendritos presentes na camada molecular externa. Apesar das células que dão origem a essas duas partes da via apresentar aparências similares ao microscópio óptico, suas histoquímicas são distintas e essas diferenças permanecem inexploradas. (Amaral *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2011)

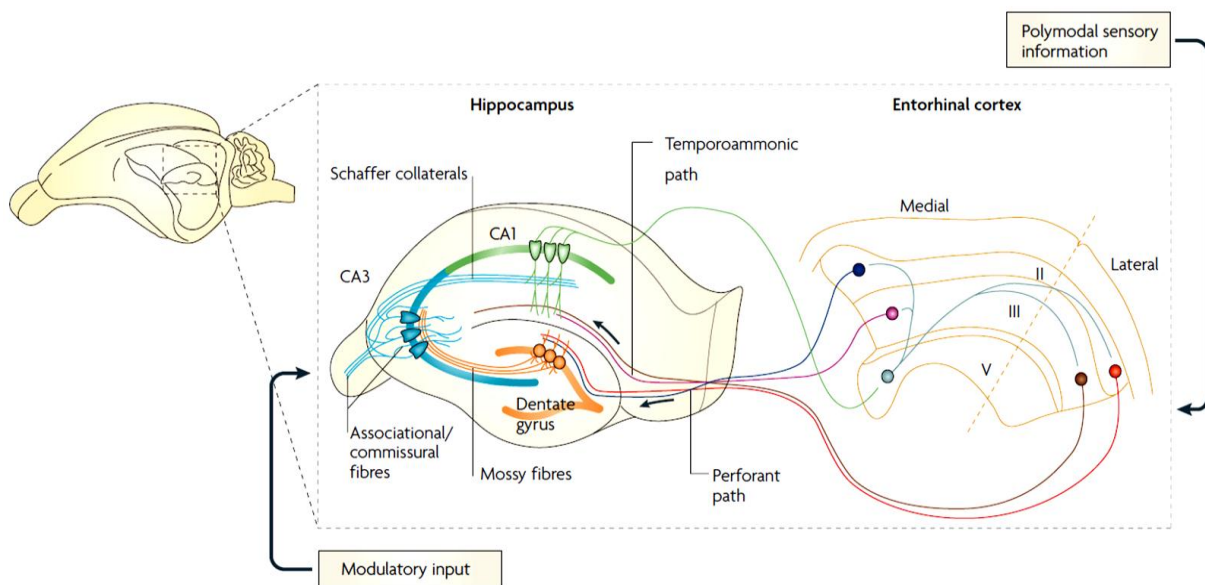


Figura 6. Principais vias aferentes e eferentes da formação hipocampal. (Neves *et al.*, 2008).

Neurônios presentes na camada III do córtex entorrinal enviam projeções axonais monossinápticas para o complexo subicular e CA1, formando outra importante via de entrada de informação na formação hipocampal chamada via temporoamônica (Witter *et al.*, 2000). Essa via é responsável por realizar influência modulatória ao ritmo de disparos dos neurônios piramidais de CA1 e formam suas sinapses exclusivamente no *stratum lucidum moleculare* (Maccaferri & Mcbain, 1995; Witter & Amaral, 2004).

O subiculum ou complexo subicular é parte do giro parahipocampal que dá continuidade ao hipocampo, recebendo aferências axonais de CA1. O *alveus* é uma fina camada de substância branca formada por axônios de células do hipocampo que margeiam a superfície ventricular da formação hipocampal e constitui a principal via eferente hipocampal. Os axônios de células do complexo subicular projetam para

dendritos de neurônios no córtex entorrinal. Outra importante via eferente do hipocampo é através dos colaterais de Schaffer, que são axônios provenientes de células piramidais de CA1 que deixam o hipocampo através da fimbria (Witter & Amaral, 2004) (**Figuras 3, 5 e 6**).

O hipocampo é uma das últimas estruturas a serem formadas no SNC. Em ratos, várias células piramidais continuam em migração até o momento de nascimento do animal e podem ainda não permanecer em processo migratório nos primeiros dias de vida até alcançarem a camada piramidal de CA (Altman & Bayer, 1990). Nos estágios finais de formação do giro denteado, células precursoras da zona subventricular migram para o giro denteado onde se alojam na zona entre o *hilus* e a camada de células granulares, formando a zona subventricular (SVZ) (Altman & Bayer, 1990). Em geral, essa zona é formada após o nascimento do animal se estabelecendo entre os dias 14 e 30 de vida, seguindo esse período, e é nessa zona que neurônios continuam sendo produzidos durante a vida adulta nos mamíferos (Altman & Das, 1965; Gould & Cameron, 1996). Neurônios granulares são gerados através da divisão de células progenitoras residentes dessa região (Gage *et al.*, 1998). Os neurônios migram da SVZ para a camada granular onde eles se diferenciam, estendem seus dendritos para a camada molecular e axônios para o *hilus* e CA3.

Embora tivessem ocorrido essa grande diferença comportamente entre os animais estimulados na mesma área, a análise eletrencefalográfica revelou padrão epileptiforme em ambos os grupos animais estimulados nas áreas registradas, amígdala e hipocampo ipsilateral á área estimulada (**Figura 8**).

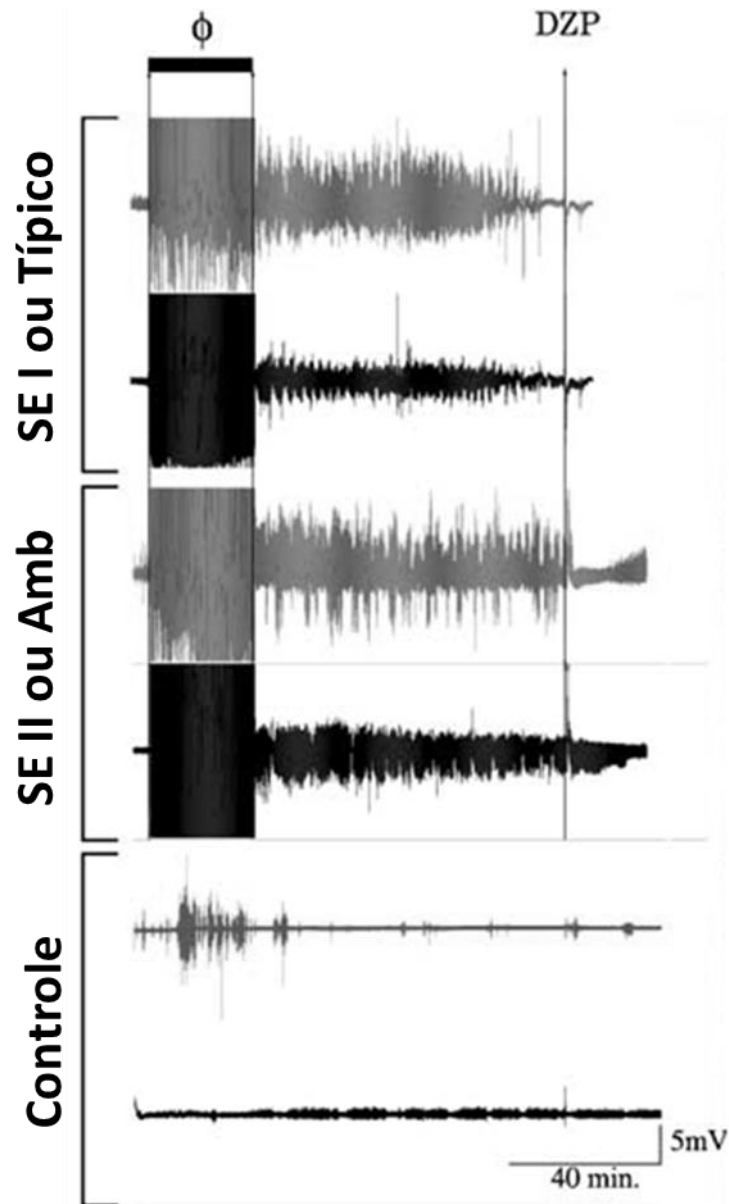


Figura 8. Registro eletrencefalográfico durante SEAS dos animais eletricamente estimulados na amígdala basolateral esquerda, representando a diferença entre as gravidades de crises nos dois grupos de animais estudados (Tilelli *et al.*, 2005).

Hipótese

Alterações plásticas ocorridas na fase aguda e semi-crônica após SE auto sustentado que tornam um cérebro normal em epileptic estão diretamente associadas as gravidades de crises no momento do SE.

OBJETIVOS GERAIS

3. Objetivos Gerais

- ✓ Estudar alterações plásticas associadas ao processo de epileptogênese experimental nas fases agudas e semi-crônicas.
- ✓ Relacionar alterações comportamentais com diferenças morfológicas decorrentes do SE.
- ✓ Avaliar a relação entre o índice de gravidade de crise e as alterações plásticas, observadas nas estruturas cerebrais límbicas.
- ✓ Avaliar especificamente alterações histológicas associadas com: atividade neuronal pela expressão de *c-Fos*, neurodegeneração, proliferação celular neurogênese conseqüentes da estimulação elétrica da amígdala, em modelo de status epilepticus auto-sustentado (SEAS);

MATERIAS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

Em todos os experimentos foram usados ratos Wistar machos adultos provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. No período dos experimentos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, sob a temperatura controlada de 21 °C, em caixas contendo de 4 a 6 animais no período pré-cirúrgico e 1 animal durante os períodos pós-cirúrgico e experimental, com livre acesso à água e ração e com o ciclo claro/escuro de 12 horas (7 a 19 horas = claro).

Todos os esforços foram feitos para evitar sofrimento desnecessário aos animais. Todos os protocolos foram realizados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Do ponto de vista das recomendações internacionais de Bioética é importante salientar que os tecidos utilizados neste projeto são provenientes de material da Tese de Doutorado da aluna **Cristiane Queixa Tilelli**, o que significa que nenhum animal adicional foi sacrificado para a elaboração da presente Dissertação.

4.1. Cirurgia estereotáxica para implante de Eletrodos

Os animais foram anestesiados com uma combinação de Xilazina (0,7 mg/kg; Bayer SA) e Ketamina (1,0 mg/kg; Agener Ind. E Com. LTDA) e localmente com Cloridrato de Lidocaína 2% contendo Epinefrina na combinação de 1:100.000 (Astra), usado como vasoconstritor. Receberam pentabiótico veterinário intramuscular (0,1mL/100g; Fort Dodge Saúde Animal LTDA), para a prevenção de infecções. Seguindo às anestésias os animais foram tricotomizados na cabeça e fixados no estereotáxico (*David Kopf*, modelo 962).

A cirurgia estereotáxica consistiu na implantação de eletrodos bipolares de aço inoxidável, revestidos de teflon (A-M System, Inc.; diâmetro = 400 µm), no complexo amigdalóide (coordenadas estereotáxicas: AP -2.3; ML -4.7; DV -7.1) e na formação hipocampal (coordenadas estereotáxicas: AP -6.3; ML -4.5; DV -4.5), ambos no lado esquerdo, utilizando como referência o Atlas de Paxinos & Watson (1997). Além dos eletrodos, um parafuso de aço inoxidável (FST Inc.), foi fixado na região frontal da calota craniana, utilizado como aterramento do animal ao sistema. Seguindo a implantação dos eletrodos, os fios foram soldados a um conector de telefone macho de 4 pinos (módulo RJ11) e a calota craniana foi recoberta com cimento de fosfato de zinco (S.S. White S.A.) e acrílico autopolimerizável (DFL LTDA) e para a fixação desse capacete de proteção, mais três parafusos foram fixados. Após as cirurgias estereotáxicas os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP durante três a 7 dias para recuperação.

4.2. Estimulação Elétrica da Amígdala

A estimulação elétrica foi feita segundo Tilelli, 2003 (publicado posteriormete, Tilelli *et al.*, 2005) utilizando-se um aparelho Grass S88 (Grass), conectado a um osciloscópio (Hewlett-Packard 130C), para monitoramento dos sinais enviados aos encéfalos dos ratos. Para a determinação do limiar para resposta convulsiva, os animais foram estimulados com ondas quadradas bifásicas, em uma frequência de 60 Hz, com período de 2 ms, durante 2 segundos. A amplitude de estimulação foi iniciada com 50 μA pico a pico e foi aumentada a cada nova estimulação de 50 em 50 μA até um máximo de 300 μA pico a pico. O intervalo entre dois estímulos foi de cinco a 6 minutos (modificado de Galvis-Alonso, 1997, Galvis-Alonso *et al.*, 2004).

4.3. Indução de *Status Epilepticus*

A indução do *Status Epilepticus* (SE) foi realizada 24 horas após a determinação do limiar a resposta convulsiva. Antes de serem estimulados, os comportamentos e o eletrencefalograma (EEG) (vídeo-EEG) dos animais foram registrados por 5 minutos, para obtenção da linha de base comportamental e EEGráfica (período controle). Em seguida, os animais foram estimulados eletricamente com ondas quadradas, bifásicas, com período de 1 ms, frequência de 60 Hz e amplitude de 300 μA (pico a pico), com intervalos de 0,5 segundo, durante 30 minutos (período de indução). Após a retirada do estímulo, os animais desenvolveram o chamado SE Auto-Sustentado, no qual permaneceram em crise por 90 minutos (período de manutenção), até que a crise foi interrompida com uma injeção de diazepam (5 mg/kg). Após a injeção de diazepam, os animais permaneceram em observação por até duas horas e, caso necessário, uma injeção adicional de diazepam foi administrada. Os animais controles foram implantados, mas não sofreram estimulação elétrica e receberam igualmente injeção de diazepam.

4.4. Perfusão dos animais

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais com seus respectivos grupos controles. Eles foram divididos de acordo com a janela temporal no qual foram perfundidos após sofrerem SE. Os animais foram perfundidos 3 horas, 24 horas ou 14 dias após o início da indução do SE.

Para a perfusão cada animal foi profundamente anestesiado com 69 mg/kg de tiopental sódico (Abbott). Os animais foram perfundidos transcárdialmente e com o auxílio de uma bomba de perfusão *Masterflex*® (Cole Parmer), com velocidade controlada, foram usados 100 mL de tampão *Millonigs* (hidróxido de sódio 0.39%, fosfato de sódio monobásico monohidratado 1.66%, cloreto de cálcio 0.002%), 300 mL de sulfeto de sódio 0.1% em *Millonigs* e posteriormente 300 mL de paraformaldeído (PFA, pH= 7,4) 4% em *Millonigs*. As soluções usadas na perfusão permitem a posterior realização de histoquímicas de Nissl, Neo-Timm, assim como, ensaios imunohistoquímicos e imunofluorescências.

4.5. Pós-fixação e Congelamento dos cérebros

Após a perfusão, os cérebros foram colocados em fixador (PFA 4% em *Millonigs*, pH= 7,4) por 2 a 4 horas, e em seguida, transferidos à solução de sacarose 20% e então 30% em *Millonigs*, para crioproteção. Após pelo menos 48 horas, os cérebros foram congelados em isopentano 99% (Vetec) e gelo seco (-65°C), posteriormente armazenados em *freezer* a -70 °C até 24 horas antes de serem cortados, quando foram passados para o *freezer* -20 °C.

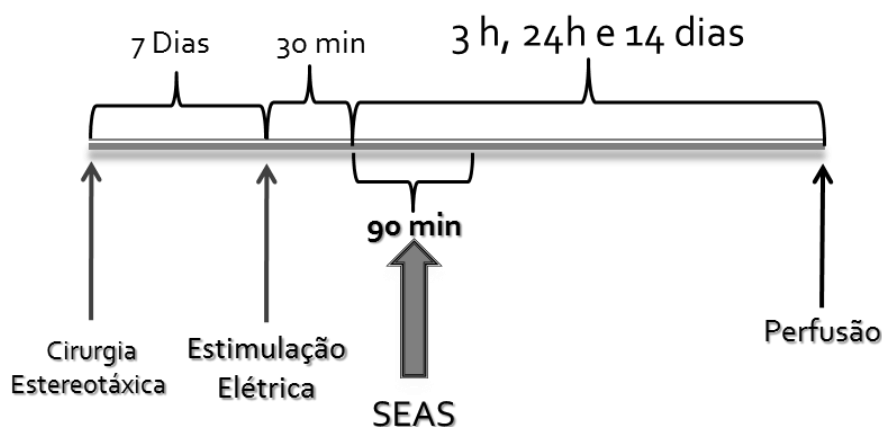


Figura 9. Desenho experimental resumindo as principais etapas de manuseio dos animais, executados pela doutoranda Cristiane Q. Tilelli, 2003.

4.6. Cortes dos cérebros em criostato

Os cérebros foram cortados em secções de 40 µm em criostato (*Microm HM-505-E*) com temperatura variando de -18 a -22 °C. Os cortes eram colocados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato de cromo-alumínio 0,05%) ou em placas de cultura de células com solução anti-congelante (50% de tampão fosfato 50 mM, 30% de etilenoglicol e 20% de glicerina), cada qual com seis áreas cerebrais espaçadas de 1 mm, em 24 jogos consecutivos adjacentes. Todas as placas foram armazenadas em *freezer* a -20 °C. Os cortes contendo as lesões de pontas de eletrodos foram colocados nas lâminas.

É importante destacar novamente que todos os protocolos de implante de eletrodos, estimulação elétrica, perfusão e corte dos cérebros foram realizados pela Doutora Cristiane Queixa Tilelli, durante a realização do seu projeto de Doutorado (detalhes em Tilelli *et al*, 2004).

4.7. Drogas

1. Diazepam (DZT – Roche): preparado na dose de 5 mg/kg. Aplicado intra peritonalmente (i.p.);
2. Ketamina (Agener Ind. E Com. LTDA): 1,0 mg/kg;
3. Xilazina (Bayer AS): 0,7 mg/kg; combinado com Ketamina;
4. Pentabiótico veterinário (Fort Dodge): preparado na dose de 0,1 mL/100g de peso corporal durante a cirurgia estereotáxica;
5. Cloridrato de Lidocaína 2% contendo Epinefrina 1:100,000 (Astra): anestésico local combinado com vasoconstritor.

4.8. Visualização, Aquisição de Imagens e Análise das Histologias

Os cortes histológicos foram analisados e suas imagens adquiridas por 3 sistemas de visualização, aquisição e análise: (I) Estereoscópio (*Olympus SZX12*, Melville, USA) acoplado a uma câmera digital (*Olympus DP11*), ligado a um computador (PC Pentium II 500 MHz). (II) Microscópio *Olympus BX-60* com *charriot* motorizado (*MicroBrightField*, Inc, Colchester, VT, USA) ligado a uma câmera Cool-CCD (*Optronics*, Califórnia, USA) e Rettiga que leva as imagens a um computador (PC Pentium IV, 1,8 GHz). (III) No caso das imagens de microscopia confocal, as aquisições estão sendo realizadas utilizando microscópio confocal Leica TCS-NT (SP2 e SP5) e *software* Leica LCS (ambos, *Leica Microsystems-Heidelberg*, Germany).

CAPÍTULO 1 - A SUPER ATIVIDADE LEVA A MORTE?

5. Capítulo 1- A super atividade leva a morte?

5.1. Expressão de c-Fos

Entre as propriedades do Sistema Nervoso Central (SNC) está a capacidade de responder a mudanças externas, interpretá-las e estocar novas informações. As estimulações de neurônios podem ativar dois diferentes mecanismos pelos quais eles processam e transmitem a informação: pela atividade elétrica que despolariza a membrana celular que imediatamente processa e conduz a informação a outras células; ou pela ação mais prolongada através da formação de várias cascatas de reações produzindo mensageiros secundários no interior da célula. Esses mensageiros secundários podem vir a ativar a produção de fatores de transcrição, os quais são proteínas que controlam a expressão de outros genes iniciando a transcrição e/ou a repressão de outros genes, alterando assim as respostas dos neurônios a subsequentes estímulos. Os genes ativados pelos fatores de transcrição podem ser, novas proteínas tais como aquelas de canais iônicos e estruturas do citoesqueleto. Esses fatores de transcrição têm um papel crucial no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso, bem como nas respostas adaptativas a diferentes tipos de estímulos e situações patológicas (Herdegen & Leah, 1998).

O primeiro conjunto de genes ativados por sinais externos são aqueles que não exigem *de novo* a síntese de proteínas, esses são chamados genes de início imediato (IEGs) ou genes de resposta primária (Herdegen & Leah, 1998). A indução dos IEGs é rápida e transiente, apresentando um pico de expressão e voltando aos níveis basais algumas horas depois. De todos os IEGs, o mais amplamente estudado é o gene “*c-fos*”, que produz uma proteína com aproximadamente 380 aminoácidos, geralmente confinada ao núcleo das células. A expressão da proteína c-Fos (ou Fos), revelada pela técnica de imunohistoquímica, provê uma importante ferramenta usada na marcação de áreas cerebrais metabolicamente ativas após estímulos específicos (Sagar *et al.*, 1988; Morgan *et al.*, 1987). Sendo assim, devido a suas notáveis características de expressão dramática, rápida e transiente aumentando rapidamente os níveis da proteína c-Fos no sistema nervoso após estímulos específicos, a expressão de c-Fos têm sido amplamente usada como marcador de áreas cerebrais ativadas após estímulos indutores de crises (Morgan *et al.*, 1987).

Os primeiros estudos nessa área foram desenvolvidos após administração de Pentilenotetrazol (PTZ), o qual evocava crises generalizadas produzindo uma massiva indução da proteína Fos nos córtices do cíngulo e piriforme, bem como nas células granulares do giro denteado (Dragunow & Robertson, 1987; Morgan *et al.*, 1987). Os níveis máximos da expressão de c-Fos foram atingidos em células granulares do giro denteado dentro de 30 a 60 min e em células piramidais dentro de 3 a 4 horas após administração de PTZ (Dragunow & Robertson, 1987; Morgan *et al.*, 1987). A indução de crise através da administração de Ácido Caínico (AC) produz uma rápida e forte expressão de c-Fos em estruturas límbicas, tais como, células granulares do giro denteado 90 min após administração e moderada marcação em núcleos do bulbo olfatório, córtex entorrinal, núcleos amigdalóides e células piramidais de CA1 do hipocampo (Le Galle Le Salle, 1988; Schreiber *et al.*, 1993).

No modelo de experimental do *kindling* por estimulação elétrica do hipocampo, Dragunow & Robertson, 1987 mostraram rápido e transiente aumento da expressão da proteína Fos nas células granulares do giro denteado, CA1, CA3, CA4 do hipocampo, bem como no córtex piriforme, voltando aos níveis basais 24 após estímulo. Viram também que as administrações de drogas antiepiléticas como carbamazepina, reduzem significativamente o número de células ativas no giro denteado após estímulo. Em ratos que passaram pelo *Kindling* elétrico da amígdala onde se pôde observar índice 5 na escala de Racine (1972) de gravidade de crise, mostraram a expressão massiva bilateral de c-Fos no córtex cerebral, hipocampo, córtex piriforme e córtex entorrinal (Dragunow *et al.*, 1988).

6. Morte Neuronal

O processo de morte celular tem fascinado cientistas de diferentes áreas da biologia e da medicina, intrigando-os através de mais de um século sobre quais seriam os reais mecanismos de morte celular. Os primeiros relatos, sobre morte celular, foram discutidos pelo médico patologista alemão Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902), em meados do século 19, usando os termos *degeneração*, *mortificação* e *necrose* somente se referindo a observações macroscópicas para definir um estágio avançado de morte tecidual, preservando até certo estágio a morfologia externa, similar ao que hoje é conhecido como gangrena. Alguns anos depois Carl Weigert (1845-1904), dando seqüência aos trabalhos de Virchow, observa que células necróticas perdem seus núcleos (Weigert C., 1885 APUD Majno & Joris, 1995). As primeiras denominações para morte celular utilizando microscópio surgiram em 1879, com a introdução dos termos *karyorhexis* indicando a desintegração do núcleo e *karyolysis* descrevendo o desaparecimento do núcleo. Estudando desenvolvimento de folículos atrésicos de mamíferos, Flemming em 1885, utilizou o termo *chromatolysis* ao observar a desintegração e eventual desaparecimento do núcleo. Esses termos pareciam ignorados até que em 1972 o termo apoptose foi lançado por John F. Kerr.

Durante muito tempo morte celular foi considerado como um processo passivo, com caráter degenerativo que ocorreria devido a lesões, infecção ou falta de fatores de crescimento. Como consequência a célula alteraria sua integridade da membrana, aumentaria seu volume e depois perderia sua atividade metabólica levando-a a morte. Entretanto nem todos os processos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir morte celular programada como resposta a estímulos extracelulares ou intracelulares (Hengartner, 2000). No caso dos neurônios os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose e necrose.

A apoptose é definida como morte celular programada, caracterizada pelo encolhimento celular e perda de aderência com a matriz extracelular e ou células vizinhas. No núcleo a cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A maioria das organelas celulares preserva sua morfologia, com exceção da mitocôndria que pode sofrer ruptura da membrana externa.

Em seguida, a membrana celular forma prolongamentos, o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos por membrana nuclear. Eventualmente a célula sofre lise originando estruturas contendo material nuclear e ou organelas envoltas por membrana celular, chamados corpos apoptóticos. Esses corpos apoptóticos são fagocitados por células vizinhas, na maioria das vezes macrófagos (Kerr, 1972; Wyllie *et al.*, 1980, Kerr *et al.*, 1994). A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos e é bem controlada geneticamente demandando gasto energético pela célula (Ranganath & Nagashree, 2001; Henshall & Simon, 2005)

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que leva a célula a um dano irreversível sem que aja maneira de se recuperar (Majno & Joris, 1995). O processo de necrose é marcado pelo inchaço celular, geralmente acompanhada pela condensação da cromatina, desorganização do citoplasma e perda da integridade da membrana levando lise nuclear e celular. As chamadas células picnóticas, por exemplo, detectadas na coloração de Nissl, é o termo que se dá a este tipo de evento que inclui perda da membrana celular, citoplasma pálido ou ausente e corpúsculos de condensação de cromatina (Kerr, 1972; Wyllie *et al.*, 1980, Kerr *et al.*, 1994). Como durante o processo necrótico ocorre liberação do conteúdo celular, pode haver dano às células vizinhas e subsequente processo inflamatório local (Wyllie *et al.*, 1980; Ziegler & Groscurth, 2004).

No caso dos neurônios, o influxo de cálcio (Ca^{2+}) através de canais voltagem-dependentes na membrana plasmática, é um sinal fundamental para liberação de neurotransmissor pelo terminal pré-sináptico e para a resposta do neurônio pós-sináptico (Yuste *et al.*, 2000; Hartman & Konnerth, 2005; Mattson, 2007). O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), induz aumento na concentração citoplasmática de Ca^{2+} pela estimulação direta de receptores de canais N-metil-D-aspartato (NMDA) e 2-amino 5-methyl propanoic acid (AMPA) e ou indiretamente pela ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Durante a atividade fisiológica normal, a concentração intracelular de cálcio aumenta somente momentaneamente (apenas por alguns segundos ou minutos) sem que haja efeitos adversos aos neurônios. Entretanto, em condições patológicas, a habilidade dos neurônios em controlar os fluxos de cálcio e a quantidade intracelular é comprometida, afetando assim a homeostase da concentração de cálcio pelo neurônio levando à morte

(Mattson, 2007). O aumento de cálcio citoplasmático provoca aumento de cálcio também na mitocôndria, o que por sua vez inibe a cadeia respiratória provocando a formação de radicais livres que se ligam a espécies oxigenadas; esse complexo pode causar dano a toda estrutura da célula incluindo lipídeos, proteínas e DNA (Cock, 2002). Alterações nas mitocôndrias podem contribuir para a liberação de citocromo c que estimula a cascata da caspase (Caspase 3 e Caspase 9), presente no processo apoptótico (Van Cruchten & Can den Broeck, 2002).

No sistema nervoso observa-se apoptose durante o processo de desenvolvimento (Takao *et al.*, 1991) e necrose em casos de lesões por excitotoxicidade (Olney, 1994). Estudos clínicos e em modelos experimentais tem demonstrado que crises prolongadas ou *SE* podem causar morte neuronal no cérebro. Tem sido difícil na prática clínica dissociar consequência das epilepsias de suas causas, no caso da lesão neuronal ainda nos resta à dúvida, se após o *SE* a lesão causada vai gerar novas crises ou as crises recorrentes levam a mais morte neuronal de outros neurônios (ou outros tipos celulares no SNC). Estudos de neuroimagem em alta resolução têm revelado progressão de dano cerebral em pacientes com contínuos episódios de crises (Briellmann *et al.*, 2002; Fuerst *et al.*, 2003, Jokeit *et al.*, 1999; Kalviainen *et al.*, 1998, Henshall & Simon 2005). Em particular, o hipocampo demonstra seletiva perda neuronal nos interneurônios do giro denteado e em neuronios piramidais no Corno de Amon, nos campos CA1 e CA3 (Mohapel *et al.*, 2004; Furtado *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2011). Outras áreas cerebrais também podem apresentar neurodegeneração após episódios de crises, tais como amígdala, tálamo, neocórtex e substância negra (Meldrum & Bruton, 1992; Henshall & Simon 2005; Fujikawa, 1996; 2005; Turski *et al.*, 1987).

7. Objetivos Específicos

- ✓ Mapear áreas cerebrais ativadas pela indução do SE, por meio da avaliação da expressão de c-Fos;
- ✓ Mapear áreas cerebrais que sofreram processo de neurodegeneração, após indução de SE, pela histoquímica de FluoroJade C (FJC);
- ✓ Verificar se as áreas ativadas após o SE são as mesmas nas quais ocorre neurodegeneração, na tentativa de verificar se o c-Fos pode ser usado como um preditor de morte neuronal crises límbicas.
- ✓ Verificar se há associação direta entre a gravidade de crises epiléticas e as alterações morfológicas ocorridas no processo de ativação neuronal e neurodegeneração;

8. Materiais e Métodos

8.1. Ensaio Imunohistoquímico

8.1.1. Imunofluorescência

A imunofluorescência é principalmente indicada para localizar, *in situ*, células neuronais produtoras de determinados peptídeos ou proteínas, que expressam, por exemplo no corpo celular, citoesqueleto, ou em processos axonais e dendritos. O sucesso da imunofluorescência depende das interações físicas entre os anticorpos e epítopos dos antígenos específicos presentes no tecido. Dessa forma, a preparação do tecido deve garantir a preservação da morfologia do tecido, da sua antigenicidade e da acessibilidade do anticorpo ao antígeno, sendo a fixação um passo primordial.

Neste caso, a imunofluorescência foi utilizada para marcar a expressão da proteína marcadora de atividade neuronal *c-Fos*, presente no núcleo dos neurônios. As secções em *free-floating* foram banhadas por 10 minutos em glicina 0,1 M diluída em PBS seguido de 2 banhos de 5 minutos em PBS. As secções foram incubadas por 1 hora em tampão bloqueio: PBS 0,1 M contendo Triton X-100 0,1% (*Sigma*, São Paulo, Brasil) e 2% de soro-albumina bovina (*BSA*; *Sigma*, São Paulo, Brasil), em agitação branda. Elas foram, então, colocadas para incubação com o anticorpo primário: *Rabbit – α c-Fos*; 1:500 µl (*Santa Cruz Biotechnology INC.*; CA, USA), diluídos em tampão bloqueio e deixados em temperatura ambiente *overnight* (4°C), de 16 a 20 horas em agitação branda. A segunda parte da imuno inicia-se com 3 banhos de 5 minutos em PBS, seguidos da incubação com anticorpo secundário: *Goat - α Rabbit Alexa Fluor 594* (*Molecular Probes*; Oregon, USA), utilizando diluição de 1:2000 µl, diluído em solução bloqueio por 1 h protegidos da luz em agitação branda, seguido de 10 banhos de 5 minutos em PBS. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas, utilizando-se como meio de montagem o *Fluoromount G*.

8.2. Histoquímicas

8.2.1. Nissl

Os neurônios possuem mais ácidos ribonucléicos (RNA) no citoplasma que qualquer outra célula. O corpo celular dos neurônios é rico em retículo endoplasmático rugoso, na forma de agregados de cisternas paralelas, entre as quais ocorrem numerosos polirribossomas livres. Esses grupos de cisternas e ribossomas podem ser corados com corantes básicos, apresentando-se ao microscópio óptico como manchas basófilas espalhadas pelo citoplasma, denominadas corpúsculos de Nissl. Além do retículo endoplasmático rugoso, a cromatina e o nucléolo também são substâncias basófilas. A cor resultante da marcação depende do corante básico utilizado. Axônios não são corados porque não são ricos em ribossomas (Bittencourt & Elias, 2007). Essa coloração histoquímica é processada para avaliação de qualidade do material após perfusão e para se certificar se, por exemplo, cânulas ou eletrodos estão bem posicionados na área correta. Está sendo usado também para mapeamento das áreas através de cortes adjacentes aos usados nas imunofluorescências e outras histoquímicas (detalhes abaixo).

A técnica consiste em várias etapas onde as secções foram hidratadas com banhos decrescentes de álcool, passando por banhos em água, então colocadas por 1 minuto em solução de acetato de cresil violeta 0,25% e depois lavadas em água corrente por 10 minutos. Em seguida, as secções foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, passaram pelo processo de diafanização com banhos de xilol e então montadas com lamínulas, usando *Entellan (Mikroskopie)*, como meio de montagem.

8.2.2. FluoroJade C

Seguindo o protocolo proposto por (Schmued *et al.*, 1997), as lâminas foram submetidas a banhos sucessivos de etanol absoluto 3 minutos, etanol 70% por 1 minuto, água destilada (dH₂O), por 1 minuto, permanganato de potássio por 15 minutos em agitação branda, 3 lavagens em dH₂O por 1 minuto. FluoroJade C (FJC) (preparado e utilizado no mesmo dia), 30 minutos com agitação branda, três lavagens em dH₂O por 1 minuto, secagem das lâminas, posteriormente as lâminas foram submersas em xilol e feita a montagem utilizando *Entellan (Mikroskopie)*, como meio de montagem. Detalhes adicionais da padronização dos protocolos de FJC em nosso laboratório encontram-se em Castro (2006) e Castro *et al.*, 2011.

- FluoroJade C (solução estoque 0,01%): 10 mg de FJC em 100ml de dH₂O, solução estável por até dois meses se conservado em geladeira.
- FluoroJade C (solução de uso 0,001%): diluído em ácido acético 0,1%.
- Permanganato de potássio (KMnO₄) 0,06%: pode ser utilizado por uma semana se guardado em recipiente de vidro bem fechado.

8.2.3. Análises Estatísticas

Todos os dados foram analisados estatisticamente através dos programas *OriginPro 8* (*OriginLab Corporation; MA, USA*) e *GraphPad Prism 5 Demo* (*GraphPad Software, Inc.; CA, USA*). Para análise estatística nós desenvolvemos uma escala arbitrária semiquantitativa de marcação para imunohistoquímica de c-Fos e FJC, levando em consideração o número de células: **0** = representa nenhuma célula marcada (-); **1**= poucas células marcadas no lado ipsilateral (+i); **2**= número intermediário de células marcadas no lado ipsilateral (++i) e/ou poucas células marcadas bilateralmente (+b); **3**= muitas células marcadas no lado ipsilateral (+++i); **4**= número intermediário de células marcadas bilateralmente (++b) e **6**= representando muitas células marcadas bilateralmente (+++b) (**Tabela 2**). A escala foi validada por três observadores (VRS, CQT, OWC), que desconheciamos quais grupos estavam sendo analisados. Os resultados foram estatisticamente analisados utilizando o *Student t-test*. Foi considerada estatisticamente significativa qualquer diferença com $p < 0.05$.

Tabela 2. Escala Arbitrária Semi-quantitativa de células marcadas FluoroJade C (FJC⁺) e c-Fos⁺, validada por 3 observadores cegos aos grupos experimentais analisados (VRS, OWC e CQT).

• 0 nenhuma marcada (-)
• 1 pouca ipsilateral (+i)
• 2 intermediária ipsilateral (++i) e/ou pouca bilateralmente (+b)
• 3 muita ipsilateral (+++i)
• 4 intermediária bilateralmente (++b)
• 6 muita bilateralmente (+++b)

9. Resultados

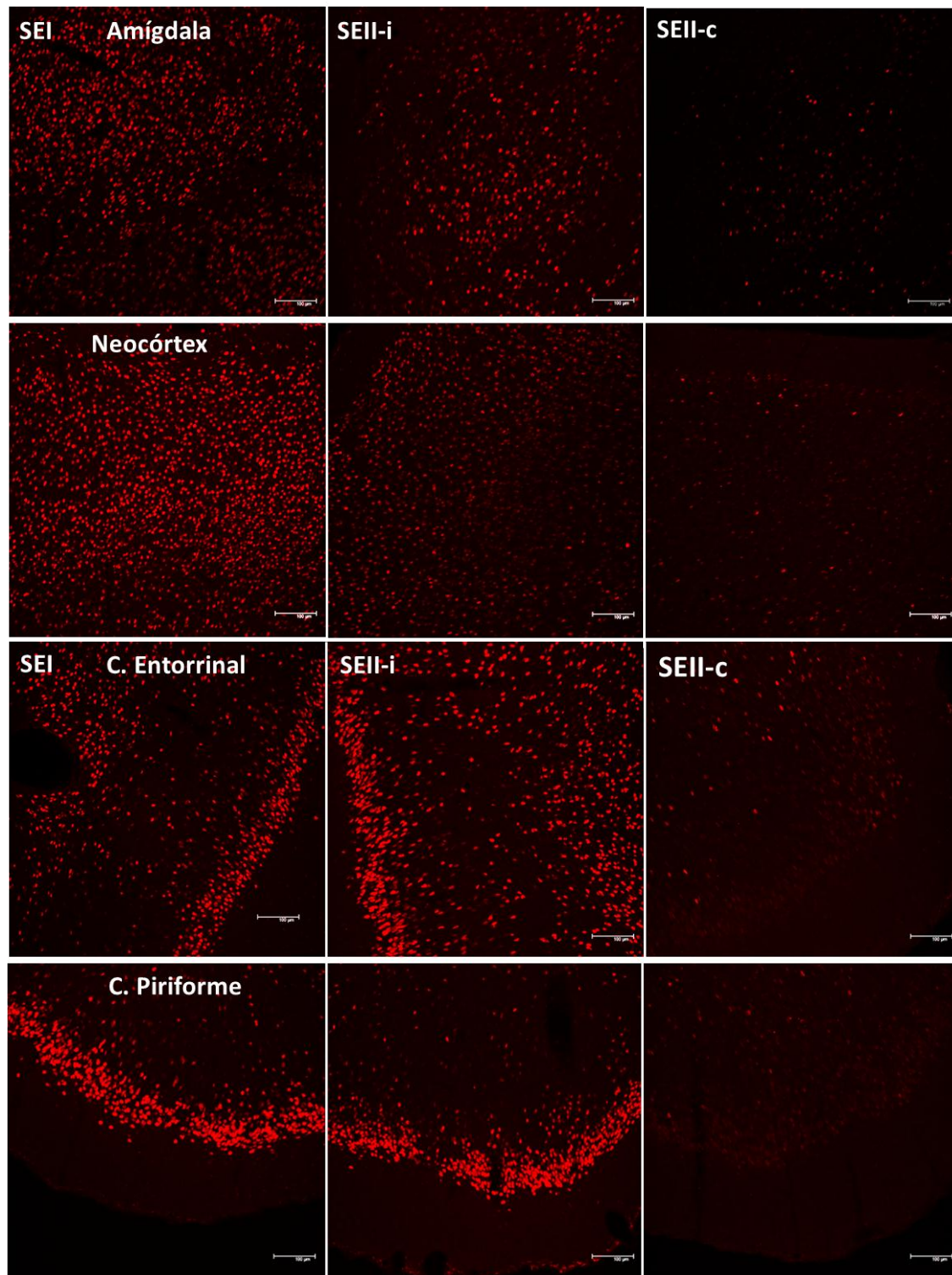
No total foram utilizados 58 animais, entre os quais 41 sofreram estimulação elétrica do complexo amigdalóide e 17 animais controles implantados, mas não estimulados. Os animais foram divididos baseados no padrão de comportamento expresso durante o SE, formando dois grupos experimentais. O primeiro grupo foi formado pelos animais que expressaram um padrão de crise mais grave, com o comportamentos mais severos (crises límbicas, levantamento, quedas, corrida e saltos); Pinel & Rovner (1978), alcançando classes superiores a 5 sendo esse grupo chamado de **SE tipo I** ou **SE Típico**. Já o outro grupo foi formado por animais que expressaram um comportamento atípico, com SE menos severo expressando comportamentos apenas de mioclonias de cabeça, automatismos faciais com rara progressão a escalas superiores a 3, sendo chamado de **SE tipo II** ou **SE deambulatório**, devido ao fato dos animais deambularem dentro da caixa de registro durante o SE. A análise de EEG revelou que todos os ratos estimulados apresentaram EEG epileptiforme em ambas as áreas registradas, hipocampo e amígdala. No grupo controle os animais não apresentaram crises ou alterações eletrencefalográficas. Estudos mais aprofundados a respeito do comportamento e EEG desses animais foram feitos pela Dra. Cristiane Queixa Tilelli, durante a realização da sua Tese de Doutorado (Tilelli, 2003; publicado posteriormente Tilelli *et al.*, 2005).

9.1. *Expressão de c-Fos*

A expressão de Fos tem sido uma ferramenta extensivamente utilizada para localização de populações neuronais durante a propagação e manutenção das crises (Morgan et al., 1987). As imunohistoquímicas para Fos foram realizadas no grupo de animais perfundidos 3 horas após indução do SE, revelando uma ampla expressão da proteína Fos após a indução do SE pela estimulação elétrica da amígdala. Várias populações neuronais em diversas áreas expressaram a proteína, indicando assim que essas estavam envolvidas como substratos relacionados à manutenção das crises e dos comportamentos expressos. Dentre todas as áreas cerebrais ativadas envolvidas no SE, as que foram analisadas nesse estudo foram: amígdala, formação hipocampal, neocortex, córtex piriforme e córtex entorrinal. Essa restrição das áreas estudadas foi feita devido ao fato desse mapeamento cerebral já ter sido feito pela doutoranda Cristiane Tilelli em sua Tese de Doutorado e coube a nós como objetivo desse trabalho, relacionar as áreas ativadas (c-Fos⁺) com aquelas que em uma janela futura de 24h, apresentariam morte neuronal (FJC⁺).

Nos animais que sofreram SE tipo I, o mais grave, que apresentaram índice de gravidade de crise variando na maior parte do tempo entre 4 e 5, foi possível encontrar a marcação mais ampla de c-Fos, em todas essas áreas estudadas de forma bilateral em ambos os hemisférios cerebrais, sem distinção de marcação do lado estimulado para o lado contralateral. Já no grupo de SE tipo II, com um menor índice de gravidade das crises, a marcação foi mais restrita e fraca, sendo essa, com predominância, em áreas ipsilaterais ao lado estimulado (**Figura 10**). Nesses animais a expressão de c-Fos no lado ipsi (**Figura 10: A', B', C', D'**) se assemelhou a aquela encontrada em ambos os lados os animais do grupo SE tipo I (**Figura 10: A, B, C, D**), mas quando analisado o lado contralateral à estimulação, foi possível detectar poucas e esparsas células marcadas nas respectivas áreas estudadas, mostrando assim uma pequena participação do lado contralateral no comportamento de crises (**Figura 10: A'', B'', C'', D''**). Os animais controle não apresentaram expressão de c-Fos em nenhuma área estudada.

Figura 10. Imunofluorescência para c-Fos mostrando áreas corticais ativadas 3 horas após indução de SE. Podemos notar que na primeira coluna (A, B, C e D) mostrando os animais que sofreram SE tipo I, o mais grave, a marcação para c-Fos foi maior e mais forte (estatisticamente diferente para amígdala e neocórtex, A e B), podendo ser vista em ambos os hemisférios cerebrais, contra e ipsilaterais a estimulação. Já nas outras colunas estão os lados ipsi (A', B', C' e D') e contra-lateral (A'', B'', C'' e D''), dos animais que sofreram SE tipo II mais brando, mostrando assim que o lado estimulado está mais ativado que o lado contralateral (A- Amígdala, B- Neocórtex, C- Córtex Entorrinal e D- Córtex Piriforme). Aumento de 100 vezes e barra de calibração 100 μ m.



Quando comparada a expressão de c-Fos nos dois grupos de animais estudados, através de uma análise semi-quantitativa, dentre todas as áreas, duas tiveram relevância estatística, **amígdala** e **neocórtex**, mostrando que essas áreas são estatisticamente mais ativas no grupo que sofreu SE tipo I em relação aos animais que apresentaram SE tipo II, como mostrado nas **Figuras 11 e 12**.

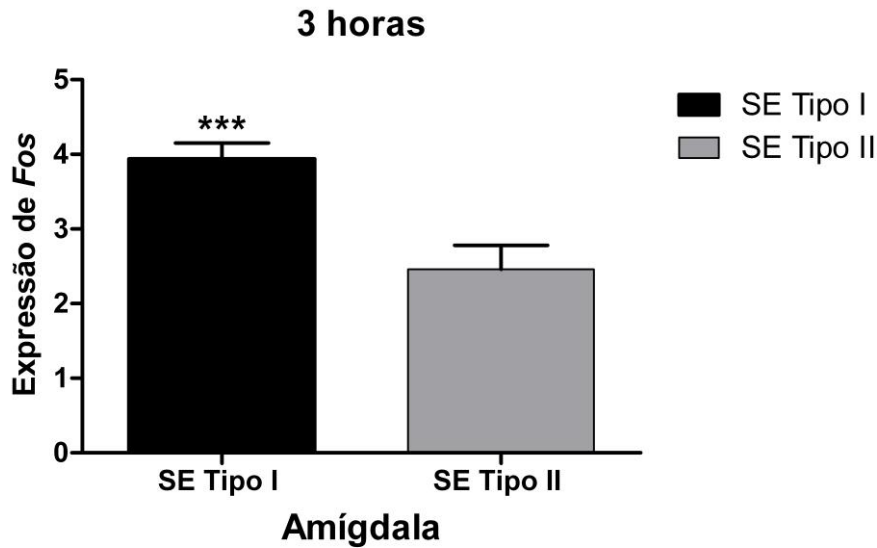


Figura 11. Áreas cerebrais ativadas após estimulação elétrica do complexo amigdalóide. A expressão de c-Fos na amígdala em ambos os hemisférios cerebrais se mostrou estatisticamente diferente nos animais que apresentaram comportamentos mais graves de crise do que em relação aqueles com índice de gravidade de crise mais baixo. Amígdala, *** $p < 0.0001$; Student *t*-test.

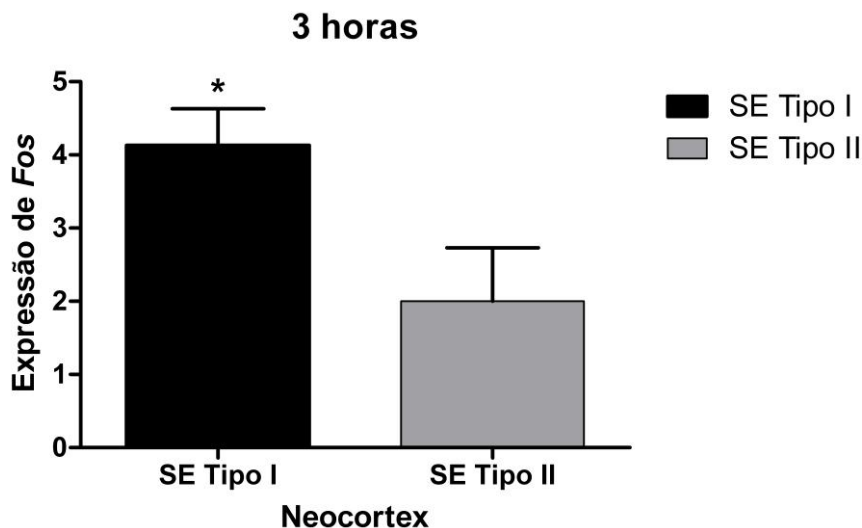
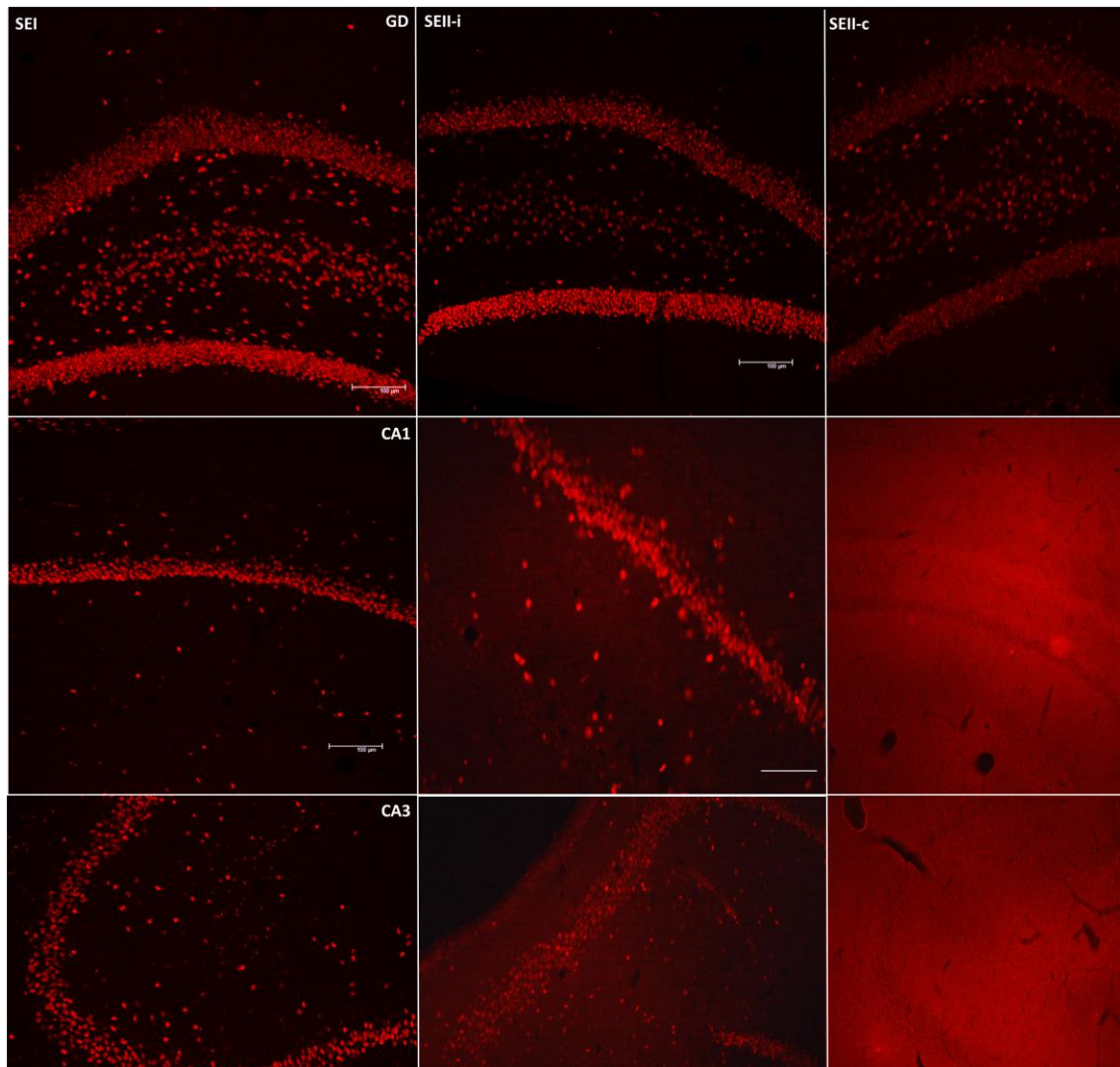


Figura 12 Áreas cerebrais ativadas após estimulação elétrica do complexo amigdalóide. A expressão de c-Fos no neocórtex se mostrou estatisticamente diferente nos animais que apresentaram comportamentos mais graves de crise do que em relação aqueles com índice de gravidade de crise mais baixo, SE tipo II, * $p = 0.0390$, Student *t*-test.

Animais que desenvolveram SE tipo I apresentaram uma expressão de c-Fos muito mais ampla no hipocampo, bilateralmente distribuída nas células granulares do giro denteado, *hilus* do giro denteado e em neurônios de CA1 e CA3 (**Figura 13: A, B, C**). Os animais que sofreram SE tipo II apresentaram uma maior marcação no lado ipsilateral ao lado estimulado, onde foi possível visualizar uma grande marcação de c-Fos nas células granulares do giro denteado, *hilus* e neurônios em CA1 e CA3 (**Figura 13: A', B', C'**). No lado contralateral a marcação de c-Fos ficou restrita às células granulares do giro denteado e células do *hilus*, ocorrendo de forma muito fraca ou inexistente em CA1 e CA3 (**Figura 13: A'', B'', C''**).

Figura 13. Imunofluorescência para Fos mostrando áreas hipocâmpais ativadas 3 horas após indução de SE. Podemos notar que na primeira coluna (A, B e C), que ilustra os animais que sofreram SE tipo I, o mais grave, sendo que nessa, a marcação para c-Fos foi maior e mais forte (não estatisticamente diferente). Já nas outras colunas estão os lados ipsi (A', B' e C') e contra-lateral (A'', B'' e C''), dos animais que sofreram SE tipo II mais brando, apresentando assim que o lado ipsi está mais ativado que o lado contralateral (A-Giro Denteado e *Hilus*, B-CA1, C-CA3). Aumento de 100 vezes e barra de calibração 100 µm.



9.2. Discussão

A ativação de estruturas do lobo temporal, reconhecidamente participantes de crises epiléticas límbicas, já era de se esperar, visto a ampla expressão comportamental e eletrofisiológica no SE observadas nesse trabalho. A expressão da proteína c-Fos em estruturas límbicas após crises epiléticas em modelos animais têm sido demonstrada por vários autores desde a década de 80 (Dragunow & Robertson, 1988; Le Gal La Salle, 1988; Hosford *et al.*, 1995). A utilização dessa técnica se revelou bastante eficiente e confiável no mapeamento de áreas cerebrais envolvidas nos comportamentos de crises durante o SEAS (**Figuras 10 e 13**).

Em nosso trabalho encontramos ampla marcação para imunofluorescência para proteína c-Fos, presente em núcleos neuronais de células estimuladas durante as crises. Nossos achados demonstram que quanto maior o índice comportamental das crises, maior o número e intensidade de marcação para c-Fos, visto que os animais que expressaram índices comportamentais mais altos tiveram mais ampla marcação para Fos nas diversas estruturas cerebrais.

Dentro de 30 a 240 minutos após o início do SE, a expressão de c-Fos se espalha por várias áreas cerebrais refletindo assim prolongada e generalizada ativação neuronal. Durante essa fase, a imunoreatividade para c-Fos alcança seus mais altos níveis em estruturas límbicas, incluído córtex piriforme, hipocampo e amígdala. Assim, nossos dados corroboram com os dados encontrados na literatura, nos quais a expressão de c-Fos após indução de SE por administração de agentes químicos pode ser vista em diversas estruturas cerebrais, incluindo as estruturas límbicas, evidenciadas em nosso trabalho (Motte *et al.*, 1998).

Um padrão de marcação similar ao encontrado em nossos animais que desenvolveram SE tipo I, pode ser comparado a aquele visto em outros modelos de SE induzidos por injeção de PILO (Motte *et al.*, 1998; Fabene *et al.*, 2004), bem como em modelos por injeção de PTZ (André *et al.*, 1998), nos quais se observa forte expressão de c-Fos em ambos os hemisférios cerebrais.

No trabalho desenvolvido por Motte *et al.*, (1998), através da indução de SE por administração de lítio-pilocarpina, foi possível visualizar a expressão da proteína c-Fos em até 2 minutos após o início das primeiras crises eletrográficas, no córtex piriforme, hipocampo e amígdala, e então, espalhando para demais estruturas cerebrais dentro de 30 minutos. A expressão de c-Fos nessas regiões pode ser explicada pela alta densidade

de receptores muscarínicos em neurônios dessas estruturas. Assim os autores consideram que das áreas estudadas, em especial o córtex piriforme, poderia ser a primeira estrutura potencialmente envolvida na geração e disseminação das crises.

Os animais que desenvolveram o SE do tipo I, mais grave, apresentaram ampla e forte marcação de c-Fos nos vários núcleos da amígdala ipsi e contralateral ao lado estimulado (**Figura 10 A**). Alguns estudos em modelos animais de ELT sugerem o papel da amígdala como substrato de crises (Pitkanen, 1998; Pereno *et al.*, 2011). Utilizando o modelo de SE após injeção de Ácido Caínico, Pereno *et al.*, (1998), demonstraram que ocorre um pico na expressão de c-Fos nos vários núcleos amigdalóides 2 a 4 horas após início do SE, discutindo que, essa estrutura está associada à disseminação e manutenção da crise (Pereno *et al.*, 2011). Outros modelos também mostram expressão de c-Fos na amígdala durante a generalização de crises, após indução do SE por administração de PTZ (André *et al.*, 2004) ou após administração intraperitoneal PILO (Motte *et al.*, 1998; Fabene *et al.*, 2004) revelando um papel importante dessa estrutura na geração, disseminação e manutenção de crises envolvendo o lobo temporal. Sendo assim, a estimulação elétrica da amígdala feita por nós se mostrou bastante eficiente em recrutar diversas outras áreas cerebrais, gerando crises e apresentando papel chave na disseminação e manutenção das crises epiléticas límbicas.

O hipocampo tem sido apontado como uma estrutura crucial para ocorrência das ELT, visto que sua atrofia denominada esclerose hipocampal, é uma das principais características morfológicas cerebrais associadas a esse tipo de epilepsia em pacientes humanos (Olney, 1984). O hipocampo faz parte de uma circuitaria neuronal que parte do córtex entorrinal, enviando conexões às células granulares do giro denteado do hipocampo através da via perfurante, principal via excitatória aferente hipocampal. Entre o córtex entorrinal e a amígdala há conexões aferentes e eferentes. A amígdala envia conexões a regiões hipocampais tais como giro denteado, *hilus* do giro denteado e CA3, a partir de seus núcleos lateral, basal e acessório basal (Nissinen *et al.*, 2000). Sendo assim, a estimulação do complexo amigdalóide recruta rapidamente o cortex entorrinal e assim o hipocampo.

Utilizando modelos químicos como de Litio-Pilocarpina, Motte *et al.*, (1998), encontraram rápida e forte marcação de c-Fos em células granulares do giro denteado, bem como moderada marcação em células do *hilus* e em CA3 e CA1. No caso desse

modelo, esta rápida e forte marcação se explica devido a grande densidade de receptores muscarínicos em neurônios dessas regiões.

Heish & Watababe, 2000, mostraram em animais que sofreram estimulação elétrica da amígdala basolateral apresentaram status auto-sustentado com diferenças comportamentais quando comparadas às diversas gravidades de crises. O grupo de animais que apresentaram status com índices de gravidade de crise baixo predominando entre 1 e 2 (Racine, 1972) podendo apresentar comportamento ambulatório, apresentaram pouca/fraca marcação de c-Fos no hipocampo. O outro grupo de animais apresentaram comportamento de crises graves variando entre 4 e 6, tiveram um forte imunorreatividade de c-Fos hipocampal. Os autores associam a fraca ativação hipocampal com a falta de generalização da crise, apontando o papel central na propagação e manutenção das crises. Esse mesmo padrão de marcação está sendo mostrado por nós em nossos resultados, mostrando assim o papel crucial do hipocampo na generalização, propagação e manutenção das crises no modelo de estimulação elétrica da amígdala. A capacidade desse grupo de animais em impedir a forte ativação hipocampal no momento de estimulação elétrica ou a propagação do estímulo do giro denteado para CA3 e então CA1 ou para o hipocampo contralateral, está diretamente relacionada a sua expressão de um comportamento menos grave, impedindo que a crise se evoluisse para índices mais graves.

A expressão da proteína c-Fos é geralmente relacionada à atividade funcional dos neurônios (Dragunow & Robertson, 1988). Em contra partida, áreas com altos níveis de atividade neuronal, como por exemplo, córtices visuais e auditivos não apresentam níveis significativos de expressão de c-Fos, revelando assim que atividade “basal” sozinha não é suficiente para induzir o aumento na expressão de genes de resposta imediata, como no caso do gene *c-fos*. Em vista disso, alguns estudos têm demonstrado que a expressão de c-Fos depende de características temporais dos padrões do potencial de ação e que diferentes estruturas cerebrais apresentam diferentes limiares. Vários fatores vêm sendo demonstrados atuarem na indução da expressão de c-Fos, tais como: fatores neurotróficos, neurotransmissores, despolarização e aumento do influxo Ca^{2+} e elevação da concentração intracelular/intranuclear de Ca^{2+} (Morgan & Curran, 1989; Kovács, 1998).

Durante a transmissão sináptica, a entrada de íons cálcio no terminal pré-sináptico é o gatilho para liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Embora a participação do Ca^{2+} na liberação de neurotransmissores seja bem aceita, acredita-se que o Ca^{2+} esteja presente em outros eventos neuronais, tais como, sobrevivência, crescimento axonal e plasticidade sináptica LTP. Há dois principais mecanismos nos quais os níveis de Ca^{2+} aumentam no compartimento intracelular, através do influxo extracelular por canais de cálcio dependentes de voltagem na membrana plasmática ou por liberação de reservas internas presentes no retículo endoplasmático liso (REL) (Ghosh & Greenberg, 1995). O cálcio também atua como importante regulador da expressão gênica, através do elemento de resposta do AMP cíclico (*CRE*). Aumentos nos níveis de cAMP em neurônios resultam na ativação de c-Fos via *CRE* (Sheng *et al.*, 1990; Kovács, 1998). Sendo assim, a expressão de c-Fos pode ser influenciada pela concentração de Ca^{2+} intranuclear devido à grande quantidade de estímulos recebidos pelos neurônios no momento das crises epiléticas.

9.3. Resultados Neurodegeneração

A técnica de Nissl foi utilizada nas lâminas com os objetivos de avaliar a integridade do tecido a ser analisado, verificar a posição dos eletrodos e somando à imunohistoquímica para *Neuronal Nuclei* (NeuN), estudar a existência de lesões teciduais decorrentes do status. Esses estudos foram feitos durante o projeto de Doutorado da Cristiane Queixa Tilelli, 2003 e publicados posteriormente (Tilelli *et al.*, 2005). Nesse presente estudo foi possível traçar a cinética temporal das lesões decorrentes da estimulação elétrica e do SEAS, através da histoquímica de FJC.

No grupo de animais que foram perfundidos 3 horas após a indução do SE, não foi possível observar qualquer tipo de lesão tecidual ou perda neuronal através da técnica de Nissl e NeuN. Dando continuidade a esse trabalho, analisamos a perda neuronal, neurodegeneração, através da histoquímica de FluoroJade C (FJC). Nesse mesmo grupo de animais que foram perfundidos 3 horas após SE, não foi possível observar marcação de neurônios em nenhuma área cerebral em ambos os tipos de SE (Tipo I e Tipo II), através da utilização dessa histoquímica, assim não podemos afirmar que há morte neuronal 3 horas após estimulação do status, apesar de haver várias áreas ativadas nessa janela temporal.

Tilelli *et al.*, (2005) puderam observar no grupo de animais que foram perfundidos 24 horas após SE, utilizando a histoquímica de Nissl, perdas neuronais bilaterais nos animais que apresentaram SE do tipo I (típico), no córtex piriforme e na região de CA1 hipocampal. Nos animais que apresentaram SE tipo II, foi possível somente observar lesões restritas ao córtex piriforme, sendo elas principalmente ipsilaterais ao lado estimulado.

Ao analisar as lâminas coradas com FJC, nós observamos que no grupo que sofreu SE tipo I a marcação foi mais ampla, presente bilateralmente no hipocampo, neocórtex, amígdala, córtex piriforme e córtex entorrinal. Já no grupo que sofreu SE tipo II, que apresentou comportamento mais brando, as poucas células marcadas estavam principalmente restritas ipsilaterais ao lado estimulado (esquerdo). Através de uma análise semi-quantitativa validada por três observadores, pudemos comprovar que a marcação de neurônios em neurodegeneração, foi estatisticamente diferente na formação hipocampal (**Figura 14**), quando comparamos os dois tipos de SE, sendo maior no SE tipo I em relação ao tipo II (**p=0.0092). De acordo com o $p < 0.05$,

Student *t* test (**Tabela 3**). Análise qualitativa das áreas estudadas e a expressão de c-Fos e FJC encontradas em cada área analisada, está expressa na **Tabela 4**. Os animais controle não apresentaram quaisquer células FJC⁺.

Tabela 3. Mapeamento de c-Fos e FJC nos diferentes tipos de SE tipo I (Típico) e SE tipo II (Ambulatório). Podemos observar que todas as áreas estudadas apresentaram certo grau de ativação e neurodegeneração, com tendências de valores maiores para SE tipo I em comparação com SE tipo II. O * representa áreas estatisticamente diferentes de acordo com *Student t-test* (* $p < 0.05$).

	c-Fos		FJC	
	SE-I	SE-II	SE-I	SE-II
Amígdala	4 (4-4)*	2 (1.5-4)	2 (0-3)	2 (0-3)
Hipocampo	4 (2-6)	2 (0-6)	1 (0-6)*	0 (0-0)
Neocortex	4 (2-6)*	2 (0-4)	0 (0-2)	0 (0-0)
Córtex Piriforme	5 (0-6)	3 (2.25-5.25)	0.5 (0-1.25)	1 (0-3)
Córtex Entorrinal	4 (4-6)	4 (3-4)	4 (2-4)	3 (2-3)

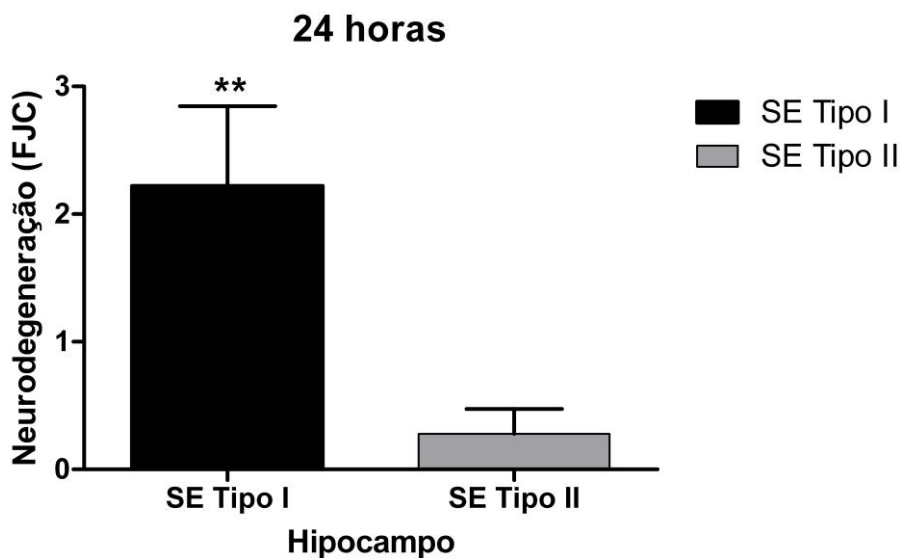
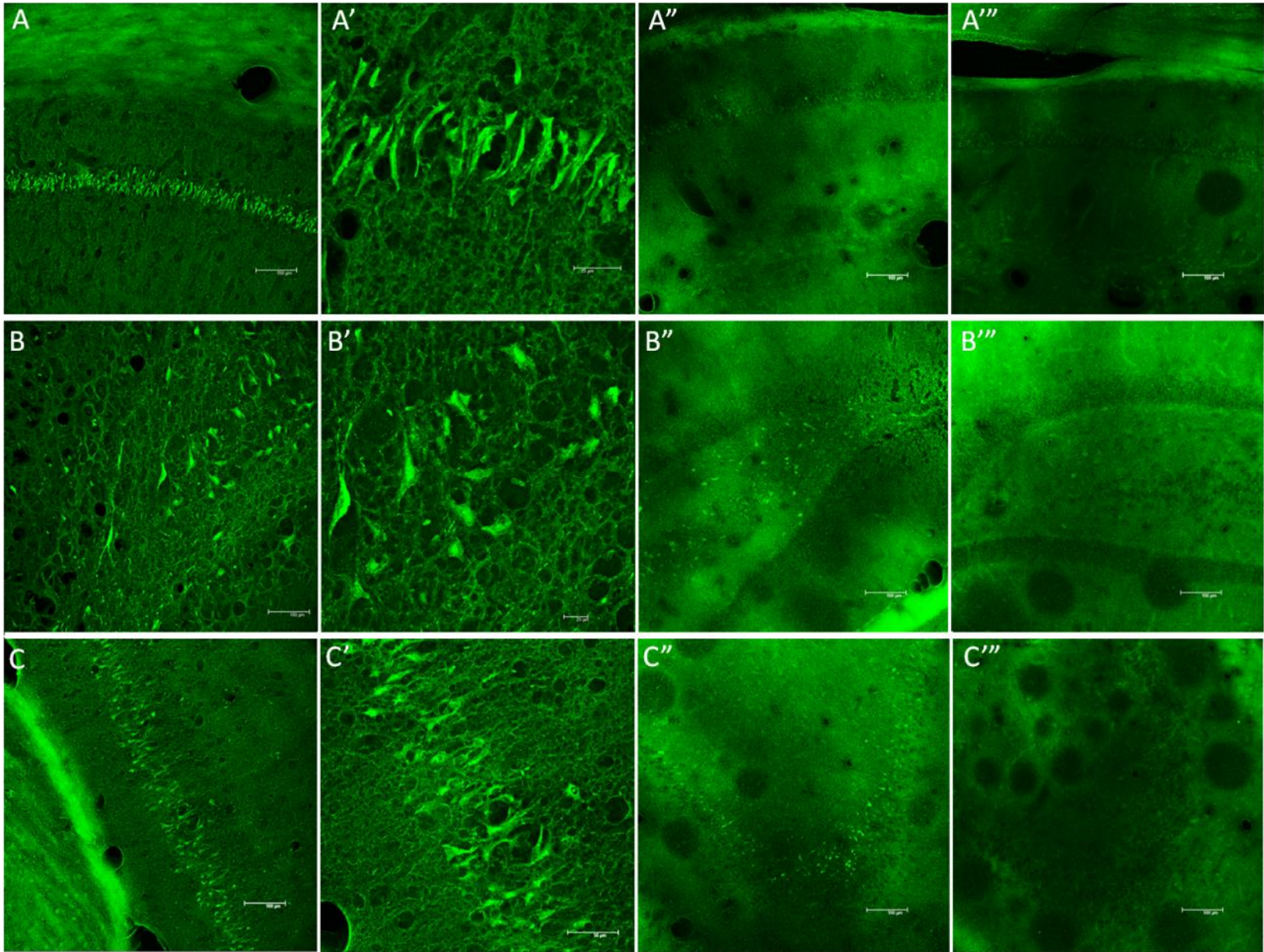


Figura 14. Animais que sofreram SEAS mais grave (SE tipo I) apresentam maior neurodegeneração hipocampal FJC⁺ em relação com aqueles que apresentaram índice de comportamento de crises mais baixo (SE tipo II). ** $p = 0.0092$, Student *t-test*.

Tabela 4. Distribuição qualitativa na expressão de c-Fos nos dois tipos de SE, mostrando uma predominância de marcação bilateral no grupo SE I (XX) e unilateral SE II (X). Observe a distribuição de células FJC⁺ bilateral (XX) nos animais SE tipo I, unilateralmente (X) e ausência de morte neuronal (ϕ) nas áreas estudadas dos animais tipo II.

		c-Fos		FJC ⁺	
		SE Tipo I	SE Tipo II	SE Tipo I	SE Tipo II
Complexo Amigdalóide					
	Núcleo Central	XX	XX	XX	X
	Núcleo Lateral	XX	X	XX	X
	Núcleo Medial	XX	X	XX	X
	Núcleo Basolateral	XX	X	X	XX
	Núcleo Basomedial	XX	X	XX	X
Formação Hipocampal					
	GD	XX	XX	ϕ	ϕ
	<i>Hilus</i>	XX	X	XX	X
	CA3	XX	X	XX	X
	CA2	XX	X	ϕ	ϕ
	CA1	XX	X	XX	ϕ
	<i>Subiculum</i>	XX	X	XX	ϕ
Córtex Piriforme					
	Camada II	XX	XX	XX	ϕ
	Camada III	XX	X	XX	X
Córtex Entorrinal					
	Camada II	XX	XX	XX	X
	Camada III	XX	X	XX	X
	Camada profunda	XX	XX	XX	X
Neocórtex					
	<i>Barrel Field</i>	XX	X	X	X
	<i>S2</i>	XX	X	X	ϕ
	<i>IG-CG1</i>	XX	X	XX	ϕ

Figura 15. Histoquímica para FluoroJade C, revelando células em processo de degeneração na formação hipocampal (A- CA1, B- Giro Denteado e C- CA3), podemos notar uma maior marcação na primeira (A, B e C) e segunda coluna (A', B' e C' - *zoom*), mostrando os animais que sofreram SE tipo I, mais grave. Já as colunas duas linhas (A'', B'' e C'') e três linhas (A''', B''' e C'''), estão mostrando os lados ípsi e contralateral, respectivamente, dos animais que sofreram SE tipo II, mais brando, onde podemos notar pouca marcação do lado estimulado e ausência de células marcadas no hemisfério contralateral a estimulação. Barra de calibração 100 μm , *zoom* 50 μm .



As demais áreas estudadas apresentaram semelhante marcação nos dois tipos de status, com padrão bilateral nos animais do tipo I e ipsilateral nos animais do tipo II. Apesar dessa nítida diferença de padrão de marcação, não encontramos diferenças estatísticas entre os dois tipos de status através das análises feitas.

Os grupos de animais perfundidos 14 dias após a indução do SE, foram processados para imunofluorescência para NeuN, para análise de perda neuronal em áreas cerebrais. Nos animais controle, juntamente com os animais do grupo SE tipo II, a técnica revelou semelhante distribuição e quantidade de neurônios na camada polimórfica do giro denteado - *hilus* mostrando um número significativo de neurônios nessa região (**Figura 16, A e B**). No grupo de animais SE tipo I, podemos observar a diminuição da significativa de neurônios do *hilus* do giro denteado (**Figura 16, C e D**).

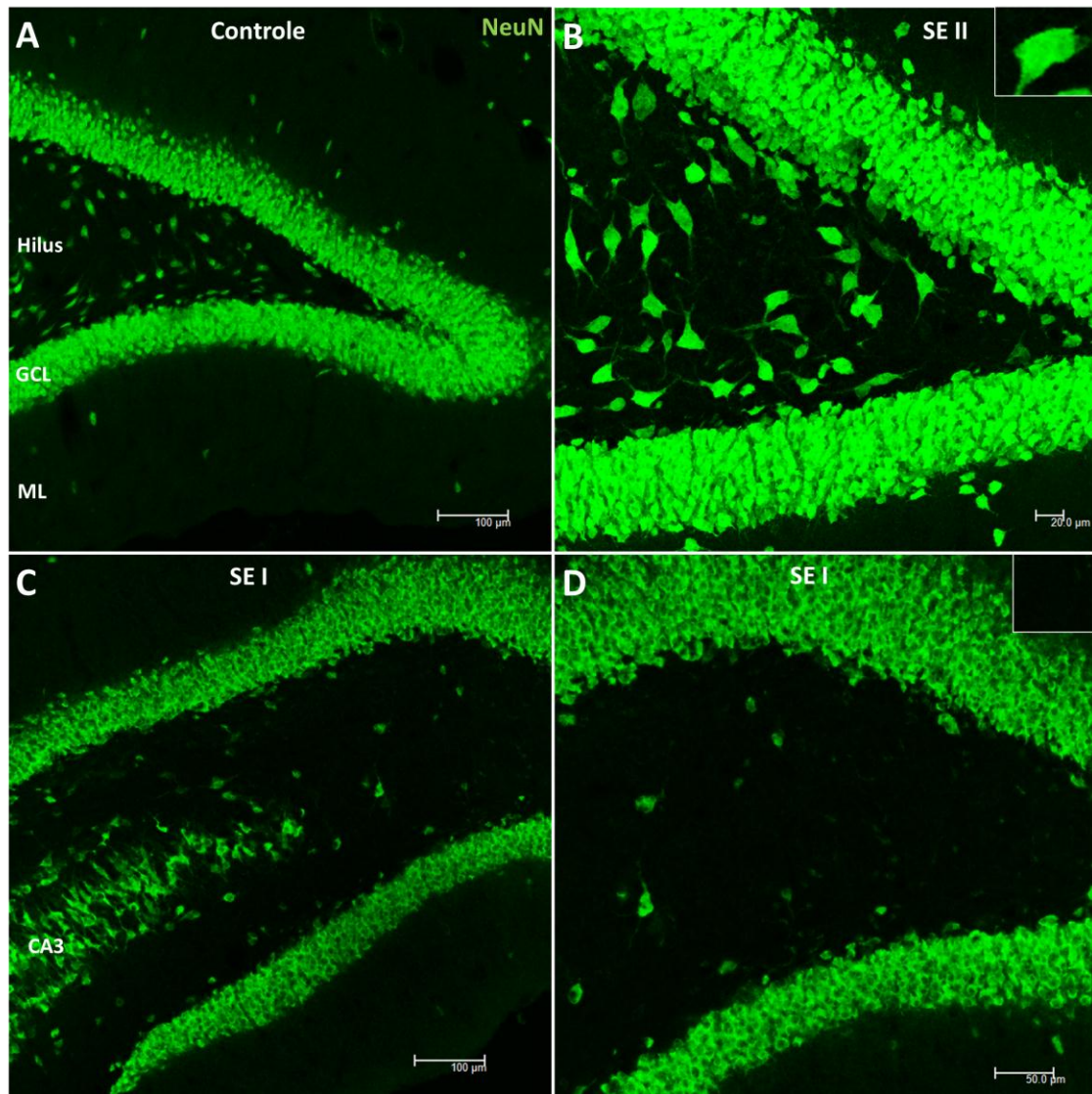


Figura 16. Imunofluorescência para marcador neuronal mostrando que animais controle juntamente com os animais que apresentaram comportamentos de crise mais brandos, apresentaram semelhante marcação de neurônios NeuN⁺ no *hilus* (células NeuN⁺), onde podemos ver um número significativo de células (A e B). No grupo de animais SE tipo I (C e D) podemos notar diminuição de neurônios marcados no *hilus*, revelando morte celular nessa região. Barra de calibração A: 100 μm; B, 20 μm; C, 100 μm e D, 50μm.

9.4. Discussão

Epilepsia de lobo temporal é o tipo mais comum de epilepsia em adultos humanos, caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento de crises recorrentes espontâneas de origem temporal e patologicamente caracterizada pela morte neuronal hipocampal, e pode vir acompanhada pelo brotamento de fibras musgosas (McNamara, 1994). Além da presença do foco epiléptico estar presente em alguma estrutura do lobo temporal, uma característica marcante desse tipo de epilepsia, é presença de um insulto inicial seguido de um período latente variado, onde podem ocorrer diversas alterações plásticas moleculares estruturais promovendo, mais adiante, o surgimento de recorrentes crises convulsivas espontâneas (McNamara, 1994, 1999).

Muitos pacientes com ELT, na necropsia ou após remoção cirúrgica de tecido epiléptico, apresentam como característica atrofia e redução do volume hipocampal, geralmente acompanhada de morte neuronal, referida como Esclerose Hipocampal (Liu et al., 1994; Engel, 2001; Olney, 1984). A patogênese dessa lesão tem sido de considerável importância no debate que gira em torno da pergunta; “a lesão representa uma causa ou um efeito das crises epilépticas”. Para tentar elucidar essa pergunta, é necessário entender os processos por trás da epileptogênese. Vários são os modelos animais de SE que estimulam os animais causando uma crise inicial grave e longa o bastante na tentativa de provocar alterações plásticas cerebrais capazes de causar crises epilépticas espontâneas após um período latente que pode variar de dias a meses ou anos.

O presente estudo demonstra que *status epilepticus* auto-sustentado causado pela estimulação elétrica da amígdala causa um perfil característico de morte neuronal no hipocampo, marcado através da histoquímica de FJC. As áreas hipocampais que apresentaram significativa perda neuronal foram *hilus* do giro denteado, CA3 e CA1, com relativa preservação das células granulares do giro denteado e de CA2. O FJC mostrou ser uma ótima técnica para marcação de células em degeneração nesse tipo de modelo para crises epilépticas, assim como já visto em outros modelos químicos (Schmued et al., 1997; Furtado et al., 2010; Castro et al., 2011).

A duração de 90 minutos de SE é tempo suficiente para provocar lesão em diversas áreas cerebrais (Meldrum, 1973; Kubova et al., 2002; Furtado et al., 2010; Castro et al., 2011). Essa duração no SE, faz a sobrevivência dos animais crescerem exponencialmente, quando comparado a tratamentos em que os animais permanecem

em SE até que ocorra remissão espontânea (Tilelli *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2011).

Extensiva morte neuronal em áreas cerebrais como neocortex, tálamo e hipocampo tem sido reportada por vários estudos utilizando a administração de Pilocarpina, na geração de SE, tanto por aplicação sistêmica quanto intrahipocampal (Tursky *et al.*, 1984; 1989; Furtado *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2011).

Diferentes padrões de marcação podem ser observados em diferentes janelas experimentais nos modelos de ELT. Castro *et al.*, (2011), mostraram que a neurodegeneração hipocampal segue uma cinética temporal e espacial. Células presentes no *hilus* do giro denteado apresentam neurodegeneração em janela temporal anterior a células de CA3 que se neurodegeneram antes de neurônios presentes em CA1, seguindo assim a via tri-sináptica na qual a informação é transmitida dentro da formação hipocampal *hilus* do GD-CA3-CA1.

Analisando separadamente os dois tipos de SE encontrados nesse estudo, encontramos distintos padrões de morte neuronal, através da histoquímica de FJC (Figura 15). Nos animais que apresentaram comportamentos de crises mais graves, a marcação de células FJC+ se mostrou claramente mais ampla e distribuída por estruturas em ambos os hemisférios cerebrais (por exemplo, hipocampo, córtex entorrinal e córtex piriforme). No grupo de animais que apresentaram crises menos graves, apresentaram morte neuronal restrita ao lado estimulado. Assim a gravidade das crises durante o SE está diretamente ligada a quantidade de células em degeneração 24 horas depois. Animais com crises mais graves apresentam mais neurônios morrendo em ambos os hemisférios cerebrais.

Embora alguns estudos em roedores mostram que uma ou poucas crises clônicas são suficientes para causar morte neuronal hipocampal (Fujikawa, 2005) vários modelos químicos de indução do SE tem mostrado perda neuronal hipocampal, nas mesmas áreas observadas por nós. Olney *et al.*, na década de 80, estudando efeitos neurotóxicos por análogos de glutamato, mostraram que a indução de SE pela administração de ácido caínico, causa morte neuronal em estruturas límbicas. O glutamato é bem reconhecido como o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Os mecanismos pelos quais o ácido caínico, agonista glutamatérgico causaria morte neuronal, bem como outros agentes químicos excitatórios, pode ser explicado pela “hipótese excitotóxica”, a qual se tem revelado uma poderosa explicação utilizada para entender a indução patológica da morte neuronal em uma ampla variedade de

doenças neurológicas. De acordo com tal hipótese, a excessiva ativação de receptores NMDA glutamatérgicos em terminais pós-sinápticos, induzida pela grande liberação de glutamato pelo terminal pré-sináptico, resultaria em um excessivo influxo de cálcio (Ca^{2+}) pelos neurônios, juntamente com a deficiência da célula em tamponar o cálcio intracelular, funcionando como sinalizador para vários processos de necrose e/ou apoptose, que levariam na morte neuronal (Fujikawa, 1994, 1995; Fujikawa, 2005). Essa teoria ganha força quando administração de antagonistas de receptores NMDA, causa efeito neuroprotetor em animais mesmo após o início do SE (Clifford *et al.*, 1990; Fujikawa, 1994, 1995).

Status epilepticus, derrame cerebral e lesão cerebral são os três principais exemplos de danos cerebrais que podem levar ao desenvolvimento de epilepsias adquiridas. Esses três exemplos de lesões teciduais, a despeito de suas diferenças intrínsecas, compartilham de um mecanismo molecular comum para produzir dano cerebral: o aumento nas concentrações extracelulares de glutamato e cálcio, ambos associados à morte neuronal e dano cerebral (Choi, 1988; DeLorenzo *et al.*, 2005). O cálcio intracelular desempenha papel fundamental de mensageiro nas células. Estudos em cultura celular mostram que estimulação excitotóxica está associada com o aumento de níveis citosólicos de Ca^{2+} (Ghosh & Greenberg, 1995). Um aumento inicial rápido dos níveis de cálcio intracelulares pode desencadear uma falha na homeostase do cálcio intracelular o que levaria à morte celular (Ghosh & Greenberg, 1995). Outros estudos mostram o envolvimento do Ca^{2+} na epileptogênese, sugerindo que os altos níveis neuronais de cálcio na fase aguda sejam responsáveis pela morte neuronal, mas quando a morte não acontece, durante o período latente sua concentração permanece alterada levando a alterações plásticas duradouras nesses neurônios e que na fase crônica, continuando alta, as concentrações de cálcio sejam um dos fatores responsáveis pelas crises recorrentes espontâneas (DeLorenzo, 1998; DeLorenzo *et al.*, 2005)

O cálcio por ser uma das principais moléculas sinalizadoras nos neurônios e como tal, sua concentração livre na célula é altamente regulada. Alguns tipos neuronais específicos parecem ser especialmente vulneráveis à morte sob condições que facilitam o influxo de cálcio nas células. A homeostase desses íons no compartimento intracelular é feita principalmente por proteínas tamponantes de cálcio, tais como, parvalbumina e calretinina. A quantidade dessas proteínas nos neurônios e sua capacidade de tamponar o cálcio intracelular podem ser importantes fatores que determinam vulnerabilidade a morte celular sob condições de grande influxo de cálcio, como no caso do SE.

Em nosso trabalho encontramos ampla marcação de neurônios em degeneração no *hilus*, CA3 e CA1, com ausência de marcação em células granulares do giro denteado e em CA2. Células musgosas presentes no *hilus* do giro denteado, interneurônios de CA1 e CA3, são células pobres em proteínas tamponantes de cálcio o que pode explicar maior sensibilidade dessas populações neuronais a estímulos nocivos, tais como status levando à degeneração. Completando esse argumento, células granulares e interneurônios de CA2 são células que apresentam altos níveis de proteínas tamponantes de cálcio, tais como calbindina, quando comparadas às de CA3 e CA1 (Baimbridge & Miller, 1982), podendo explicar assim a relativa resistência dessas áreas à neurodegeneração encontrada no presente e em outros trabalhos (Castro *et al.*, 2011).

No hipocampo, a população neuronal pode ser dividida em duas amplas classes: neurônios principais, os quais são excitatórios e usam o glutamato como neurotransmissor e interneurônios que são neurônios inibitórios e usam GABA como neurotransmissor (Freund & Buzsáki, 1996; Bernard *et al.*, 1998; Witter & Amaral, 2004). Em tecido normal, células principais representam 90% da população neuronal no hipocampo e estão sob controle inibitório dos interneurônios. Em tecido epilético, neurônios principais são usualmente hiperexcitados e apesar de vários mecanismos sejam apontados como responsáveis por essa hiperexcitabilidade tecidual, os reais mecanismos envolvidos nas mudanças são desconhecidos.

Estudo feito por Sloviter em 1987, através de estimulação elétrica da via perfurante, mostrou morte neuronal de interneurônios inibitórios (somatostatina positivas – SST⁺) presentes no *hilus*, produzindo o aumento no balanço excitatório hipocampal, levando a atividade de crise. A morte desses neurônios inibitórios, supostamente GABAérgicos seria responsável por levar ao aumento da excitabilidade no circuito hipocampal através da falta de inibição das células granulares, o que levaria ao surgimento das crises recorrentes espontâneas. Analisando dados sobre a circuitaria hipocampal, existem hipóteses debatidas na literatura a respeito da epileptogênese na fascia dentata em decorrência à morte neuronal. Uma hipótese defendida por Sloviter na década de 90 sugere que, os neurônios em cesto GABAérgicos (*basket cells*) são menos susceptíveis à morte neuronal induzida por crises epiléticas do que demais interneurônios, tais como, os imunopositivos para somatostatina e as células musgosas. Com a morte das células musgosas, que estimulam excitatoriamente as células em cesto, que por sua vez, estimulam inibitoriamente as células granulares, haveria uma redução dos estímulos excitatórios para as células GABAérgicas deixando-as em estado

“dormente” e assim as células granulares perderiam o tônus inibitório das células em cesto. Esta teoria, chamada “teoria das células em cesto dormentes” propõe que a diminuição da atividade das células GABAérgicas ocasionaria um desequilíbrio nos circuitos hipocampais com redução da inibição (Sloviter, 1991). Embora não possamos afirmar diretamente que ocorreu perda de neurônios somatostatina positivos, encontramos perda de neurônios no *hilus* 14 após SE (Figura 16), o que poderia se encaixar com a teoria acima descrita (Sloviter, 1987; 1991).

Um estudo em tecido retirado de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento farmacológico, mostrou que ocorre preservação de células granulares calbindina positivas (CB^+), demonstrando certa resistência dessas células à morte devido a crises epiléticas (Maglóczy *et al.*, 2000). Apesar de, na análise da expressão de c-Fos, as células granulares (CB^+) apresentarem alta taxa de expressão de marcador para atividade celular, não encontramos células FJC positivas 24 horas após SEAS, revelando alta resistência dessas células à morte neuronal estimulada pelas crises, corroborando assim com dados de pacientes e em outros modelos animais de ELT (Maglóczy *et al.*, 2000; Sloviter *et al.*, 1991; Castro *et al.*, 2011). O local que encontramos perda neuronal foi no *hilus*, local abundante de células inibitórias calretinina (CR^+) positivas, que no estudo de Maglóczy *et al.*, (2000), encontraram redução significativa dessas células no *hilus* de pacientes. Isso demonstra que, essas células são mais vulneráveis a lesão em decorrência das crises o que pode levar a um desbalanço no tônus inibitório dessa região deixando o tecido mais susceptível às crises.

10. Conclusões

- ✓ Animais que apresentaram comportamentos de crises mais brandos, apresentaram expressão de c-Fos ipsilateral.
- ✓ Animais que apresentaram comportamentos de crises mais graves, SE tipo I, apresentam expressão bilateral de c-Fos.
- ✓ Animais que apresentaram comportamentos de crises mais brandos, apresentaram neurodegeneração em áreas ipsilaterais ao lado estimulado.
- ✓ Animais que apresentaram comportamentos de crises graves, apresentaram neurodegeneração em áreas bilaterais ao lado estimulado.
- ✓ Neurônios presentes no hilus, CA3 e CA1 são mais susceptíveis a neurodegeneração após insulto epileptogênico.
- ✓ Neurônios presentes no giro denteado e CA2 são mais resistentes à morte celular por insulto epileptogênico.

Um dos objetivos da primeira parte desse trabalho foi relacionar as áreas ativadas (c-Fos⁺) durante o SE e correlacioná-las com as áreas em neurodegeneração (FJC⁺). Dessa maneira, poderíamos estabelecer uma relação entre áreas que estão ativas e relacioná-las com os comportamentos durante a crise, e se, essas áreas em uma janela temporal futura, sofreriam neurodegeneração, podendo afirmar assim que a expressão de c-Fos serve como um “preditor” de neurodegeneração. Ao analisar nossos dados **não** podemos afirmar que o c-Fos pode ser considerado como um preditor de morte e nem de sobrevivência celular, sendo que as áreas ativadas podem ou não sofrer morte neuronal 24h horas após SE. No caso de células granulares do giro denteado e CA2 (duas áreas extremamente resistentes à injúria) que estão entre os grupos celulares que mais expressaram c-Fos, não encontramos células em degeneração em nenhum animal dos grupos experimentais, revelando assim que o c-Fos é uma ferramenta que pode ser utilizada para mostrar quais grupos neuronais estão presentes no momento da crise e estão relacionadas com os comportamentos expressos, mas a morte neuronal está ligada a outros fatores tais como excitotoxicidade por influxo excessivo de cálcio e a ausência de proteínas tamponantes de cálcio, tais como, calbindina e parvalbumina (Fujikawa, 2005).

Encontramos que diversas áreas estavam ativas durante os comportamentos de crises e quando comparamos os dois grupos de animais que apresentaram índices comportamentais distintos, encontramos que havia diferença na expressão de fos em duas áreas, amígdala e neocortex, mas essas mesmas áreas não apresentaram diferenças na quantidade de morte neuronal analisada 24 horas depois, já a área que apresentou morte neuronal estatisticamente significativa, foi a formação hipocampal, que apesar de apresentar marcação para c-Fos, esta não foi diferente entre os grupos.

Outras áreas como *hilus* do giro denteado, CA3 e CA1 apresentaram expressão de c-Fos no período agudo após a crise (3 horas), marcação para FJC (24 horas) marcador de neurodegeneração e perda neuronal (14 dias) por ausência de marcação para NeuN mostrando que essas áreas são mais vulneráveis a estímulos externos, tais como, SE.

Assim podemos afirmar que, todas as áreas envolvidas nos comportamentos de crises apresentam a expressão de c-Fos, mas se essas áreas vão apresentar neurodegeneração algum tempo depois, são outros fatores envolvidos e não podemos utilizar o c-Fos como ferramenta de predição de morte neuronal.

Outro fator importante que encontramos é que a quantidade de células em degeneração está associada diretamente com a severidade das crises durante o SE, assim os animais que apresentaram índices de gravidades maiores tiveram mais neurônios morrendo 24 horas após as crises. Os animais do grupo II que tiveram índices menores, apresentaram menor número de células em degeneração, principalmente no hipocampo.

CAPÍTULO 2 – UM NOVO COMEÇO - NEUROGÊNESE

11. Um novo começo - Neurogênese

Ramon y Cajal, 1913, utilizando a técnica de Golgi para estudar tecido nervoso, concluiu que os neurônios eram formados exclusivamente durante o período pré-natal do desenvolvimento, cessando após o nascimento e não ocorrendo em mamífero adulto. Após os estudos de Cajal, tornou-se um “dogma” para a neurociência que “neurônios não se dividem após o nascimento”, sendo mantido por quase um século (Gross, 2000). Com o desenvolvimento de novas técnicas, no início da década de 60 Altman e colaboradores, publicaram uma série de artigos mostrando que ocorria geração de novos neurônios em várias regiões do cérebro adulto, incluindo hipocampo (Altman & Das, 1965), néocortex (Altman & Das, 1966) e bulbo olfatório (Altman, 1969). Apesar de estes estudos terem sido publicados em revistas de grande impacto na época, Science, por exemplo, tiveram pouca repercussão e aceitação pela sociedade científica, devido a vários fatores. A utilização da técnica de $[H^3]$ -Timidina, um composto radioativo análogo à timidina, incorporado pelo DNA durante a fase S do ciclo celular, teria muitas variáveis e falhas que poderiam interferir na sua incorporação pelas células e na revelação por auto-radiografia. A grande dificuldade em mostrar que as células marcadas com a timidina realmente teria se transformado em um neurônio e não em glia também foi um problema questionado na época (Gross, 2000; Ming & Song, 2005).

Passados vários anos dos trabalhos de Altman, já na década de 80, Kaplan *et al.*, 1981, conjugando a técnica de $[H^3]$ -Timidina e microscopia eletrônica, mostraram que células marcadas com $[H^3]$ -Timidina encontradas no giro denteado e na parede dos ventrículos laterais apresentavam morfologia de neurônios, tais como dendritos e sinapses (Gross, 2000). No final da década de 80 e início dos anos 90, com o avanço de novos marcadores para células em divisão, tal como o 5-Bromo-3'-Deoxyuridina (BrdU), que como a timidina radioativa, é incorporado pela células durante a síntese de DNA, mas com a vantagem de ser marcada através da técnica de imunohistoquímica, tornando-se uma técnica mais específica e confiável (Gratzner, 1982; West *et al.*, 1991). Há a possibilidade de combinar essa técnica com outros marcadores neuronais (*Neuronal Nuclei* - NeuN) e gliais (*Glial Fibrillar Acid Protein* - GFAP), provando assim que a célula estudada nasceu no dia da injeção e apresenta o fenótipo de neurônio.

No final da década de 90, a produção de novos neurônios no cérebro adulto foi demonstrada em espécies de aves a mamíferos, incluindo humanos (Paton &

Nottebohm, 1984; Nottebohm, 2004; Eriksson *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 1997; 1998;). Neurogênese é o processo de geração de neurônios funcionais a partir de células progenitoras, incluindo proliferação, diferenciação, migração e integração dos novos neurônios no circuito já existente (Ming & Song, 2005). A Neurogênese no cérebro adulto de mamíferos ocorre por toda a vida, e tem sido assim claramente demonstrada ser restrita em duas regiões neurogênicas sob condições fisiológicas normais. Essas regiões são, a zona subventricular (SVZ), dos ventrículos laterais e camada ou zona subgranular do giro dentado (SGZ). Essas regiões, conhecidas como nichos, são definidas como microambientes que mantêm e regulam as células troncos neurais (NSCs), esses microambientes fornecem fatores nutricionais para sobrevivências destas e as interações dessas com células vizinhas determinam propriedades vitais para manutenção, sobrevivência, proliferação, auto-renovação e diferenciação para outros tipos celulares (Reynolds & Weiss, 1992; Gage, 2000; Palmer *et al.*, 2000). As células progenitoras contidas nessas regiões exibem duas características que as definem como células troncos (células multipotentes), a capacidade de auto-renovação através da divisão celular e a capacidade de geração de tipos celulares especializados através da diferenciação (Gage, 2000).

O processo de neurogênese em adultos e embriões difere em pelo menos dois aspectos. No cérebro adulto procede em um ambiente que geralmente não é programado para promover a neurogênese, já que a maior parte desenvolvimento cessou após o nascimento. O desenvolvimento neuronal em adultos precisa de proteção de influências anti-neurogênicas do tecido neuronal adjacente e requer a manutenção de um microambiente favorável ao desenvolvimento dos novos neurônios (Palmer *et al.*, 2000; Kempermann *et al.*, 2004). Outro aspecto importante, no hipocampo adulto pode ser encontrado neurônios em diferentes estágios de desenvolvimento, assim a neurogênese no adulto é um processo individualizado e não um evento populacional. Esse segundo fator é importante devido ao fato da população nos nichos são heterogêneas, assim podemos encontrar células em diferentes estágios de desenvolvimento, podemos ter diferentes respostas a diferentes estímulos fisiológicos, e assim é necessário haver uma complexa circuitaria envolvida na sua regulação (Kempermann *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de novos neurônios no cérebro adulto só é possível devido à retenção de células tronco neurais (NSC) presentes em nichos específicos no SNC. A zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais é responsável por formação de novos neurônios que migram através da Via Migratória Rostral (*Rostral Migratory Stream* -

RMS) para o bulbo olfatório, onde se diferenciam em células granulares e periglomerulares se inserindo na circuitaria (Doestch & Alvarex-Buylla, 1996; Gage *et al.*, 1998; Gage, 2000; Ming & Song, 2005; Arisi *et al.*, 2011; Ming & Song, 2011) (**Figura 17**). Nessa região os novos neurônios que se inserem no sistema, parecem contribuir para mecanismos adaptativos ligados às representações dos odores respondendo a novos estímulos olfatórios (Ming & Song, 2011; Arisi *et al.*, 2011)

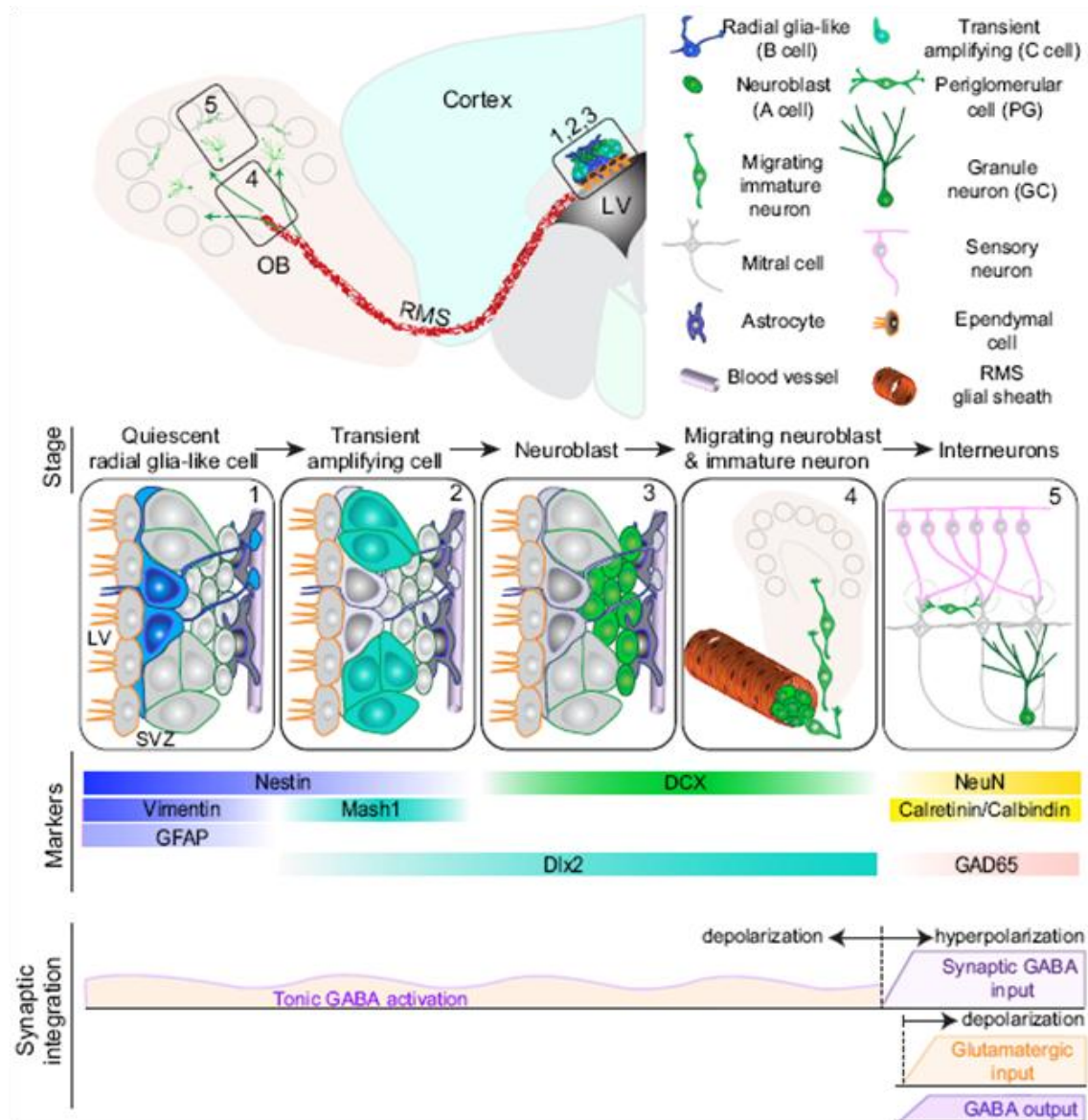


Figura 17. Neurogênese na camada subventricular. (Ming & Song, 2011).

Outro local que retém células progenitoras provenientes da fase de desenvolvimento é na camada ou zona subgranular (SGZ) do giro denteado. Um modelo para o desenvolvimento dessas células até a formação de neurônios granulares maduros

foi proposto por Kempermann *et al.*, 2004 e consiste em 6 etapas. A primeira etapa consiste na proliferação das células tronco (células Tipo 1 ou células gliais radiais) pelo processo de mitose. Essas células apresentam soma triangular e um longo dendrito apical que alcança a camada molecular interna. Essas células retem algumas características semelhantes à astrocitos, propriedades eletrofisiológicas e marcação para GFAP. Especula-se que essas células dão origem tanto a neurônios como a glia (gliogênese). Essas células se dividem de forma assimétrica e as células filhas podem permanecer com as mesmas características (células Tipo-1) ou apresentarem morfologia diferente e são nomeadas como células Tipo-2. As células Tipo-2, são negativas para GFAP, positivas para Nestin e apresentam denso núcleo desmórfico. Estas células são divididas em duas subcategorias, as que são negativas para marcador de neurônios imaturos Doublecortin (DCX, Tipo-2a) e as positivas para DCX (Tipo-2b), ambas altamente proliferativas. As células Tipo-3 são igualmente positivas para DCX, positivas para Ki-67 (marcador de proliferação celular expresso no núcleo das células durante as fases de divisão do ciclo celular, G1, S e G2), mas negativas para nestin e também altamente proliferativas. Esse terceiro tipo de célula progenitora apresenta núcleo redondo e correntes de Na^+ , e assim, acredita-se que essas células apresentam avançadas características de neurônios. A expressão de DCX persiste e as células tornam-se pós-mitóticas em processo de maturação neuronal (neuroblastos). Os neuroblastos apresentam expressão transitória de Calretinina que futuramente dará origem à expressão de Calbindina, característica de algumas células granulares adultas (Kempermann *et al.*, 2004; Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006).

Com 10 a 14 dias após nascimento, os novos neurônios começam apresentar morfologia parecida com neurônios granulares maduros, apresentando dendritos curtos que alcançam a camada molecular interna e alcançando o final da camada molecular externa por volta do vigésimo primeiro dia. Ao mesmo tempo em que o dendrito cresce, o axônio (fibras musgosas) dos novos neurônios cresce através do hilus em direção a CA3, alcançando as células piramidais nessa região por volta do décimo sexto (16°) dia após nascimento (Zhao *et al.*, 2006). Com 4 semanas os neurônios granulares jovens mostram evidências de estarem totalmente maduras e inseridas no sistema expressando marcadores de neurônios granulares maduros (Calbindina, Prox-1 e NeuN) (van Praag *et al.*, 2002) e propriedade eletrofisiológicas específicas de neurônios granulares maduros (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006). Embora novos neurônios granulares, sejam fisiologicamente indistinguíveis dos neurônios granulares maduros

vizinhos após 7 semanas, parecem continuar formando novos ramos dendríticos e espinhos aumentando a complexidade de suas eferências até o 4º mês (Zhao *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2006). Neurônios granulares imaturos começam a receber aferências GABAérgicas excitatórias, nas primeiras duas semanas de vida, assim como na fase embrionária. Após esse período surgem novas aferências glutamatérgicas excitatórias e o GABA se torna inibitório. As aferências GABAérgicas tem papel fundamental na maturação e integração dos neurônios jovem no circuito (Ge *et al.*, 2006).

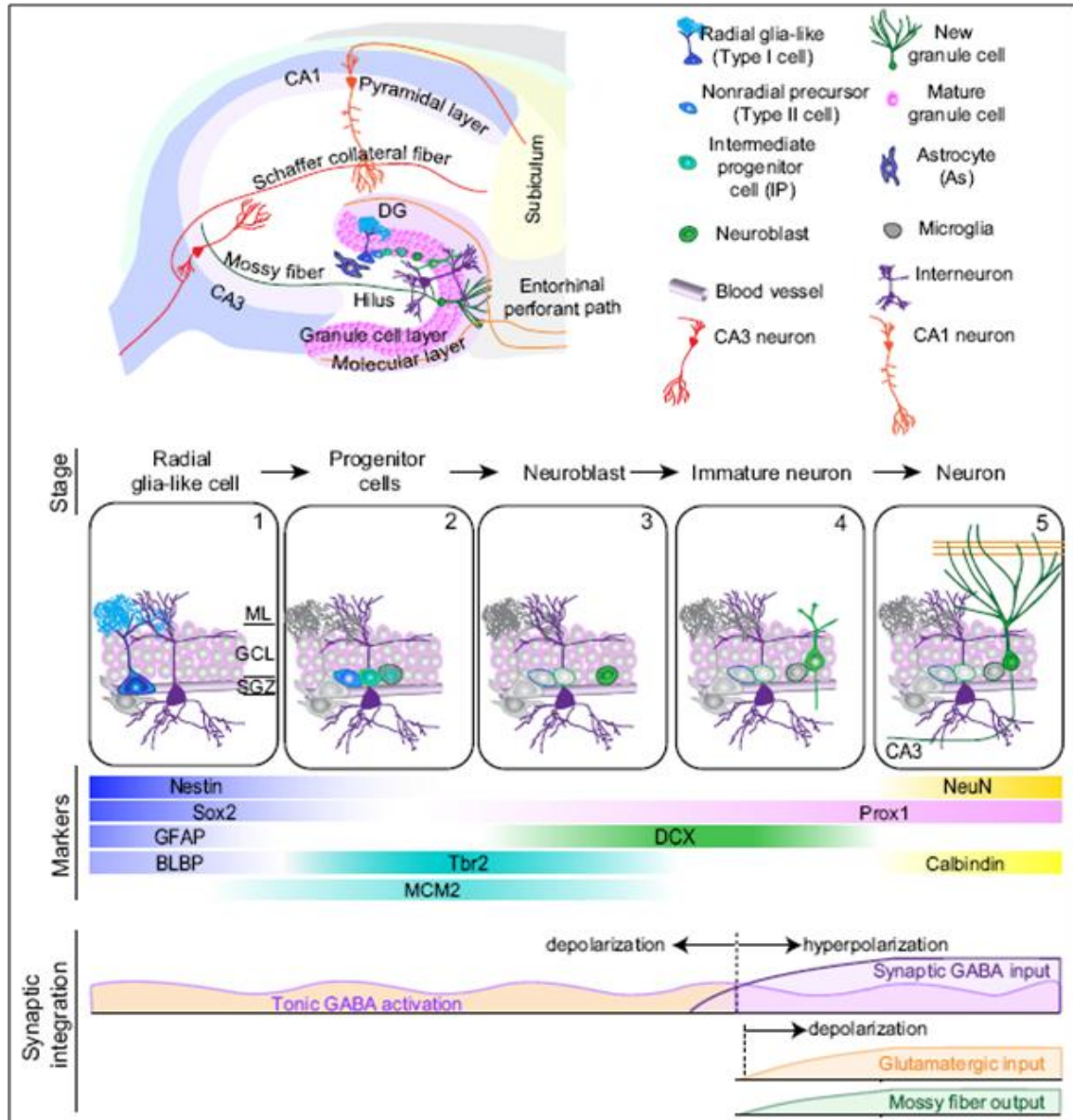


Figura 18. Detalhamento do processo de neurogênese na camada subgranular do giro dentado. (Ming & Song, 2011).

As áreas neurogênicas do sistema nervoso (SVZ e SGZ) são altamente innervadas por vários tipos de neurônios. Neurotransmissores liberados por terminações nervosas são usados principalmente para comunicação entre neurônios, mas alguns recentes estudos também identificaram um novo papel para os neurotransmissores nessas regiões como moléculas que apresentam significativas funções no controle de vários aspectos do SNC durante o desenvolvimento e no cérebro adulto. Dentre essas várias funções, os neurotransmissores apresentam papéis primordiais no controle da neurogênese. O GABA, principal neurotransmissor inibitório no cérebro adulto, apresenta papel chave na proliferação, migração, diferenciação e formação de sinapses em neurônios jovens no cérebro adulto. Nas células progenitoras e nos neurônios imaturos, assim como no cérebro em desenvolvimento, o GABA atua como neurotransmissor excitatório nos estágios iniciais de maturação e como neurotransmissor inibitório nas células granulares maduras (Ge *et al.*, 2006; Suh *et al.*, 2009; Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006). O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, regula vários passos da neurogênese no cérebro adulto. Bloqueio ou antagonismo dos receptores de glutamato, assim como lesão em neurônios do córtex entorrinal, principal via excitatória que inerva o GD, aumentam drasticamente a proliferação celular na SGZ (Cameron *et al.*, 1995). A serotonina e dopamina por outro lado apresentam papel positivo no aumento da neurogênese tanto na SGZ quanto na SVZ (Gould, 1999; Suh *et al.*, 2009). Administração de antidepressivos seletivos na diminuição da recaptação de serotonina, aumentam significativamente neurogênese hipocampal em animais adultos (Schiavon *et al.*, 2010).

Plasticidade estrutural hipocampal é sensível a uma ampla gama de experiências, muitas das quais, parecem ter substancial efeito durante todas as fases da vida do animal. Uma gama de fatores são associados, em estimularem diretamente o aumento ou diminuição da neurogênese no cérebro adulto. Fatores fisiológicos endógenos tais como, ativação do eixo Hipotálamo-Hipofise-Adrenal (HPA) que estimulam liberação de glicocorticóides como resposta a eventos estressores, desempenham papel inibitório na proliferação e diferenciação de novos neurônios (Gould *et al.*, 1997; 1998;). Exercícios físicos voluntários como corrida e natação aumentam consistentemente a neurogênese na SGZ (van Praag *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2003). Animais mantidos em caixas com protocolos de enriquecimento ambiental, que possibilitam aumento de interação social, cognição, estímulos motores e sensoriais apresentam aumento significativo de neurogênese e a sobrevivência de novos neurônios (Kempermann *et al.*,

1997; 1998). Outros mecanismos fisiológicos apresentam ligação direta e parecem depender de processo de neurogênese para ocorrer de forma eficiente. Uma variedade de aprendizados ligados a execução de tarefas específicas demonstram dependência direta com o número de novos neurônios nascidos no hipocampo (Gould *et al.*, 1999). Notavelmente, tarefas ligadas à memória espacial em testes de *watermaze* apresentaram ligação direta com o aumento de neurogênese hipocampal e sobrevivência de novos neurônios (Gould *et al.*, 1999; Ehninger & Kempermann, 2006). Aprendizado também induz alterações no número e morfologia de espinhos dendríticos em novos neurônios nascidos hipocampais (Leuner & Gould, 2010).

Além de processos fisiológicos endógenos, algumas patologias são apontadas influenciarem no processo de neurogênese no cérebro adulto. O envolvimento do hipocampo na depressão e ansiedade é sugerido através de estudos utilizando ressonância magnética, demonstraram redução do hipocampo em pacientes com depressão. A administração de antidepressivos nesses pacientes promove aumento da neurogênese e do volume hipocampal, sugerindo que a habilidade de aumentar os níveis de neurogênese pode ter ação direta no tratamento dessa doença (Airan *et al.*, 2007; Schiavon *et al.*, 2010; Leuner & Gould, 2010). Neurogênese em ambas os nichos neurogênicos no cérebro adulto aumenta em modelos de isquemia focal e global. Após derrame isquêmico, novos neurônios jovens provenientes da SVZ e SGZ são capazes de migrarem para locais do insulto, embora ainda seja desconhecido o tempo de sobrevivência e integração desses novos neurônios na região afetada (Lindvall & Kokaia, 2007). Eventos patológicos que desencadeiam processos inflamatórios no cérebro parecem diminuir a quantidade de neurogênese no cérebro adulto que pode ser restaurada com administração de anti-inflamatórios (Ekdahl *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstram que atividades de crises em modelos de ELT aumentam drasticamente a proliferação de células progenitoras na camada subgranular do giro denteado, migração, diferenciação e inserção de novos neurônios na camada granular do giro denteado (Parent *et al.*, 1997; Bengzon *et al.*, 1997; Romcy-Pereira & Garcia-Cairasco, 2005; Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007; Arisi & Garcia-Cairasco, 2007). Outros trabalhos sugerem que atividades crises aceleram os estágios iniciais de maturação neuronal e a fração de células granulares geradas em resposta as crises epiléticas apresentando várias alterações morfológicas nas células granulares do

giro denteado (Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2000; Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006; Shapiro & Ribak, 2006; Arisi & Garcia-Cairasco, 2006; Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007).

As alterações morfológicas ocorridas no hipocampo após geração de SE parecem afetar de maneira diferente os vários tipos de células presentes no giro denteado e na circuitaria hipocampal. De forma transiente, nos estágios iniciais de desenvolvimento, é comum células granulares apresentarem dendrito basal, mas é raro encontrarmos essa estrutura em células granulares maduras em hipocampos de ratos (Seress & Pokorny, 1981; Ribak *et al.*, 2000; Rao & Shetty, 2004; Kron *et al.*, 2011). A expressão transiente desse dendrito sugere papel direto na orientação da célula durante o processo de migração através da camada granular do giro denteado (Shapiro *et al.*, 2008). Contudo, vários estudos demonstraram que células granulares apresentam alterações plásticas seguidas de SE, apresentando persistência do dendrito basal (Spigelman *et al.*, 1998; Ribak *et al.*, 2000). A manutenção do dendrito basal pelas células granulares maduras, está ligada diretamente ao estágio de maturação que as células se encontram no momento em que estas expostas ao SE. Células nascidas após o SE ou imaturas no momento do SE, apresentam maiores susceptibilidade as alterações plásticas e persistem na manutenção o dendrito basal no período maduro (Shapiro & Ribak, 2006; Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007; Kron *et al.*, 2011), apresentando formação de espinhos dendríticos e formação de sinapses tão cedo quanto com 4-5 dias de nascidas (Shapiro & Ribak, 2006; Shapiro *et al.*, 2007). A presença de dendritos basais nas células granulares são significativamente importantes por que eles projetam para o hilus do giro denteado e são inervados pelas fibras musgosas nessa região, criando circuitos recorrentes excitatórios (Ribak *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007). Com desestabilização do giro denteado, o circuito poderia contribuir na hiperexcitabilidade do sistema e o surgimento das crises recorrentes.

A grande maioria das células granulares estão localizadas na camada molecular do giro denteado, embora uma pequena fração dessas células podem ser encontradas no *hilus* (aproximadamente 0,1%) de ratos (West *et al.*, 1991; McCloskey *et al.*, 2005). Outra alteração morfológica hipocampal comumente observada em pacientes epiléticos e em modelos de crises de ELT, é a migração e inserção de neurônios granulares em regiões ectópicas. A inserção desses neurônios em lugares ectópicos é comumente encontrada no hilus ou na camada molecular do giro denteado de pacientes epiléticos

(Houser, 1990) e em modelos experimentais (Parent *et al.*, 1997; 1996; 2006; Scharfman *et al.*, 2000; 2004). Os neurônios granulares inseridos no *hilus* apresentam inervação inapropriada (Scharfman *et al.*, 2000; 2004) e apresentam características eletrofisiológicas similares a neurônios maduros presentes na camada de células granulares do giro denteado, podendo contribuir para desestabilização da circuitaria hipocampal (Scharfman *et al.*, 2000; 2004). Além do mais, células granulares ectópicas apresentam descargas epiléticas (*burst*) sincronizadas com neurônios piramidais em CA3, com uma assinatura temporal que sugere conexão monossináptica entre células ectópicas em neurônios piramidais de CA3 (Scharfman *et al.*, 2000; 2004). Vários estudos demonstraram que, as células que migram e se inserem em regiões ectópicas são provenientes de novos neurônios nascidos após SE (Parent *et al.*, 1997; 2006; Jessberger *et al.*, 2005).

11.1. Marcadores de Neurogênese.

Para o estudo do processo de neurogênese no cérebro adulto, descoberta na década de 60 por Altman, utilizando [H3] – Timidina (Altman, 1962), vários estudos buscam melhores e mais específicos marcadores na tentativa de melhor entendimento desse processo. Vários marcadores nos dias atuais vêm sendo descobertos e utilizados. Dentre esses marcadores o mais utilizado é a 5-Bromo-2-deoxiuridina (BrdU), um análogo a Timidina incorporado pela célula em divisão durante a fase-S do ciclo celular (Gratzner, 1982), tendo a vantagem de passar para as células irmãs após a divisão celular e, podendo assim, ser detectado através de imunohistoquímica após fixação do tecido. Porém a BrdU deve ser administrado intraperitonealmente (i.p.), no animal antes do experimento, para que ocorra a incorporação desta pela célula em divisão.

Devido a esta e outras restrições ao uso de BrdU, vários outros marcadores endógenos vem sendo utilizados no estudo de proliferação celular, dentre os quais Ki-67 é o mais utilizado (Taupin, 2007). Essa proteína está presente no núcleo de células em divisão, durante as fases G1, S e G2, e sua função ainda permanece desconhecida (Tanapat *et al.*, 1999; Scholzen & Gerdes, 2000). Assim como BrdU, essa proteína pode ser marcada através de imunohistoquímica e apresenta uma maior taxa de células marcadas em comparação ao BrdU, por ser expressa na célula durante um período maior do que aquele onde ocorre a incorporação do BrdU (Kee *et al.* 2002), permitindo uma

estimativa melhor da quantidade de células em proliferação. Para marcação de neurônios recém diferenciados alguns marcadores endógenos podem ser utilizados, sendo esses expressos em diferentes estágios de maturação do neurônio.

A proteína *Doublecortin (DCX)* é um marcador muito utilizado para neurônios imaturos, uma fosfoproteína associada à microtúbulos, expressa durante a migração e diferenciação de neurônios podendo ser utilizada no estudo da árvore dendrítica (Jin *et al.*, 2002; Nacher *et al.*, 2003; Rao & Shetty, 2004; Shapiro & Ribak, 2006; Shapiro *et al.*, 2007), bem como na morfologia desses neurônios (Rao & Shetty, 2004; Arisi & Garcia-Cairasco, 2007; Shapiro *et al.*, 2007). Assim podemos estudar os efeitos do SE na taxa de proliferação celular e na diferenciação dessas em novos neurônios como efeitos plásticos durante a epileptogênese no modelo de indução elétrica da amígdala. Outra proteína utilizada pra marcar novos neurônios é a β - III Tubulina (Tuj-1), presente no corpo celular e dendritos de novos neurônios em desenvolvimento (Parent *et al.*, 1997; Fanarraga *et al.*, 1999; Rao & Shetty, 2004, Muotri *et al.* 2005).

12. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito do Status Epilepticus no aumento da proliferação celular através do processo de mitose ocorrida na camada subgranular do giro denteado.
- ✓ Estudar a ocorrência do aumento de proliferação celular em áreas ectópicas ao giro denteado em decorrência do SE.
- ✓ Estudar o efeito do SE na produção de novas células e diferenciação dessas em novos neurônios através da expressão da proteína *Doublecortin* (DCX) na camada subgranular do giro denteado.
- ✓ Avaliar o processo de migração de novos neurônios após a indução do SE.
- ✓ Correlacionar os processos de proliferação e neurogênese com os índices de gravidade de crises encontrados nos animais durante o status epilepticus auto sustentado.
- ✓ Observar o aparecimento de células granulares no hilus do giro denteado através da migração ectópica, utilizando a expressão da proteína Prox-1.

13. Materiais e Métodos

Para estudar os fenômenos de proliferação celular e nascimento de novos neurônios decorridos da submissão dos animais ao status epilepticus auto sustentado, utilizamos imunohistoquímicas para marcar proteínas expressas em células no processo de proliferação celular (Ki-67) (Scholzen & Gerdes, 2000) e neurônios novos imaturos (DCX) (Arisi & Garcia-Cairasco, 2007) em período de migração através da camada de células granulares em direção a camada molecular.

13.1. Imunofluorescências

Nessa parte do trabalho, as imunofluorescências foram utilizadas para marcar as seguintes proteínas: proteína marcadora de proliferação celular Ki-67, proteína marcadora de neurogênese β -III Tubulina (Tuj-1), proteína marcadora de neurônios granulares Prox-1 e proteína característica de neurônios maduros *Neuronal Nuclei* – (NeuN) As secções em *free-floating* foram banhadas por 10 minutos em glicina 0,1 M diluída em PBS seguido de 2 banhos de 5 minutos em PBS. As secções foram incubadas por 1 hora em tampão bloqueio: PBS 0,1M contendo Triton X-100 0,1% (*Sigma*, São Paulo, Brasil) e 2% de soro-albumina bovina (BSA; *Sigma*, São Paulo, Brasil), em agitação branda. Elas foram então, colocadas para incubação com o anticorpo primário: *Rabbit* – α *Ki-67*, 1:4000 μ l; *Rabbit* – α *Tuj-1*, 1:4000 μ l; e *Rabbit* – α *Prox-1*, 1:1000 μ l (Gentilmente doados pelo Professor Dr. Alysson Muotri, University of California at San Diego, UCSD) e *Mouse* - α *NeuN*, 1:500 μ l; diluídos em tampão bloqueio e deixados à temperatura ambiente por 24 horas em agitação branda. A segunda parte da imuno inicia-se com 3 banhos de 5 minutos em PBS, seguidos da incubação com anticorpo secundário: *Goat* - α *Rabbit* Alexa Fluor 594 e *Goat* - α *Mouse* Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes*; Oregon, USA), utilizando diluição de 1:2000 μ l, diluído em solução bloqueio por 1 h protegidos da luz em agitação branda, seguido de 10 banhos de 5 minutos em PBS. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas, utilizando-se como meio de montagem *Fluoromount G*.

13.2. Imunohistoquímicas com DAB

Para a marcação das proteínas *doublecortin* (DCX) e Ki-67, foram processadas imunohistoquímicas reveladas através de reação com 3,3'-DiaminoBenzidina (DAB). Os cortes foram lavados em solução tampão PBS *overnight*, para remoção da solução anticongelante, devido ao longo período no qual permaneceram no *freezer*. Após as lavagens, os cortes foram incubados por 30 minutos em peróxido de hidrogênio 3% e 20% de metanol, em solução tampão PBS, sob agitação branda a temperatura ambiente. Seguiram-se em três banhos de PBS e então os cortes foram incubados em solução bloqueio contendo 0.1% de Triton e 3% de *Normal Donkey Serum* (NGS), diluídos em solução PBS tampão, para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos. Após 1 hora em solução bloqueio os cortes foram incubados com solução contendo anticorpo primário *Goat* – α *DCX*; (1 μ g/ml; Santa Cruz *Biotechnology*), na concentração de 1:200 μ l; *Rabbit* – α *Ki-67* 1:4000 μ l; em solução bloqueio, com agitação branda na câmara fria (4°C), por 48 horas. Os cortes foram lavados em PBS e então imersos em 0.05% Tween 20 em PBS por 15 minutos antes de serem incubados com anticorpo secundário biotinizado *Donkey* – α *Goat* e *Donkey* - α *Rabbit* (Chemicon, Temecula, CA, USA) em temperatura ambiente, por 1 hora, diluído em solução bloqueio. Os cortes foram lavados em PBS antes de ser incubados com *ABC Elite kit* por 1 hora (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), após incubação e lavagens em PBS a imuno foi revelada com diaminobenzidina (DAB) através de reação de peroxidase. Após atingirem a coloração desejada os cortes eram passados para PBS onde a reação era interrompida. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas em banhos crescentes de álcool, diafanizadas com banhos de xilol e cobertas com lamínulas, utilizando-se como meio de montagem o Enetellan (*Mikroskopie*).

13.3. Contagem das Células

As células marcadas através das imunohistoquímicas para Ki-67 e DCX foram visualizadas no microscópio *Olympus BX 60*, utilizando a objetiva de 40 x (aumento de 400 vezes). Foram selecionados 4 cortes por animal, nos respectivos níveis de Bregma mostrados na Figura 19 abaixo. Todas as células marcadas presentes nas camadas granulares e subgranular do giro denteado foram contadas com auxílio de um contador manual e depois esta contagem validada por outro observador cego aos grupos experimentais.

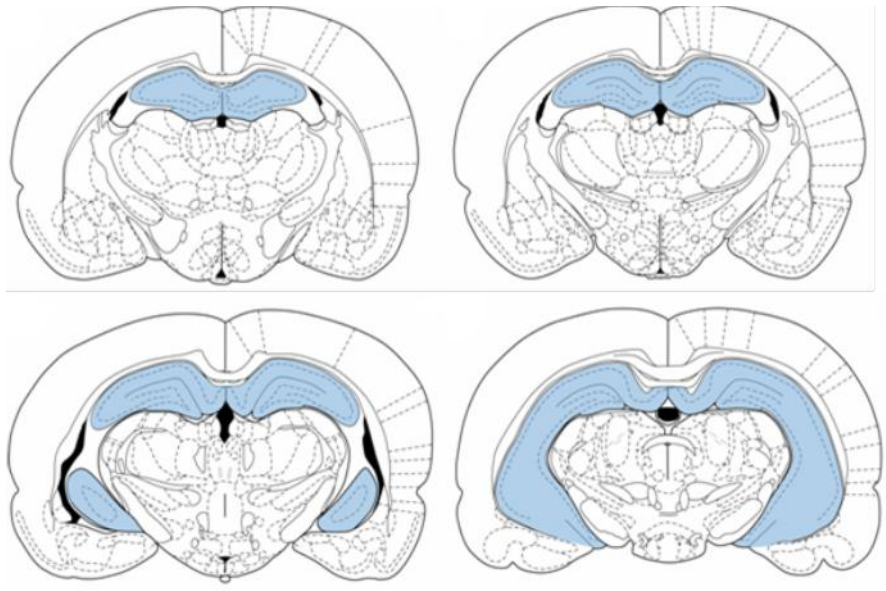


Figura 19. Níveis hipocámpais (AP - 2.64 mm; AP - 3.12 mm; AP - 4.44 mm; AP - 5.40 mm) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1996), selecionados para contar as células Ki-67⁺ e DCX⁺ presentes na camada subgranular e granular do giro denteado.

13.4. Análises Estatísticas

Todos os dados foram analisados estatisticamente através dos programas *OriginPro 8* (*OriginLab Corporation; MA, USA*) e *GraphPad Prism 5 Demo* (*GraphPad Software, Inc.; CA, USA*). Foram utilizados os testes de *Anova Two-Way* com pos hoc *Bonferroni* ou *Tukey* e *Student t-test*. Os gráficos foram confeccionados utilizando o programa *GraphPad Prism 5 Demo* (*GraphPad Software, Inc.; CA, USA*)

14. Resultados

14.1. Proliferação Celular

14.1.1. Grupo 3 Horas após SE

Os animais do grupo de 3 horas após SE, foram processados para imunohistoquímica de Ki-67. Essa proteína é expressa no núcleo das células durante as fases G₀, S e G₁ do ciclo celular (Scholzen & Gerdes, 2000). A análise das imunofluorescências se mostrou eficiente em revelar a localização dessa proteína nos núcleos celulares, co-localizados com histoquímica de DAPI (**Figura 20**).

Com a marcação dessa proteína podemos analisar a quantidade de células que estão se proliferando (processo de mitose), na zona subgranular do giro denteado e assim analisar o efeito agudo do SE sobre este processo.

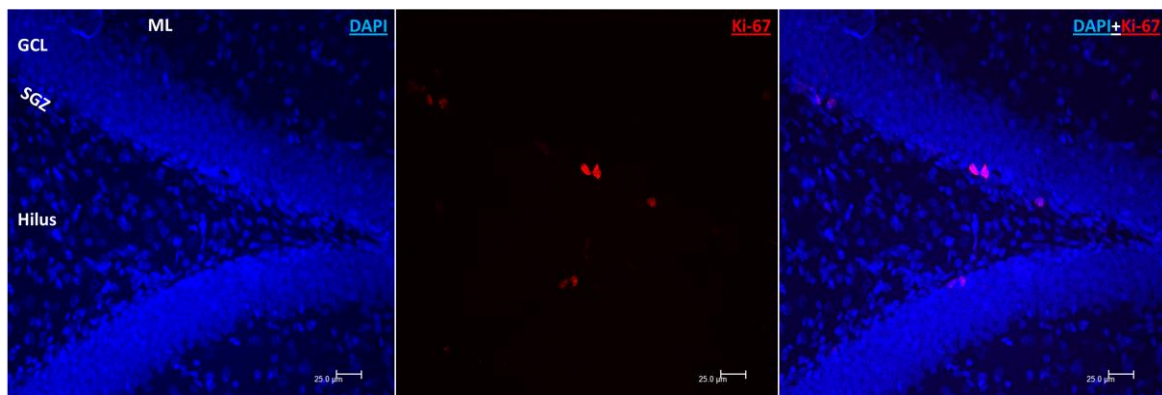


Figura 20. A imunofluorescência para marcador de células em proliferação (Ki-67⁺, vermelho) na camada subgranular do giro denteado de animais que foram sacrificados 3 horas após SE e animais controles. A dupla marcação com DAPI demonstra a expressão dessa proteína no núcleo das células mitose. Barra de calibração = 25 μm.

A análise feita no grupo sacrificado 3 horas após indução de SE, mostrou um aumento significativo na proliferação de células localizadas na camada subgranular do giro denteado (**Figura 21**, $p^{**} < 0.001$). A imunohistoquímica revelou que a maioria das células marcadas, foram encontradas em duplas ou em *clusters* (pequenos grupos de células marcadas sem nítida distinção entre o número de células presentes, neste caso contamos cada cluster como 4 células juntas). Essa característica é comumente encontradas em células em processo de divisão, geralmente encontrados próximos a capilares sanguíneos (Palmer *et al.*, 2000). As estatísticas para o número de células Ki-67⁺ foram feitas utilizando *ANOVA Two-Way* aplicando *pós hoc* de *Bonferroni*.

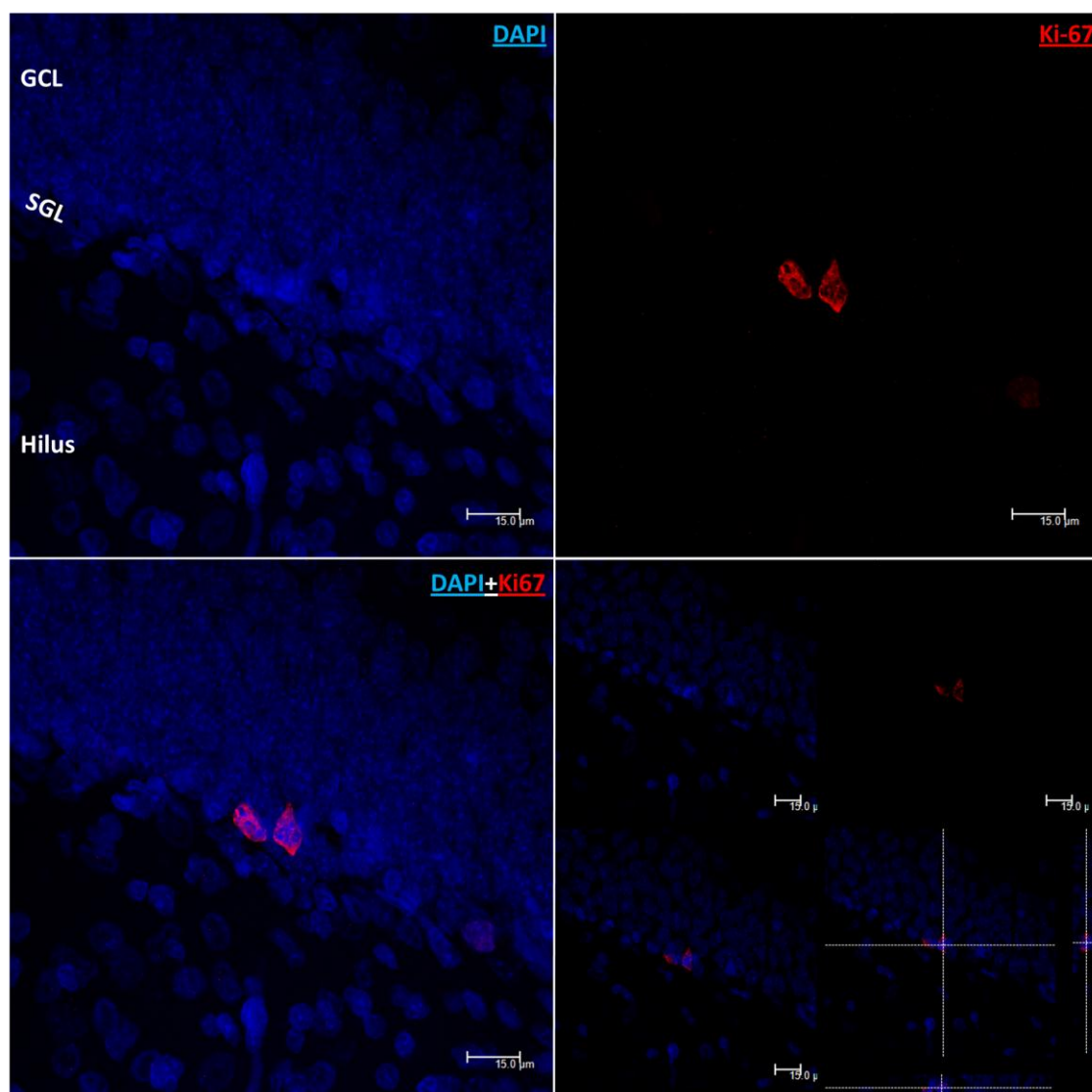


Figura 21. Na análise das células em proliferação, encontramos localização das células ki-67⁺ restritas a borda do *hilus* na camada subgranular (SGZ) do giro denteado. Barra de calibração = 15 µm.

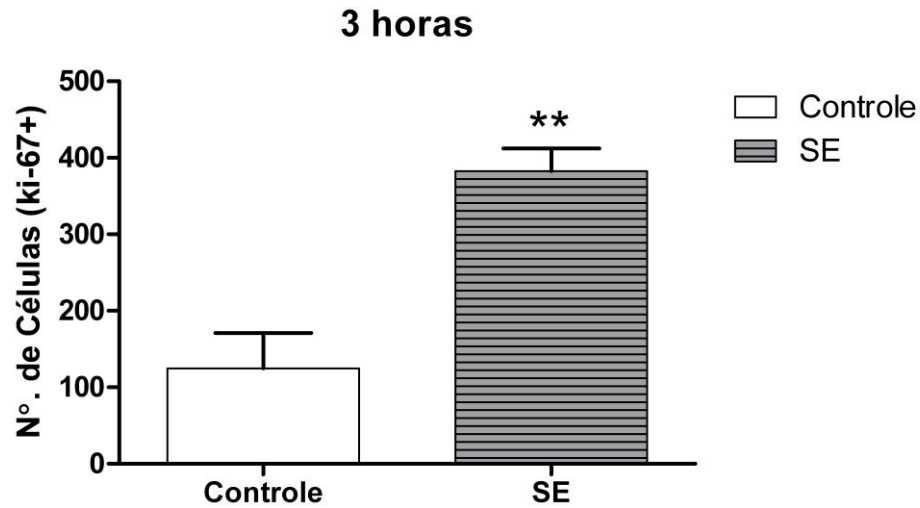


Figura 22. Aumento significativo no número de células em proliferação (ki-67⁺), 3 horas após indução de SE, em comparação aos animais controles. $p^{**} < 0.001$ ANOVA Two-Way aplicando *pós hoc* de Bonferroni.

Os animais estimulados, agrupando ambos os tipos de SE, apresentaram aumento significativo de células em proliferação. A normalização dos dados foi feita para analisar a diferença em porcentagem para cada grupo. Encontramos aumento de 250 %, nas células em proliferação nos animais SE quando comparados ao grupo controle (**Figura 23**).

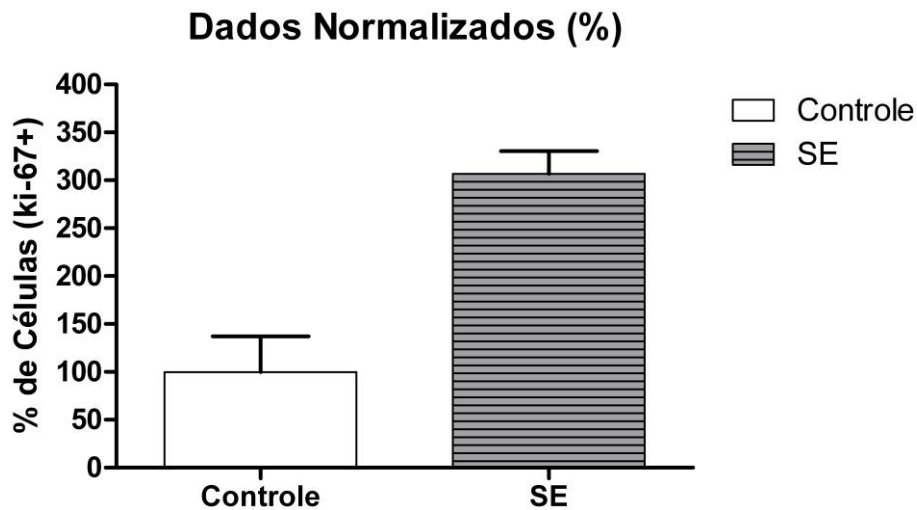


Figura 23. Aumento em porcentagem de células ki-67⁺ (250%), no grupo SE em comparação ao grupo controle.

Quando analisamos separadamente cada tipo de SE, podemos notar o aumento na proliferação de células marcadas para essa proteína nos animais dos dois grupos experimentais, SE tipo I e SE tipo II. Entre os dois grupos experimentais encontramos uma leve diferença, tendendo a ser maior para o tipo I, mais grave (**Figura 24**). Porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes, de acordo com os testes estatísticos utilizados.

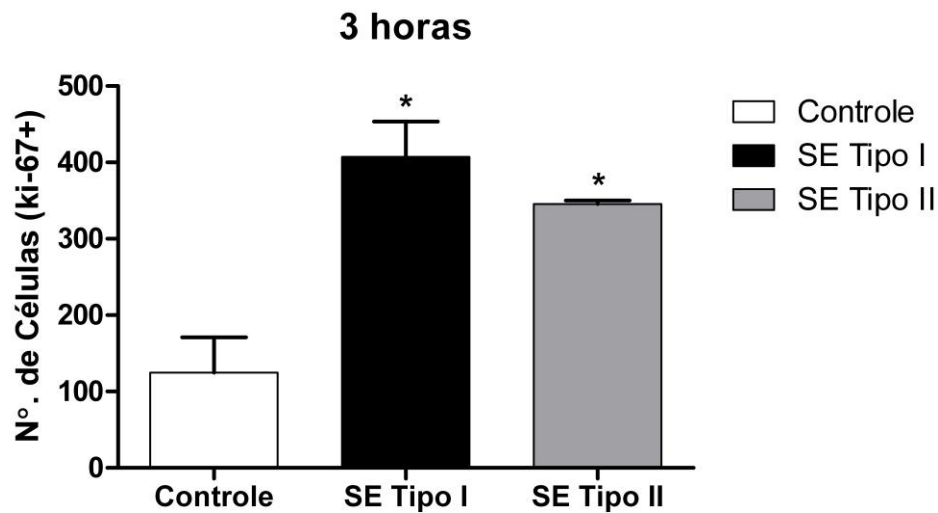


Figura 24. Diferença do número de células em proliferação para cada tipo de SE. Os dois tipos de SE foram significativamente maiores que o grupo controle. $P < 0.05$; ANOVA *Two-Way* com *pós hoc* de *Bonferroni*.

Comparando os dois tipos de SE entre si, podemos notar que não há diferença estatística entre eles, porém ocorre um aumento de 16% no número de células em proliferação nos animais que sofreram SE tipo I, em relação aos animais que apresentaram menor índice de gravidade de crises (**Figura 25**).

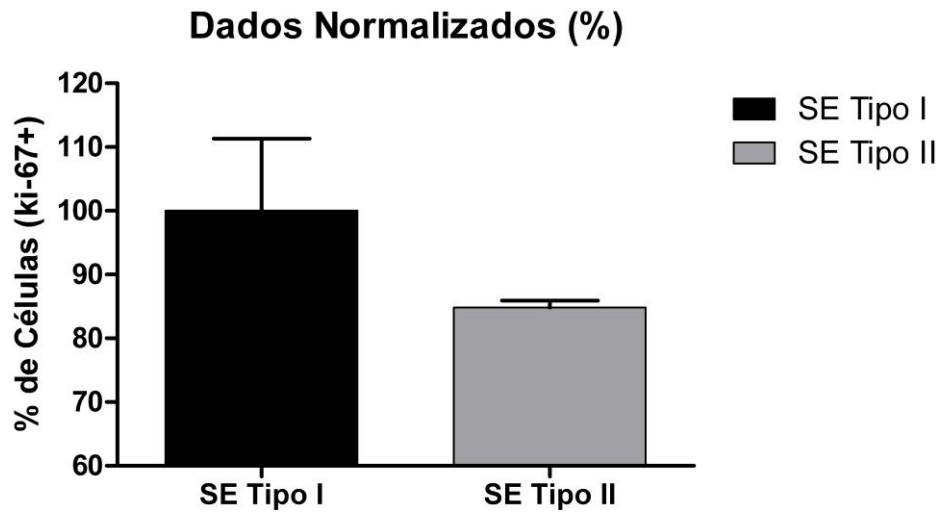


Figura 25. Podemos observar um aumento de 16% de células em proliferação no grupo que apresentou SE com crises mais grave.

Quando comparamos a porcentagem do número de células de cada tipo de SE com o grupo controle, encontramos que o SE tipo I sofreu um aumento de 326% em relação ao controle e o SE tipo II um aumento de 277% (**Figura 26**).

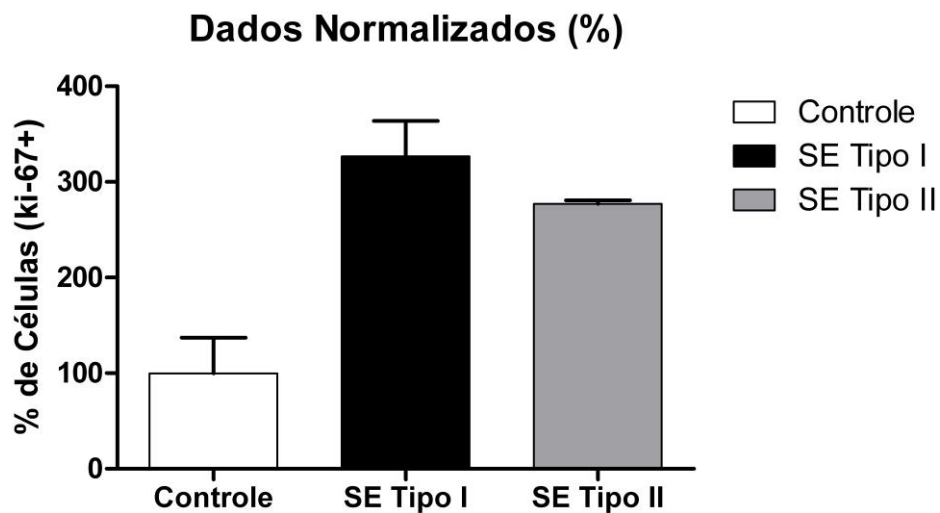


Figura 26. Dados normalizados, mostrando aumento de 327% no número de células nos animais do grupo SE-I e 277% nos animais do grupo SE-II, em relação ao grupo controle.

14.1.2. Grupo 24 horas após SE

Para o grupo de 24 horas foi feita a mesma análise de proliferação, que mostrou um aumento significativo da expressão de células se multiplicando na camada subgranular nos animais que sofreram SE (agrupando os dois tipos de SE), sendo estatisticamente maior do que o grupo controle. (**Figura 27**, $P^{***} 0.001$).

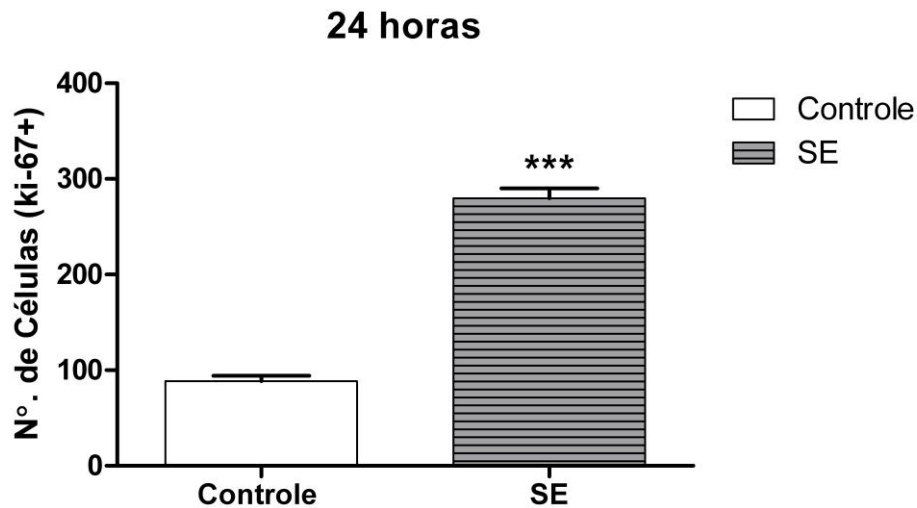


Figura 27. Aumento significativo no número de células ki-67⁺ em proliferação, 24 horas após indução de SE, em relação ao grupo controle. $P^{***} 0.001$; ANOVA *Two-Way* com *pós hoc* de *Bonferroni*.

Assim como no grupo 3 horas, os animais do grupo 24 horas apresentaram aumento significativo da expressão da proteína ki-67⁺ nos núcleos de células em proliferação na camada subgranular do giro denteado (**Figura 28**).

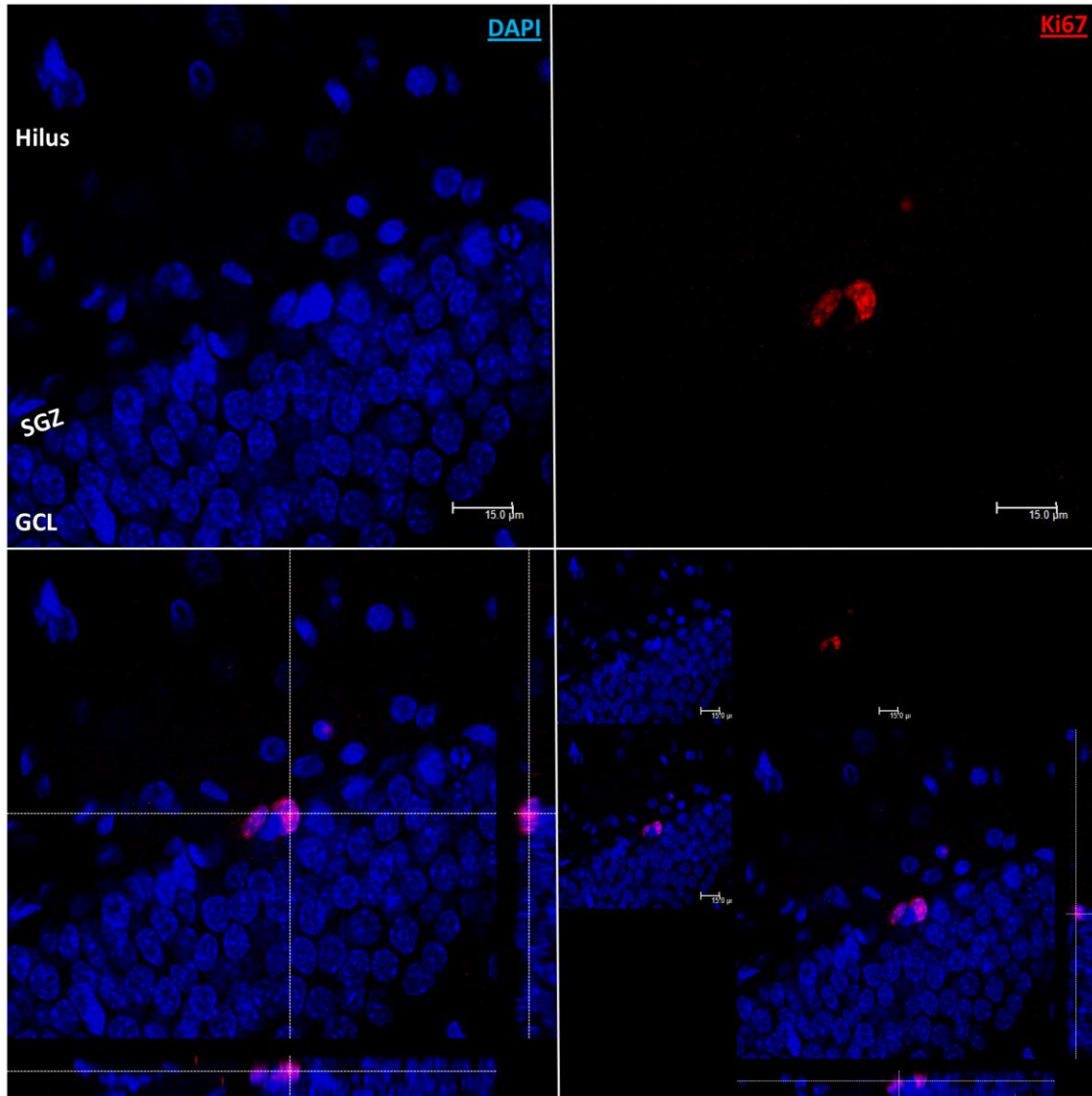


Figura 28. No grupo de animais perfundidos 24 h após SE, a análise das células em proliferação, encontramos localização das células ki-67⁺ (vermelho) restrita a borda do *hilus* na camada subgranular (SGZ) do giro denteado. A marcação ortogonal revela a expressão restrita no núcleo das células em proliferação, co-localizando com marcador nuclear DAPI (azul). Barra de calibração = 15 μm.

Encontramos aumento expressivo no número de células em proliferação de ambos os tipos de SE. Nesses grupos animais, ao contrário do grupo 3 horas, os animais que sofreram SE tipo II, mais brando, apresentaram um leve aumento no número de células em proliferação, embora, esse dado não seja estatisticamente significativo em relação do SE tipo I, mas com tendência ao aumento (**Figura 29**).

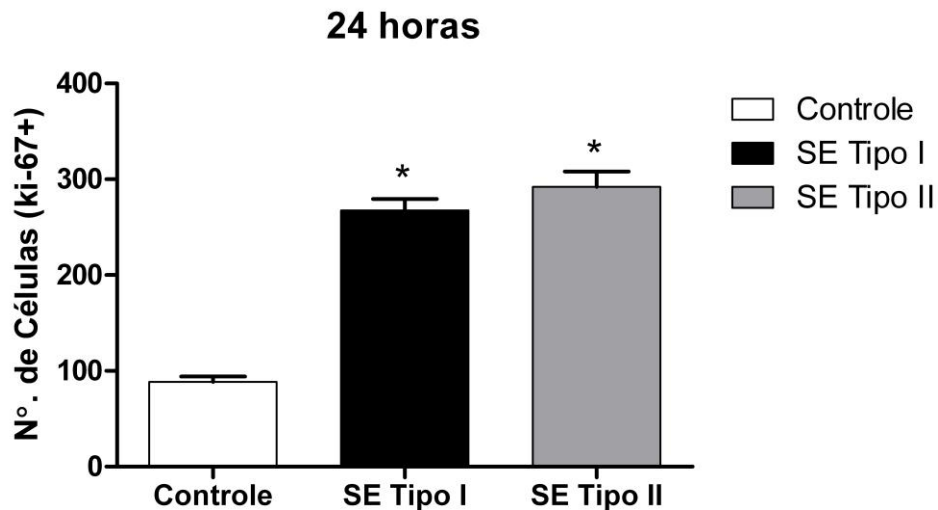


Figura 29. Diferença do número de células em proliferação para cada tipo de SE. Os dois tipos de SE foram significativamente maiores que o grupo controle. P* 0.05; ANOVA Two-Way com *pós hoc* de Bonferroni.

Analizamos se houve aumento ou diminuição da proliferação celular entre os animais SEAS comparando as duas janelas temporais. Não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos estudados, ou seja, a proliferação celular aumenta logo após o SE, 3 horas e permanece aumentada 24 horas após SE (**Figura 30**).

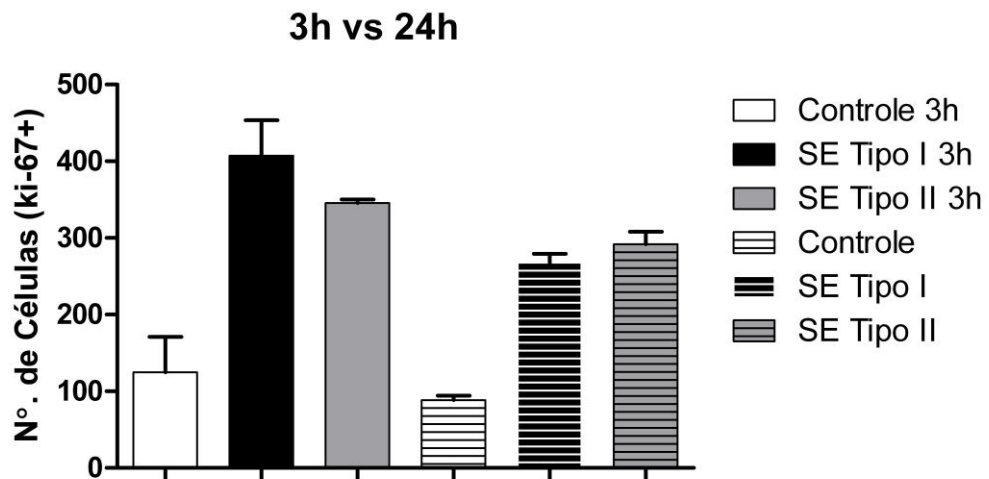


Figura 30. Não houve diferença estatística e entre os animais SEAS nas duas janelas temporais estudadas ($p=0.10$, *Student t-test* e *ANOVA one-way*), embora todos os animais SEAS apresentaram diferença em relação aos animais controles.

14.2. Neurogênese

No estudo de neurogênese foram feitas imunohistoquímicas nos animais que foram perfundidos 14 dias após SE, sendo utilizado para marcação desses novos neurônios imunohistoquímicas para proteínas endógenas, expressas em neurônios imaturos em crescimento, diferenciação e migração (Rao & Shetty, 2004; Arisi & Garica-Cairasco, 2007). As proteínas usadas foram *doublecortin* (DCX) e Beta III Tubulina (Tuj-1), expressas nos corpos celulares e dendritos de novos neurônios (Rao & Shetty, 2004). A marcação da proteína DCX permitiu a visualização da árvore dendrítica e do soma de novos neurônios granulares em maturação e migração pela camada de células granulares (**Figura 31**).

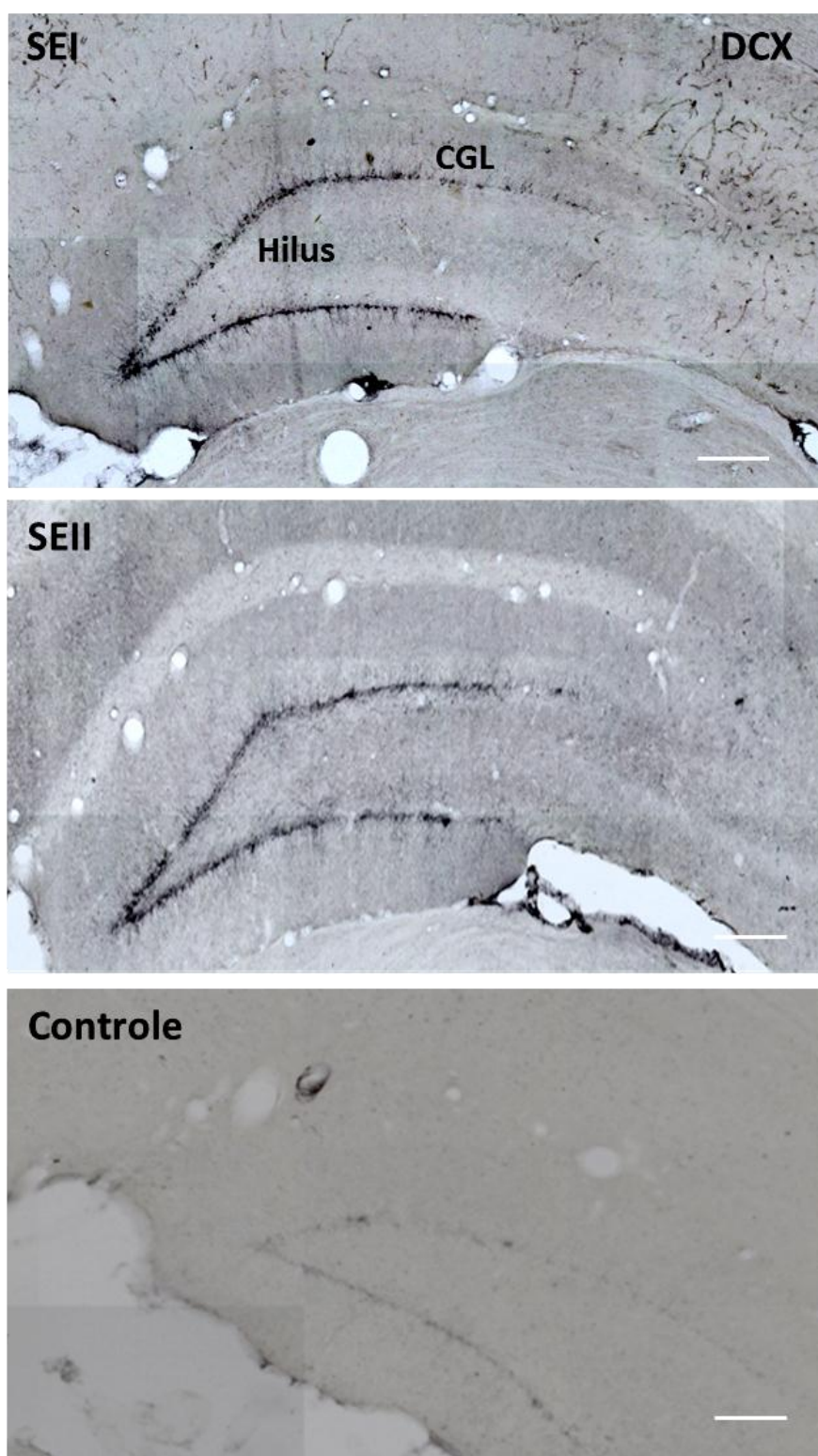


Figura 31. A imunohistoquímica para DCX revelou aumento no número de novos neurônios granulares no GD de animais que sofreram status tipo I e tipo II, em comparação aos animais controle. Barra de calibração= 250 μ m.

A contagem das células DCX⁺ mostrou um aumento significativo da neurogênese 14 dias após SE nos animais submetidos a estimulação elétrica da amígdala que apresentaram SEAS em relação ao grupo controle (P***0.001) (**Figura 32**).

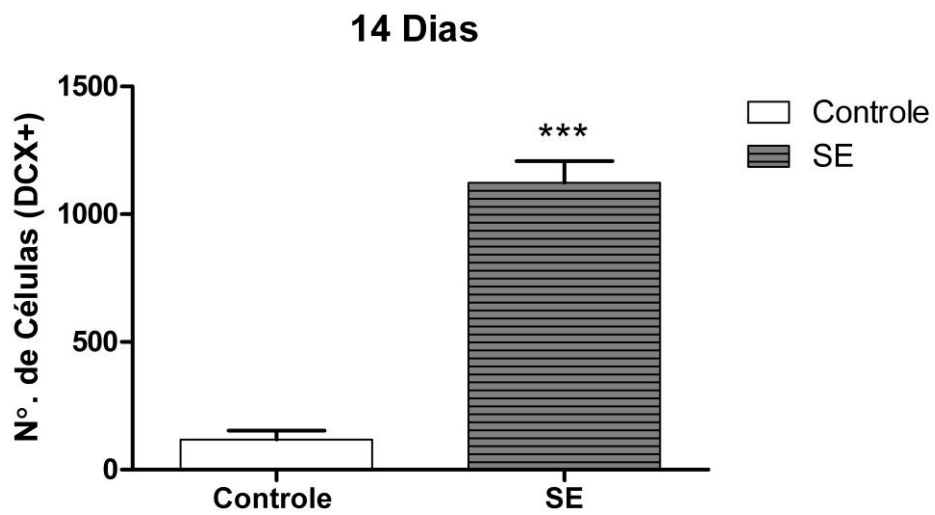


Figura 32. Dias após SE, ocorre aumento significativo de novos neurônios hipocampais (DCX⁺), na camada granular. P***0.001; ANOVA *Two-Way* com *pós hoc* de *Bonferroni*.

Quando analisamos separadamente cada tipo de SE, para estudar a gravidade de crises durante SE no processo de neurogênese. Não encontramos diferenças estatísticas entre os dois tipos de SE, mostrando que o aumento na neurogênese não apresenta ligação direta com a gravidade de crise durante o SEAS. Embora não haja diferença entre os dois tipos de SE, ambos os tipos de SE apresentaram aumento significativo da neurogênese em comparação aos animais controles ($P^{***}0.001$) (**Figura 33**).

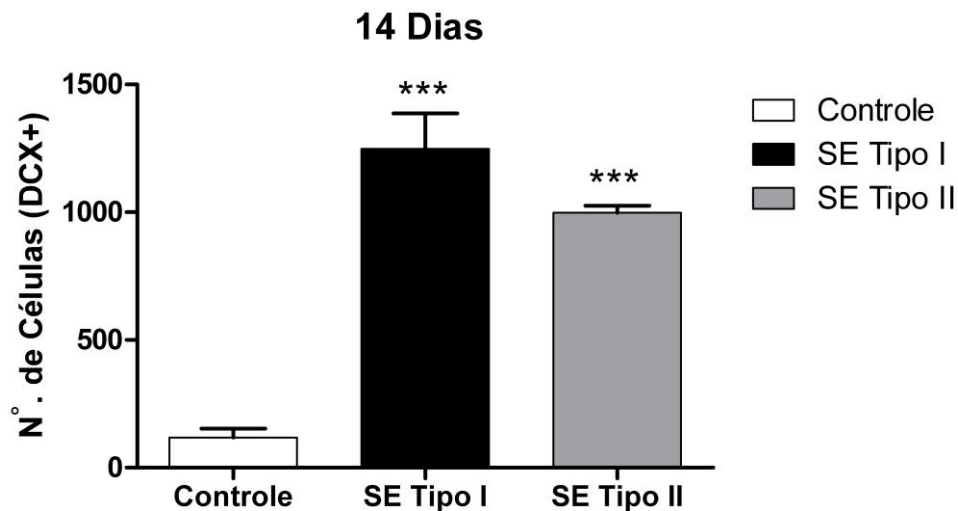


Figura 33. Aumento significativo de novas células (DCX⁺) no hipocampo em ambos os tipos de SE, quando comparado com o controle. Essa diferença estatística não foi vista entre os dois tipos de SE. $P^{***}0.001$; ANOVA *Two-Way* com *pós hoc* de *Bonferroni*.

Os animais controle apresentaram marcação em neurônios restritamente presentes na camada subgranular, na borda do hilus, ou através da camada de células granulares em migração a camada molecular. Nos animais SEAS, alguns neurônios DCX⁺ puderam ser observados em áreas ectópicas como *hilus* e camada molecular (**Figura 34**).

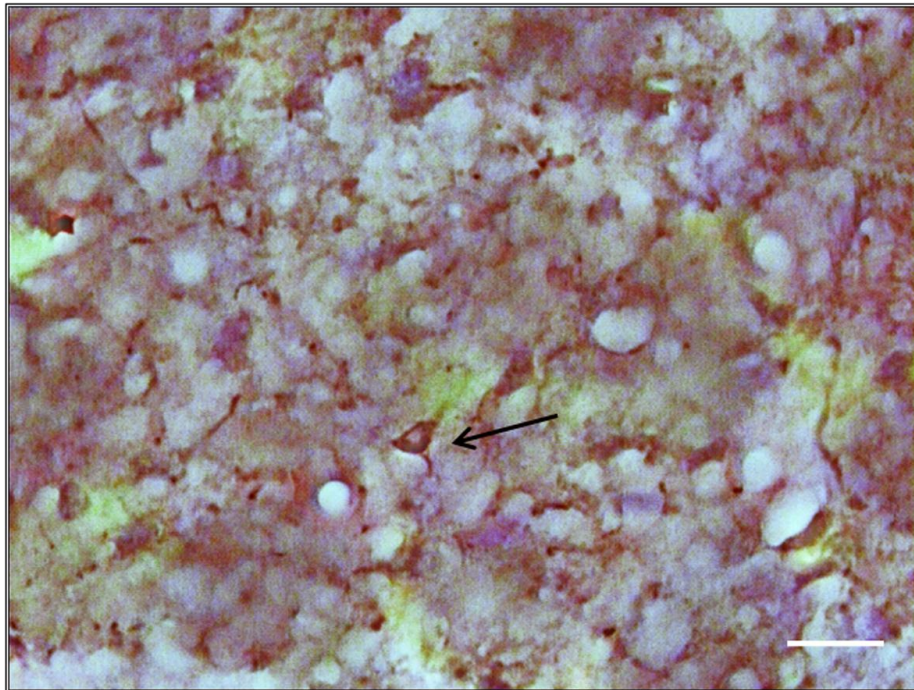


Figura 34. Alguns neurônios DCX+ (seta preta), nos animais SEAS apresentaram migração ectópica se inserindo no hilus do giro denteado. Barra de calibração = 100 μ m.

Outra característica de novos neurônios granulares nascidos após SE é presença de dendrito basal dessas células através do *hilus* (Ribak *et al.*, 2000). Os animais controles apresentaram neurônios DCX⁺ com morfologia normal de novos neurônios imaturos em migração através da camada granular e dendritos apicais através da camada molecular, com ausência de dendrito basal (Rao & Shetty, 2004; Arisi & Garcia-Cairasco, 2007; Shapiro *et al.*, 2007). Nos animais SEAS, além da presença de dendritos apicais através da camada molecular, encontramos em algumas células (4 de 10 células analisadas) a presença de um longo dendrito basal através do *hilus* (**Figura 35**).

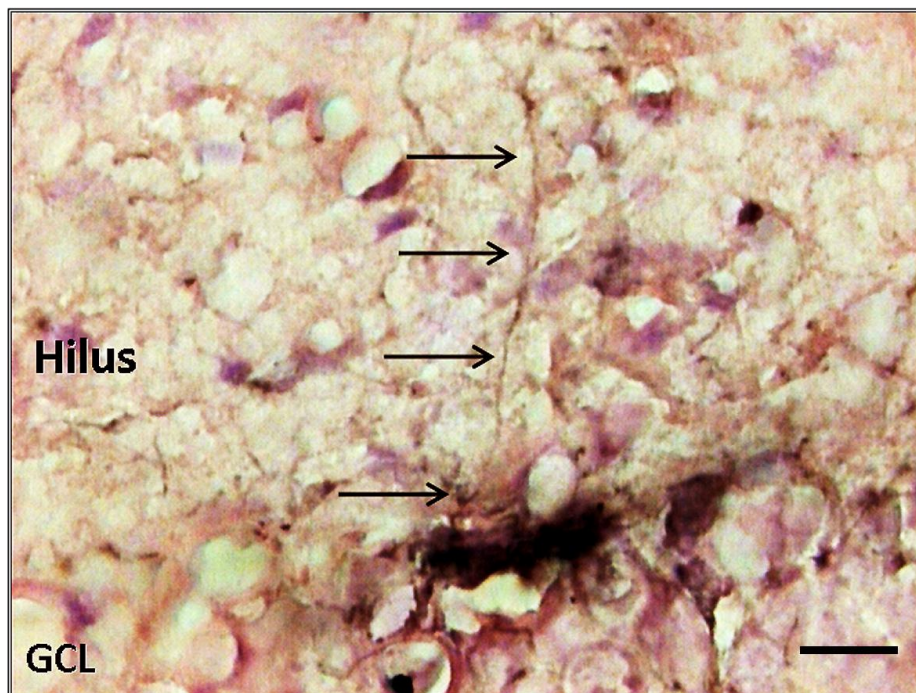
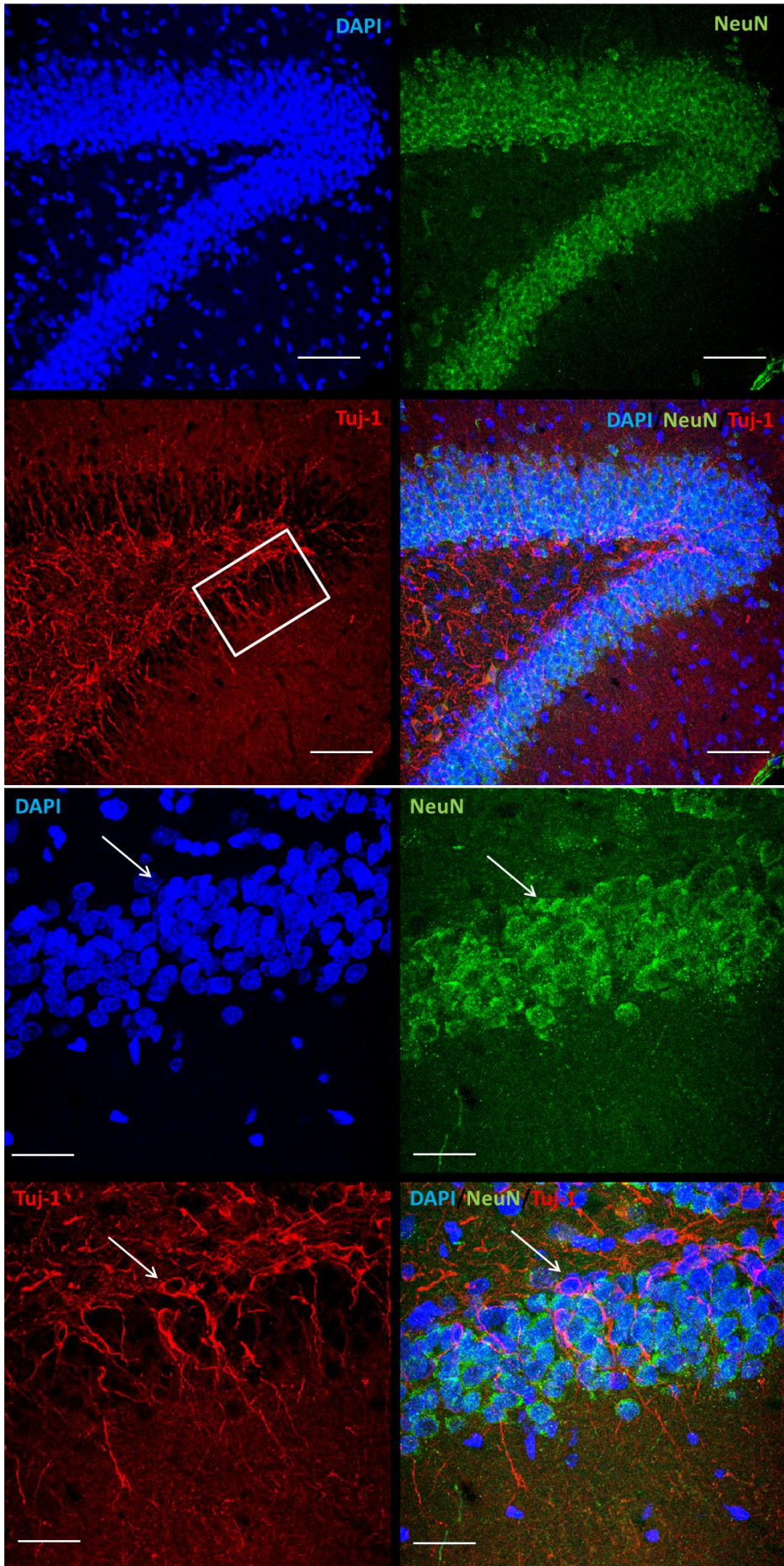


Figura 35. Neurônios DCX⁺ de animais que sofreram SEAS, apresentaram formação de fino e longo dendrito basal (setas pretas) através do *hilus* 14 dias após SE. Barra de Calibração = 100 μ m.

Os animais do grupo 14 dias foram processados para imunofluorescência para Tuj-1, demonstrando ampla marcação de novos neurônios na camada subgranular e de células granulares do giro denteado. As células apresentaram marcação do corpo celular e dendritos apicais através da camada molecular. As células apresentaram co-localização para marcadores de neurônios maduros (NeuN), revelando uma sobreposição de marcadores de neuroblastos ou neurônios imaturos com marcadores de neurônios maduros (Figura 36).

Figura 36. Tripla marcação mostrando novos neurônios após SE, marcados com Tuj-1 (em vermelho), co-localizando com marcador de neurônios maduros NeuN (em verde) e marcador nuclear DAPI (em azul), setas brancas. Podemos visualizar a expressão da proteína Tuj-1 no soma e nos dendritos apicais dos novos neurônios granulares e a expressão da proteína NeuN nos núcleos dos novos neurônios. Barra de calibração = 150 e 100 μm .



14.3. Células Granulares Ectópicas

Para validar a presença de neugônios granulares ectópicos, processamos os animais grupo de 14 dias para a imuno de Prox-1, marcador de células granulares do giro denteado. A grande maioria dessas células está presente na camada de células granulares do giro denteado, com algumas raras células podendo ser encontradas no hilus (aproximadamente 0,1 %; McCloskey *et al.*, 2005).

A histoquímica para Prox-1 apresentou grande especificidade em marcar neurônios granulares, presentes na camada de neurônios granulares. A marcação com NeuN mostrou que os neurônios presentes no hilus e alguns poucos presentes na camada molecular não apresentam expressão de marcador de neurônios granulares (Prox-1). Os animais controles processados apresentaram marcação de células granulares restritas à camada de células granulares do giro denteado, com raras exceções de células granulares presentes no *hilus* (3 célula em um hipocampo dos 4 analisados) (Figura 37).

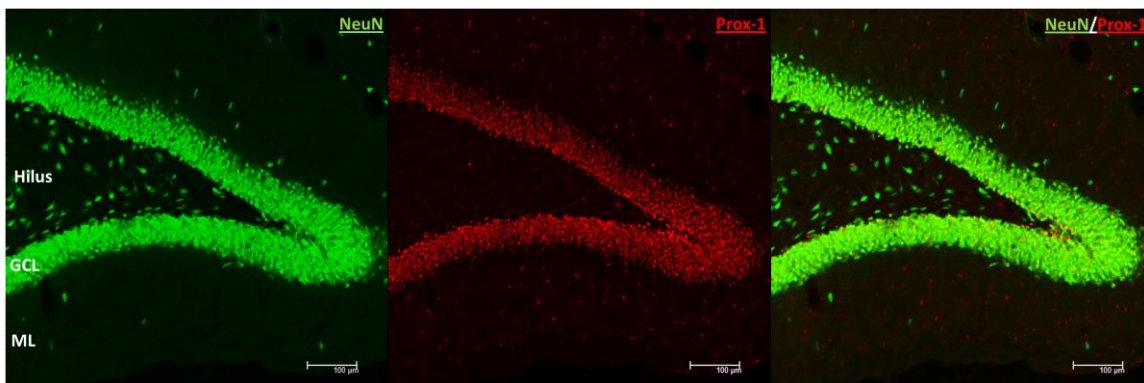


Figura 37. Os animais controle apresentaram marcação de células granulares (Prox-1, vermelho) restrita a camada de células granulares (GCL), com raras células encontradas no *hilus* ou na camada molecular (ML). As células marcadas com NeuN (verde) se co-localizam com neurônios Prox-1+, apenas na camada granular. Barra de Calibração = 100 μ m.

Os animais SEAS apresentaram marcação para Prox-1 nas células presentes na camada granular e em várias células presentes no *hilus* do giro denteado. Apesar da diminuição de neurônios marcados com NeuN no *hilus* em animais SEAS, foi possível encontrar um grande número de células Prox-1+, no hilus sem apresentar co-localização com NeuN (**Figura 38**).

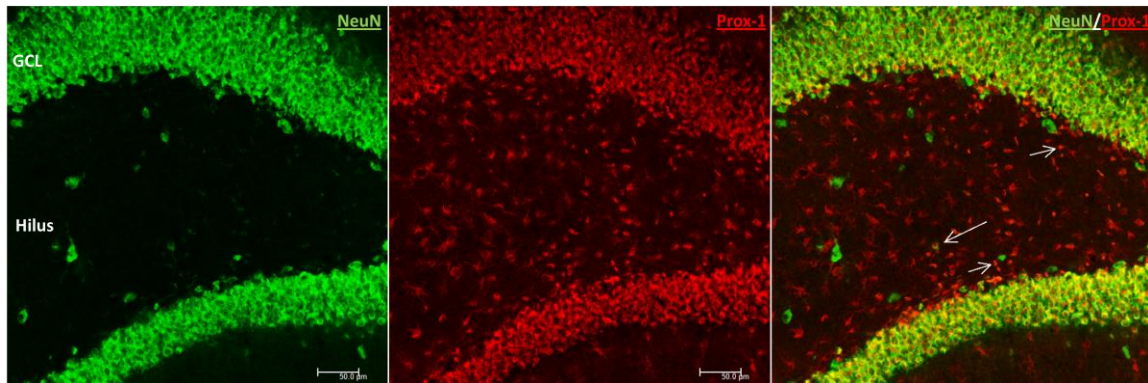


Figura 38. Os animais que sofreram SEAS apresentaram marcação para Prox-1 nas células presentes na camada granular e em várias células presentes no *hilus* (setas brancas). A maioria das células Prox-1⁺ (vermelho) presentes no *hilus* não colocalizaram com NeuN⁺ (verdes). Barra de calibração = 50 µm.

Os animais SE tipo II, apresentaram migração ectópica e inserção de células ectópicas no *hilus* do giro denteado e co-localização com NeuN . Os animais SE tipo II, apresentaram poucas células granulares inseridas no *hilus* e várias células NeuN+, com algumas co-localizações entre os dois marcadores. Algumas células foram encontradas na camada molecular interna, co-localizadas com NeuN (**Figura 39**).

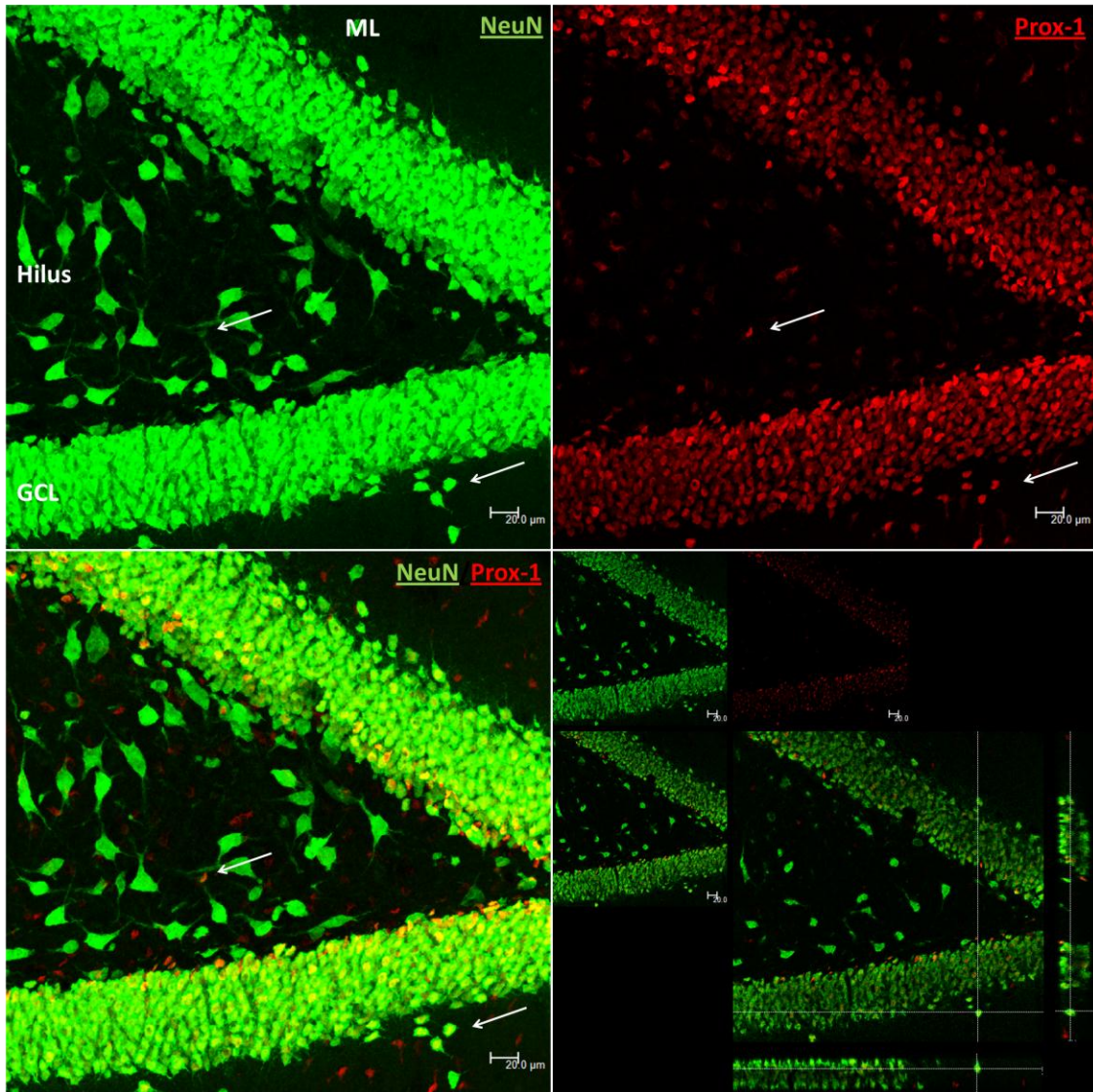


Figura 39. Os animais que apresentaram SE tipo II, apresentaram menor perda neuronal (NeuN⁺ verde) e poucas células granulares inseridas no *hilus* do giro denteado (Prox-1 vermelho, seta branca). Algumas células Prox-1⁺ estão presentes na camada molecular (seta branca), co-localizadas com NeuN imagem ortogonal. Barra de calibração = 20 μ m.

Os animais SE tipo I, apresentaram um grande número de células granulares inseridas no hilus e na camada molecular interna. Esses animais apresentaram proeminente a camada de células granulares mais dispersas e grande número de células Prox-1⁺ na camada molecular, co-localizadas com células NeuN⁺ (Figuras 40, 41 e 42).

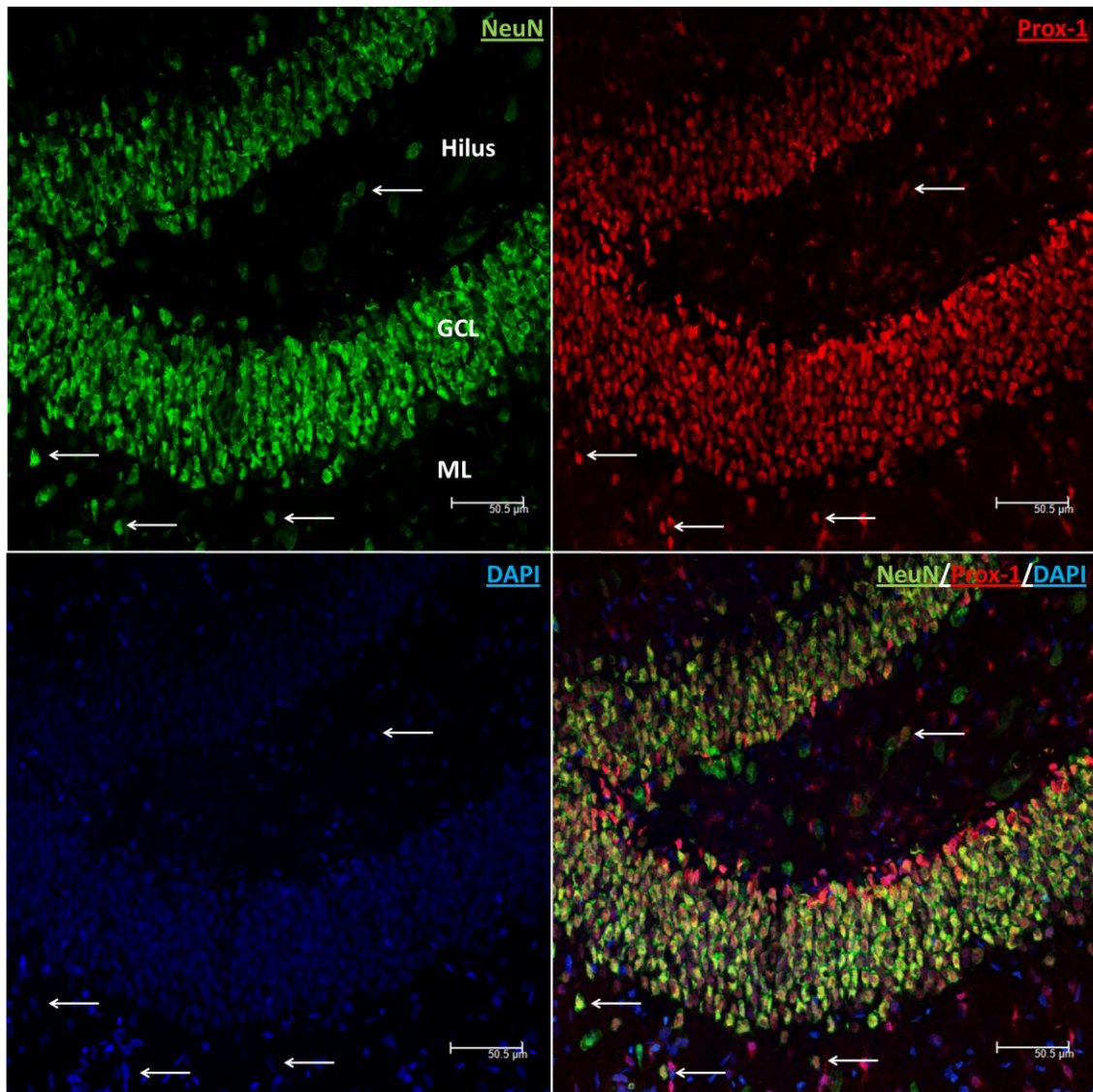


Figura 40. Os animais que sofreram crises mais graves apresentam dispersão das células da camada granular, inserção de neurônios granulares no *hilus* e na camada molecular do giro denteado (seta branca). Essas células apresentaram co-localização entre os marcadores de células granulares (Prox-1⁺ vermelho), neurônios maduros (NeuN⁺ verde) e marcador para núcleos celulares DAPI (azul). Barra de calibração = 50.5 μm.

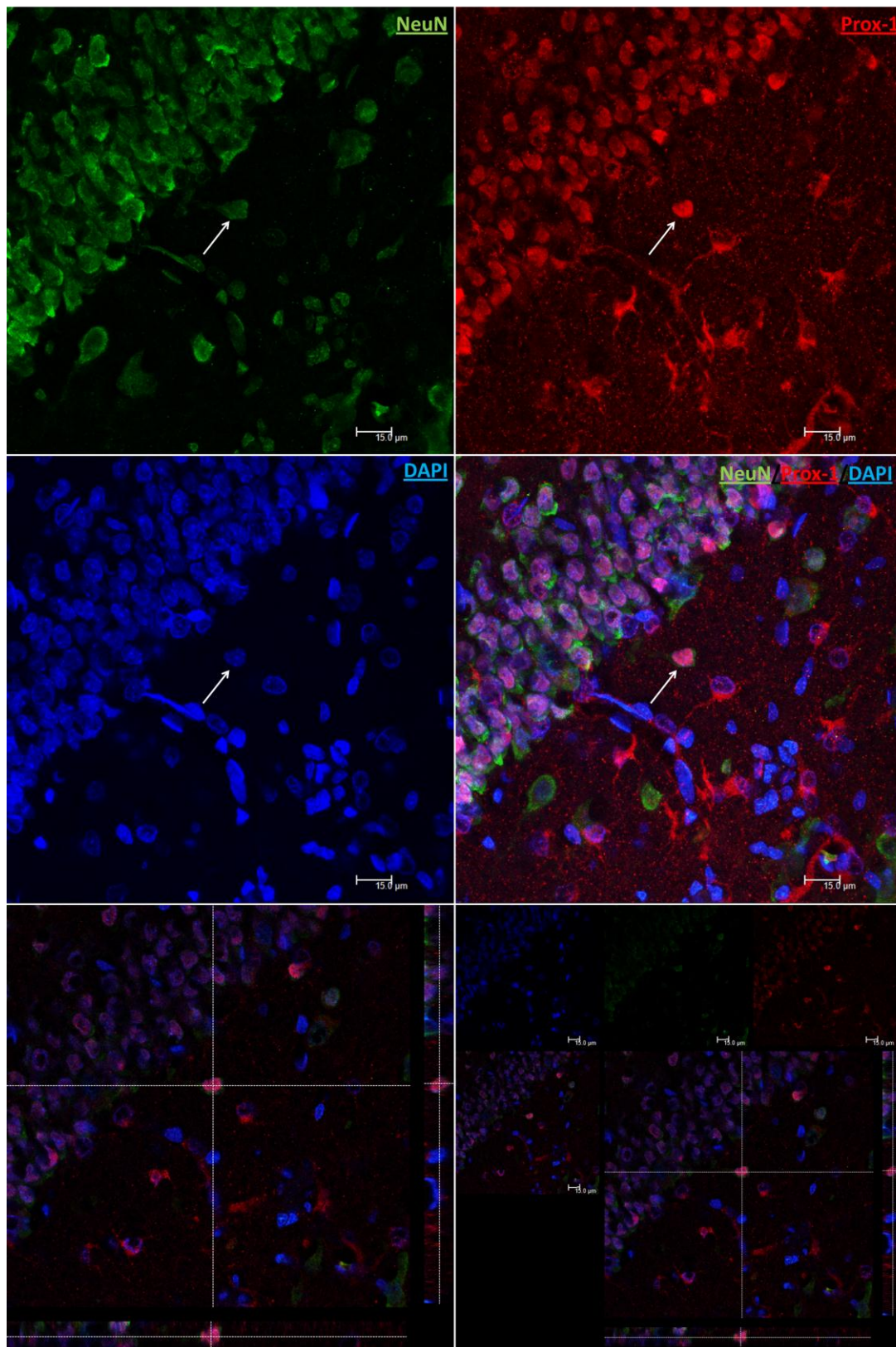


Figura 41. Animais SE tipo I, apresentam dispersão das células da camada granular, inserção de neurônios granulares no *hilus* (seta branca). Algumas células apresentaram co-localização entre os marcadores de células granulares (Prox-1⁺ vermelho), neurônios maduros (NeuN⁺ verde) e marcador para núcleos celulares DAPI (azul), seta branca e imagem ortogonal. Barra de calibração = 15 μm.

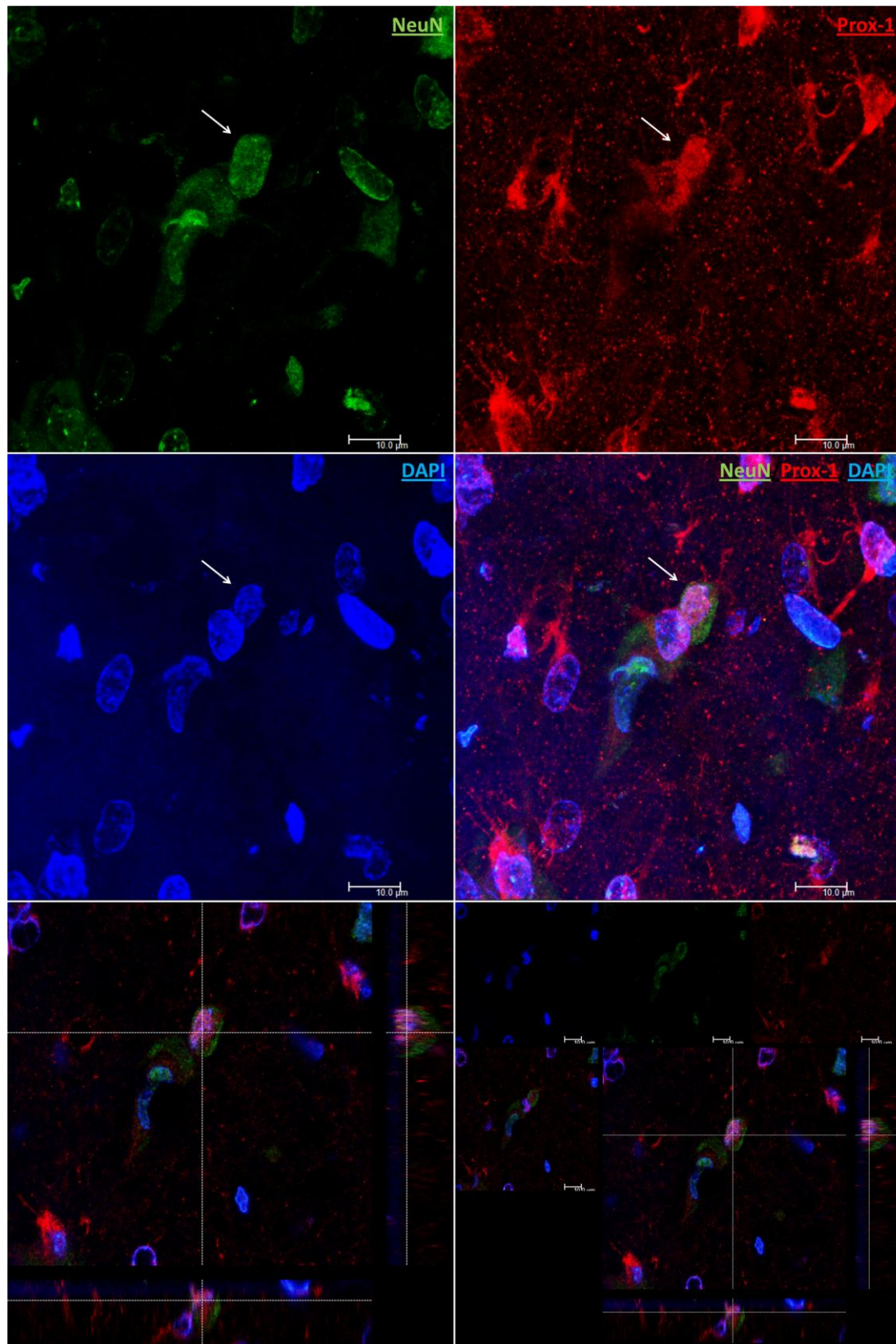


Figura 42. Destaque para neurônio granular, expressando marcador de neurônios granular no núcleo da célula (Prox-1⁺ vermelho), co-localizando com marcador de neurônios maduros (NeuN⁺ verde) e marcador de nuclear (DAPI azul). A co-localização é comprovada através da imagem ortogonal, demonstrando que ambas as marcações pertencem à mesma célula. Barra de calibração = 10 μm.

15. Discussão

15.1. Proliferação Celular na Camada subgranular

Em nosso trabalho demonstramos que os animais que foram eletricamente estimulados e desenvolveram SEAS, apresentaram um aumento significativo na proliferação celular na camada subgranular do giro denteado. As células estavam em processo mitótico 3 horas após a indução do SE pela estimulação elétrica da amígdala, gerando um aumento no número de células em $\approx 200\%$ quando comparado com animais controles.

A utilização da imunohistoquímica para a proteína Ki-67 revelou grande eficiência em marcar a expressão dessa proteína em núcleos de células em divisão celular. A colocalização com histoquímica de DAPI, marcador de núcleo celular, mostrou a expressão restrita dessa proteína nos núcleos das células em processo mitótico. Além da co-localização, a histoquímica para DAPI nos auxiliou na identificação topográfica dessas células, revelando localização restrita à camada subgranular do giro denteado e na parede do ventrículo lateral (dados não mostrados), locais conhecidos como nichos de células tronco no sistema nervoso central, regiões conhecidas como zonas de proliferação celular no SNC.

Alguns experimentos mostraram que proliferação celular é alterada por estímulos fisiológicos diversos, tais como estresse (Gould *et al.*, 1997). A proteína Ki-67 é expressa endogenamente em células em mitose, apresentando uma vantagem em relação a injeção intraperitoneal de BrdU, um análogo da Timidina, amplamente utilizado em trabalhos com neurogênese, que necessita injeção prévia nos animais aumentando o estresse do manuseio e assim representa uma variável a mais na coleta de dados influenciando nos resultados finais. Kee *et al.*, (2002) mostraram que o simples manuseio de animais para injeção i.p. de BrdU, não é capaz de modificar a taxa de proliferação celular comparando a utilização dos dois marcadores. Entretanto, a proteína Ki67 apresenta outra vantagem em comparação a utilização do BrdU. Essa proteína é expressa durante todas as fases do ciclo celular (G1, S e G2), ao contrário do BrdU que só pode ser incorporado pela célula durante a fase S, na qual a célula está sintetizando novo material genético que será dividido para as células filhas e pode assim absorver e incorporar novas bases nitrogenadas. Com isso, o número de células marcadas é

significativamente maior, 50%, quando comparado a utilização de BrdU na mesma janela temporal para proliferação celular (Kee *et al.*, 2002).

Encontramos que a proliferação celular permanece elevada nos animais sacrificados 24 h após o status, quando comparado com os animais controles. Esses dados na proliferação são condizentes com dados da literatura, mostrando que o status epilepticus aumenta significativamente a proliferação celular na camada subgranular do giro denteado agudamente e permanecendo alta até 30 dias após o estímulo (Parent *et al.*, 1997; 1998; 2003; Arisi & Garcia-Cairasco, 2007; Walter *et al.*, 2007).

Quando analisamos a expressão de c-Fos e FJC nos diferentes tipos de SE, encontramos claras diferenças entre os dois tipos de SE, diretamente ligadas às gravidades de crises apresentadas pelos animais no momento do SE (capítulo 1). Sobre a proliferação celular, pelo contrário, ambos os tipos de SE apresentaram semelhante aumento significativo de proliferação celular em janelas agudas (3 e 24 horas após SE). Comparando os animais da janela de 3 horas com os animais da janela temporal de 24 horas, não encontramos diferenças entre os grupos analisados, mostrando assim que o aumento da proliferação celular começa numa janela temporal aguda, a partir de 3 horas e permanece aumentada por no mínimo 24 horas. Alguns estudos demonstram que a proliferação aumentada permanece elevada até 30 dias após SE (Parent *et al.*, 1997).

Quando comparamos os dois hemisférios cerebrais, em ambos os grupos e janelas temporais (SE tipo I e II, 3 e 24 horas), na tentativa de encontrar diferenças na proliferação celular entre o lado estimulado e o contralateral, principalmente no grupo de animais SE tipo II, também não encontramos diferenças estatisticamente significativas (dados não mostrados). Assim, mesmo os animais que ativaram mais o lado estimulado em comparação ao lado contralateral, apresentaram a mesma taxa de proliferação celular em ambos os hemisférios. O lado ipsilateral da amígdala estimulada, apesar de ter apresentado maior número de células em degeneração do que o lado contralateral apresentou similar número de células em proliferação em ambos os lados.

O aumento na produção de células ki-67⁺ corrobora com dados anteriores mostrando que as células ki-67⁺ (células Tipo 3) são susceptíveis a estímulos, tais como SE, podendo aumentar drasticamente a taxa de proliferação, ao contrário do que acontece com as células tipo 1, que não respondem a estímulos tais como SE. Outros modelos apresentaram aumento no número dessas células após desenvolvimento de SE seguida de aplicação de AC (Jessberger *et al.*, 2005; Shapiro *et al.*, 2007)

15.2. Neurogênese

As proteínas Tuj-1 e DCX se mostraram ótimos marcadores endógenos de novos neurônios imaturos em migração e diferenciação (Rao & Shetty, 2004; Arisi & Garcia-Cairasco, 2007). Foi possível quantificar o número de células sem administração de substâncias exógenas, tais como BrdU. Os somas das células marcadas foram encontrados na camada subgranular e no terço inicial da camada granular do giro denteado, emitindo os dendritos apicais em crescimento no sentido da camada molecular do giro denteado. Outros estudos demonstraram que a utilização desses dois marcadores é confiável em marcar novos neurônios e se co-localizam em 90% com células marcadas com BrdU. A coexpressão dos dois marcadores na mesma célula é de 95% (Rao & Shetty, 2004), assim a expressão dessas proteínas é específica para novos neurônios granulares. Adicionalmente, a expressão de ambos parece persistir por um período prolongado de tempo e por isso há sobreposição de marcadores de células neuronais imaturas e maduras durante o período de expressão, sugerindo que a expressão de DCX e Tuj-1 é bastante robusta em células granulares durante a migração, diferenciação e períodos iniciais de crescimento (crescimento de dendritos e axônios) (Rao & Shetty, 2004; Shapiro *et al.*, 2007; Arisi & Garcia-Cairasco, 2007).

Vários estudos com modelos agudos e crônicos de crises límbicas demonstraram que crises estimulam neurogênese no giro denteado (Parent *et al.*, 1997; Bengzon *et al.*, 1997). Em roedores adultos os modelos de epilepsia de lobo temporal de ácido caínico e pilocarpina, aumentam a proliferação celular no giro denteado em cinco a 10 vezes depois de um período latente de alguns dias (Parent *et al.*, 1997). Estudos nos modelos epileptogênicos de *kindling* elétrico da amígdala (Parent *et al.*, 1998), do hipocampo (Bengzon *et al.*, 1997), da via perfurante (Nakagawa *et al.*, 2000) e *kindling* audiogênico (Romcy-Pereira & Garcia-Cairasco, 2003) mostraram que repetidas crises no *kindling* também estimulam neurogênese na camada granular.

Nosso trabalho é o primeiro que demonstrar o aumento na neurogênese no modelo epileptogênico de status epilepticus auto-sustentado por estimulação elétrica da amígdala, corroborando com dados encontrados em outros modelos animais de epilepsia de lobo temporal (Parent *et al.*, 1997; Bengzon *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 2000; Arisi & Garcia-Cairasco, 2007).

Os mecanismos pelos quais as atividades de crises estimulam neurogênese ainda permanecem desconhecidos.

A produção aumentada dessas células, irá aumentar a inserção dessas células na camada granular do giro denteado. Essas células enviam seus axônios (fibras musgosas), excitatórios através do *hilus* para células piramidais em CA3. O controle inibitório dessas células é feito através do tônus inibitório de interneuronios GABAérgicos presentes no *hilus* do giro denteado (células em cesto e células em candelabro). Com o desenvolvimento do SE, encontramos morte neuronal no *hilus* podendo refletir em diminuição do tônus inibitório das células granulares. Mais a inserção de novas células e a diminuição da inibição pode gerar um circuito hiperexcitado que levaria a formação um foco epiléptico no local ou aumentaria a susceptibilidade ao desenvolvimento de crises recorrentes.

Utilizando a marcação de neurônios DCX⁺, podemos encontrar algumas células presentes em lugares ectópicos, como no *hilus* do giro denteado. A presença de células DCX⁺ no *hilus* foi restritamente presente em animais SE do tipo I mais grave, não sendo encontradas nos animais controle ou animais com índices de gravidade de crise mais baixos, apesar desses animais apresentarem aumento na neurogênese na camada granular. A presença da migração e inserção de células ectópicas foi encontrada em outros trabalhos, como o trabalho pioneiro de Parent *et al.*, (1997). Utilizando a marcação da proteína DCX, Arisi & Garcia-Cairasco, 2007 também encontraram migração de células ectópicas para camada polimórfica do giro denteado em animais epiléticos após injeção de pilocarpina.

Outra alteração comumente vista em células granulares nascidas após desenvolvimento de SE, é a formação de dendrito basal.

Vários trabalhos sugerem que atividades crises aceleram os estágios iniciais de maturação neuronal de células granulares geradas em resposta as crises epiléticas (Overstreet-Wadiche *et al.*, 2006; Overstreet-Wadiche & Westbrook, 2006), acarretando várias alterações morfológicas nas células granulares do giro denteado (Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2000; Overstreet-Wadiche & Westbrook, 2006; Shapiro & Ribak, 2006; Arisi & Garcia-Cairasco, 2006; Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007).

De forma transiente, nos estágios iniciais de desenvolvimento, é comum células granulares apresentarem dendrito basal, mas é raro encontrarmos essa estrutura em células granulares maduras em hipocampos de ratos (Seress & Pokorny, 1981; Ribak *et al.*, 2000; Rao & Shetty, 2004; Kron *et al.*, 2011). Analisamos algumas células marcadas com DCX dos animais controle e SEAS e encontramos a presença de dendrito basal nos animais que desenvolveram SEAS. Confirmando esse achado, vários outros estudos demonstraram que células granulares apresentam alterações plásticas seguidas de SE, apresentando persistência do dendrito basal (Spigelman *et al.*, 1998; Ribak *et al.*, 2000; Arisi & Garcia-Cairasco, 2006; Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007; Kron *et al.*, 2011). A manutenção do dendrito basal pelas células granulares maduras, está ligado diretamente ao estágio de maturação que as células se encontram no momento em que estas são expostas ao SE. Células nascidas após o SE ou imaturas no momento do SE, apresentam maiores susceptibilidade as alterações plásticas e persistem na manutenção o dendrito basal no período maduro após crise (Shapiro & Ribak, 2006; Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007; Kron *et al.*, 2011), apresentando formação de espinhos dendríticos e formação de sinapses tão cedo quanto com 4-5 dias de nascidas (Shapiro & Ribak, 2006; Shapiro *et al.*, 2007). A presença de dendritos basais nas células granulares são significativamente importante por que eles projetam para o *hilus* do giro denteado e são inervados pelas fibras musgosas nessa região, criando circuitos recorrentes excitatórios (Ribak *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007). Com desestabilização do giro denteado, o circuito poderia contribuir na hiperexcitabilidade do sistema e o surgimento das crises recorrentes.

Encontramos que a atividade de crise leva a significante dispersão de neurônios DCX⁺ dentro da camada granular, sugerindo a contribuição dos novos neurônios no processo patológico da ELT, assim como visto em outros modelos (Jessberger *et al.*, 2005)

15.3. Células Granulares Ectópicas

A grande maioria das células granulares estão localizadas na camada molecular do giro denteado, embora uma pequena fração dessas células podem ser encontradas no *hilus* (aproximadamente 0,1%) de ratos (West *et al.*, 1991; McCloskey *et al.*, 2005). Outra alteração morfológica hipocampal comumente observada em pacientes epiléticos e em modelos de crises de ELT, é a migração e inserção de neurônios granulares em regiões ectópicas. A inserção desses neurônios em lugares ectópicos é comumente encontrada no *hilus* ou na camada molecular do giro denteado ou na borda de CA3 de pacientes epiléticos (Houser, 1990) e em modelos experimentais (Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2000; 2002).

Para melhor estudar os processos de migração e inserção de células granulares em lugares ectópicos, como *hilus* e camada molecular, processamos os animais do grupos de quatorze dias para imunofluorescência para Prox-1, marcador de células granulares do giro denteado. Nos animais SEAS, encontramos não só aumento na proliferação de novos neurônios, mas bem como proeminente dispersão de células novas células através da camada granular.

Neurônios granulares inseridos no *hilus* apresentam inervação inapropriada (Scharfman *et al.*, 2000) e apresentam características eletrofisiológicas similares a neurônios maduros presentes na camada de células granulares do giro denteado, podendo contribuir para desestabilização da circuitaria hipocampal (Scharfman *et al.*, 2000; 2002). Além do mais, células granulares ectópicas apresentam descargas epiléticas (*burst*) sincronizadas com neurônios piramidais em CA3, com uma assinatura temporal que sugere conexão monossináptica entre células ectópicas em neurônios piramidais de CA3 (Scharfman *et al.*, 2000). Vários estudos demonstraram que, as células que migram e se inserem em regiões ectópicas são provenientes de novos neurônios nascidos após SE (Parent *et al.*, 1997; 2006; Jessberger *et al.*, 2005;). Similarmente, a posição anormal de novos neurônios dentro da camada granular, pode perturbar a transmissão sináptica normal casusando prejuízo funciona da circuitaria hipocampal (Jessberger *et al.*, 2005).

Walter *et al.*, 2007 mostraram que células nascidas após o SE ou células nascidas antes mas em estagio de maturação, diferenciação e migração no momento do SE são mais susceptíveis a alterações morfológicas, tais como formação de dendrito basal, bem

como a migração para lugares ectópicos como o *hilus* ou camada molecular do giro denteado.

As células granulares ectópicas apresentam ampla variedade de morfologia e orientação da sua arvore dendrítica, embora o SE pode causar alterações mais proeminente na morfologia das células granulares ectópicas (Scharfman *et al.*, 2003). Assim, os dendritos apicais é relativamente mais fino, quando comparado com células granulares normais. As células ectópicas na maioria das vezes apresentam formação e manutenção do dendrito basal (Scharfman *et al.*, 2000; 2003). Juntamente com isso, na maioria das vezes, dendritos das células granulares ectópicas recebem inervação de fibras musgosas mais densamente do que dendritos das células granulares normais (Pierce *et al.*, 2005). Apesar das diferenças morfológicas, as células ectópicas apresentam características fisiológicas similares aos de células granulares adultas normais, apresentando potencial de repouso, constante de tempo e características do potencial de ação (Scharfman *et al.*, 2000). As propriedades morfo-fisiológicas, juntamente com o sincronismo com as células de CA3 e inserção em uma circuitaria diferente da que as células foram criadas para se inserirem, apresenta uma importante alteração que está ligada a patologia das ELT, podendo contribuir para alteração da circuitaria hipocampal bem como levando a hiperexcitabilidade tecidual. Embora, as células granulares despolarizam

Os mecanismos moleculares que causam migração e inserção de células em lugares ectópicos após SE, permanecem desconhecidos. Uma das hipóteses em torno da migração e inserção de neurônios granulares no *hilus*, poderia ser na tentativa substituir células perdidas em decorrência do SE. Embora as células ectópicas esbocem várias características de membrana semelhante às células granulares convencionais, as ectópicas são parecidas com neurônios hílares em vários sentidos. Por exemplo, elas exibem bursts espontâneos após indução de SE por PILO (Scharfman *et al.*, 2000). Essas células apresentam de forma similar aos neurônios do hilus, expressão de c-Fos após crises espontâneas, mostrando sua inserção na circuitaria hipocampal e recrutamento no momento das crises espontâneas (Scharfman *et al.*, 2002).

Estudos em tecidos retirados de pacientes com epilepsia de temporal intratável, mostrou presença de células granulares ectópicas no *hilus* do giro denteado desses pacientes (Parent *et al.*, 2006). Revelando que essa alteração está presente na patologia das ELT humana.

16. Conclusões

- ✓ Status epilepticus auto-sustentado por estimulação elétrica da amígdala basolateral estimula o aumento na proliferação celular no hipocampo de ratos.
- ✓ A quantidade de células em proliferação na camada SGZ não é proporcional à gravidade das crises durante o SEAS.
- ✓ A neurogênese no hipocampo é aumentada após insulto epileptogênico.
- ✓ A quantidade de novos neurônios granulares hipocampais não está diretamente associada a gravidade de crises durante o SEAS.
- ✓ Novos neurônios granulares apresentam longo dendrito basal no hilus após SEAS.
- ✓ Após SEAS células granulares migram para lugares ectópicos no hilus e na camada molecular do giro denteado.

University of Cincinnati

CAPÍTULO 3 – IMPACTO DO SE NA MORFOLOGIA NEURONAL

17. Introdução

A segunda parte desse trabalho foi efetuada durante estágio na *University of Cincinnati – Ohio*, EUA, entre os meses de dezembro de 2009 e agosto de 2010. O trabalho foi possível através de uma colaboração entre nosso laboratório e o laboratório do professor PhD. Steve Danzer. (“*Contributions of aberrant granule cell integration to the development of epilepsy*” - R01 NS062806-01A2)

Esse trabalho teve como principal objetivo estudar utilizando animais transgênicos – GFP, o papel da neurogênese na condição epiléptica. Vários estudos têm mostrado que o SE aumenta significativamente o número de novos neurônios na camada granular do giro denteado.

Estudos recentes mostraram que os neurônios nascidos em decorrência ao SE sofrem várias alterações morfológicas como a manutenção do dendrito basal que não estão presentes em células granulares maduras nascidas em condições normais de desenvolvimento (Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007). Outra alteração morfológica comum vista nesses neurônios é uma migração para locais errados, como por exemplo, o *hilus* do giro denteado e assim se inserem de maneira errônea no sistema, podendo contribuir assim para o aumento da hiperexcitabilidade do sistema e conseqüentemente à epileptogênese (Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007). Para dar continuidade ao nosso estudo realizado na FMRP, foi realizado um estágio na *University of Cincinnati – Cincinnati, Ohio* no intuito de melhor investigar o papel da neurogênese na epileptogênese e quais as alterações morfológicas sofridas por esses neurônios. Dados anteriores da literatura mostraram que neurônios nascidos antes do SE e que estavam em estágios iniciais de maturação (neurônios imaturos) estavam também susceptíveis às mesmas alterações morfológicas daqueles nascidos após a indução de SE e as células que nasceram após o desenvolvimento (novos neurônios), mas que estavam em estágios mais avançados de maturação (neurônios maduros) estavam menos susceptíveis às mesmas alterações (formação de dendrito basal e migração ectópica) (Walter *et al.*, 2007, Jessberger *et al.*, 2007; Kron *et al.*, 2011). Nossa pergunta inicial era: quais outras alterações morfológicas sofreriam neurônios imaturos submetidos ao SE e quais alterações morfológicas os neurônios maduros sofreram após submissão ao SE?

Para isso foi desenvolvido um protocolo experimental onde pudéssemos marcar o dia de nascimento dos neurônios no giro denteado, com a administração de BrdU, um análogo à base nitrogenada timidina que se insere ao DNA de células em divisão, sendo possível marcar essas células através de imunohistoquímica e assim saber o dia exato em que essas células nasceram (estavam se dividindo). Para o estudo morfológico dessas células foram usados camundongos transgênicos que expressavam GFP (*Green Fluorescent Protein*), sendo que neurônios do giro denteado expressavam essa proteína após 4 semanas de vida, possibilitando assim o estudo morfológico da arborização dendrítica. Associando a marcação para BrdU e GFP, podemos saber exatamente o dia de nascimento das células e a morfologia das mesmas.

18. Objetivos

18.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar neuroplasticidade hipocampal em decorrência do status epilepticus.

18.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar alterações morfológicas em células granulares com diferentes estágios de maturação expostas ao SE.
- ✓ Avaliar alterações morfológicas ocorridas em novas células granulares maduras submetidas ao SE.
- ✓ Avaliar alterações morfológicas ocorridas em novas células granulares imaturas submetidas ao SE.
- ✓ Estudar alterações no número e densidade de espinhos dendríticos em células granulares novas maduras e imaturas em condições normais.
- ✓ Estudar alterações no número e densidade de espinhos dendríticos em células granulares novas maduras e imaturas após exposição ao status epilepticus.

19. Materiais e Métodos

19.1. Animais

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o guia de normas de cuidados e utilização de animais do NIH (*National Institute of Health*) e do Cincinnati Children`s Hospital Medical Center (CCHMC). Todos os esforços foram feitos para evitar o sofrimento desnecessário aos animais. Os estudos foram conduzidos em camundongos machos *C57B/L* expressando *Thy-1/GFP* (Feng *et al.*, 2000, Walter *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2011) com idade de um a 3 meses, mantidos no biotério do CCHMC, em caixas coletivas com 4 animais com alimento e água *ad libitum* e ciclo claro escuro de 12 horas. Em um grupo de animais (células Imaturas+SE) foram utilizadas fêmeas e machos, mas os devidos testes estatísticos foram executados para mostrar que não havia diferença significativa entre os critérios analisados para as células capturadas nos diferentes gêneros animais.

19.2. Injeção de BrdU e Pilocarpina

Para avaliar o impacto do SE nas células granulares em diferentes estágios de maturação, utilizamos a injeção de BrdU nos animais para marcar o dia de nascimento dessas células. As injeções foram feitas via subcutânea (s.c.) na dose de 100 mg/kg dissolvido em solução salina estéril.

Foram selecionadas células em duas janelas experimentais de acordo com o estágio de maturação. No grupo de animais que estudamos células imaturas submetidas ao SE, os animais foram injetados com PILO 1 semana após a injeção de BrdU. No grupo utilizado para estudar alterações em células maduras, os animais foram injetados com PILO 8 semanas após a injeção de BrdU.

Como modelo experimental de SE, utilizamos a administração de PILO s.c. na dose de 380 mg/kg. Os tratamentos foram conduzidos entre 10 h e 12 h, para evitar variações diurnas. Após uma janela de tempo variado de 20 a 40 min depois da administração da PILO, os animais começaram a apresentar os primeiros

comportamentos de crises. Os animais foram considerados em SE após atingirem índice 4 e 5 de gravidade de crise de acordo com a escala de Racine (1972).

Três horas após o início do SE as crises foram abortadas com duas injeções s.c. de diazepam na dose de 10 mg/kg, com intervalo de 15 min. Após a injeção de diazepam, os animais foram colocados em incubadoras na temperatura de 32°C e foram injetados com salina estéril 0,9 % para melhorar na recuperação. Os animais permaneceram em observação por até duas horas e caso necessário uma injeção adicional de diazepam foi administrada. Os animais controles foram injetados com salina.

19.3. Perfusão

Quatro semanas após tratamento com pilocarpina, os animais foram anestesiados com pentobarbital (100 mg/kg) e transcárdialmente perfundidos com PBS+1U/ml de heparina, seguido de 2,5 % de paraformaldeído e 4 % de sacarose em PBS, pH 7,4, com auxílio de uma bomba de perfusão com velocidade controlada.

19.4. Desenho experimental

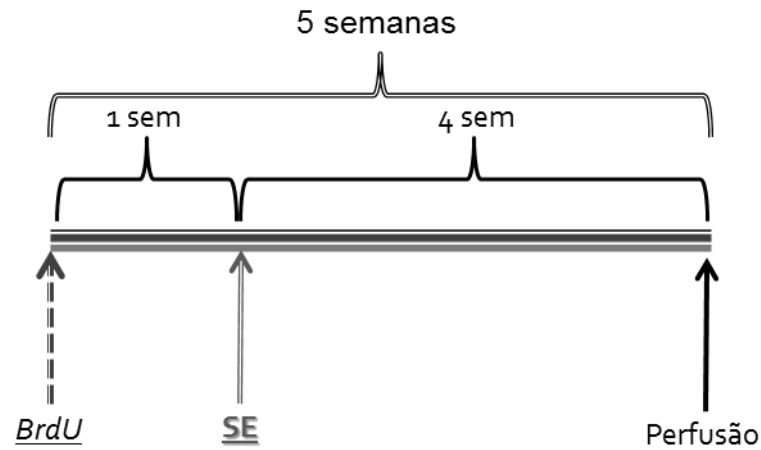


Figura 43. Desenho experimental para grupo de animais que foram analisadas as células que estavam em estágio imaturo no momento que o animal sofreu o SE (células Imatura+SE).

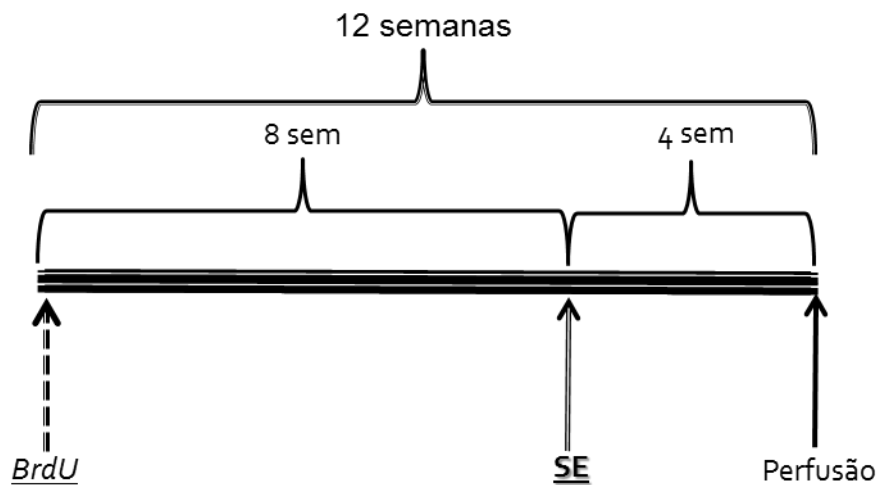


Figura 44. Desenho experimental para grupo de animais que foram analisadas as células que estavam em estágio maduro no momento que o animal sofreu o SE (células Maduras+SE).

19.5. Pós-fixação e congelamento dos cérebros

Após a perfusão, os cérebros foram pós-fixados com 2,5 % de paraformaldeído e 4 % de sacarose em PBS, pH= 7,4 por 24 horas, em seguida transferidos à soluções de sacarose 10%, 20% e 30% em PBS, para crioproteção. Após pelo menos 24 horas em cada solução, os cérebros foram congelados em isopentano 99% (Vetec) e gelo seco (-65°C), posteriormente armazenados em *freezer* a -80 °C.

Os cérebros foram cortados em secções de 60 µm em criostato (Microm HM-505-E) com temperatura variando de -18 a -22 °C. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato de cromo-alumínio 0,05%) e as lâminas foram estocadas no *freezer* -80°C até o processamento das histologias.

19.6. Imunohistoquímicas

As imunohistoquímicas foram conduzidas de acordo com protocolos estabelecidos (Walter et al., 2007; Murphy et al., 2011). Brevemente, as lâminas com os cortes foram incubadas *overnight* a temperatura de 4°C, com anticorpo monoclonal 1:200 µm *Mouse anti-BrdU* (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) e 1:1500 µm *Chicken anti-GFP* (#AB13970, Abcam) em solução de bloqueio. Para incubação de anticorpos secundários foram utilizados *Alexa Fluor 594 Goat anti-Mouse* e *Alexa Fluor 488 Goat anti-Chicken*, nas concentrações de 1:750 µm, em solução bloqueio (*Molecular Probes, Eugene, OR*).

19.7. Microscopia Confocal

Os cortes foram analisados no microscópio confocal Leica SP5 à procura de células granulares que fossem BrdU⁺ e que expressassem GFP. As células encontradas deveriam obedecer aos seguintes critérios para serem capturadas e utilizadas nas análises: **1)** O soma deveria estar presente na secção analisada de tal forma que o

número de processos apicais e basais poderia ser precisamente determinados. **2)** Pelo menos um ramo do dendrito apical deveria apresentar uma terminação natural (não artificialmente cortada na superfície da fatia de tecido, “*truncated*”). **3)** A marcação do GFP deveria estar com brilho suficiente para garantir a captura e reconstrução.

As células encontradas que obedecessem todos os critérios foram capturadas utilizando microscópio confocal Leica SP5, com a objetiva de 63 x, imersão em óleo (NA 1,4). Para a reconstrução dendrítica, as séries de *stacks* em Z foram capturadas com 0,5 µm de espessura e resolução de 1,2 µm/pixel. Todas as análises foram conduzidas por um investigador cego aos grupos experimentais.

19.8. Reconstrução

Os neurônios foram digitalmente reconstruídos usando o *software* **Neurolucida** Versão 10 (Microbrightfield, Inc.), utilizando os *stacks* capturados no confocal. As terminações dendríticas foram marcadas como “naturais” se essas terminassem normalmente dentro da secção do tecido, ou “*truncated*” se elas foram cortadas em qualquer superfície superior ou inferior da fatia de tecido. A posição de cada célula dentro da lâmina superior ou inferior da camada de células granulares, em relação à borda do *hilus* e relativa às coordenadas do Bregma (Paxinos and Franklin, 2001), foram registradas. O número de células presentes em cada uma das lâminas da camada granular do GD e o número de terminações cortadas (“*truncated*”) pela superfície do tecido foram estatisticamente equivalente entre os grupos. Durante a reconstrução foram registradas a localização do soma das células granulares em relação à borda do *hilus*, sua posição na camada de células granulares do giro denteado, a borda da camada molecular e a localização da fissura hipocampal. A camada molecular foi subdividida em camada molecular interna (IML), média (MML) e externa (OML). A camada molecular interna compreende os 17% iniciais da camada molecular (West & Andersen, 1980; Deller et al., 1999; van Groen et al., 2003; Danzer et al., 2004; Murphy et al., 2011) sendo a média e externa igualmente divididas do restante. Essas subdivisões são aproximadas, já que as divisões exatas entre as camadas não são claramente perceptíveis.

19.9. Contagem de espinhos dendríticos

Os espinhos dendríticos foram contados utilizando as séries de imagens digitalmente reconstruídas no *software Neurolucida*. As séries Z-stacks foram capturadas com espessura de 0.2 μm com resolução de 0.04 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Os stacks foram obtidos da camada molecular interna, média e externa correspondendo às três subregiões distintas da camada molecular. Os espinhos dendríticos foram definidos como saliências acima de 0.25 μm de comprimento, presentes nos eixos dendríticos.

19.10. Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram conduzidos utilizando o programa *Sigma Plot* (versão 11.0). Para a comparação dos grupos de células maduras/sem SE e maduras+SE, os dados foram avaliados quanto à normalidade e variâncias iguais, e os testes paramétricos e não paramétricos foram executados.

Para comparações dos grupos de células imaturas/sem SE e imaturas + SE, que continham tanto animais machos, quanto fêmeas, os dados foram avaliados quanto à normalidade e variância iguais, e foram normalizados utilizando uma classificação ou transformação Ln, se necessário. A significância foi determinada utilizando *ANOVA two-way* para o controle dos gêneros com valores de $P < 0,05$.

20. Resultados

Para comentado acima, avaliar o impacto do SE sobre a estrutura dos neurônios granulares em diferentes estágios de maturação e desenvolvimento, utilizamos camundongos expressando *Thy1-GFP*. Os animais foram injetados com BrdU em diferentes janelas temporais antes do tratamento com PILO para datar o dia de nascimento das novas células granulares. As secções dos animais foram analisadas e escaneadas para identificação de células que apresentavam marcação para BrdU no interior do seu núcleo, revelando o dia de nascimento da célula e que ao mesmo tempo estivessem expressando a proteína GFP, utilizada na avaliação morfológica das mesmas (**Figura 45**).

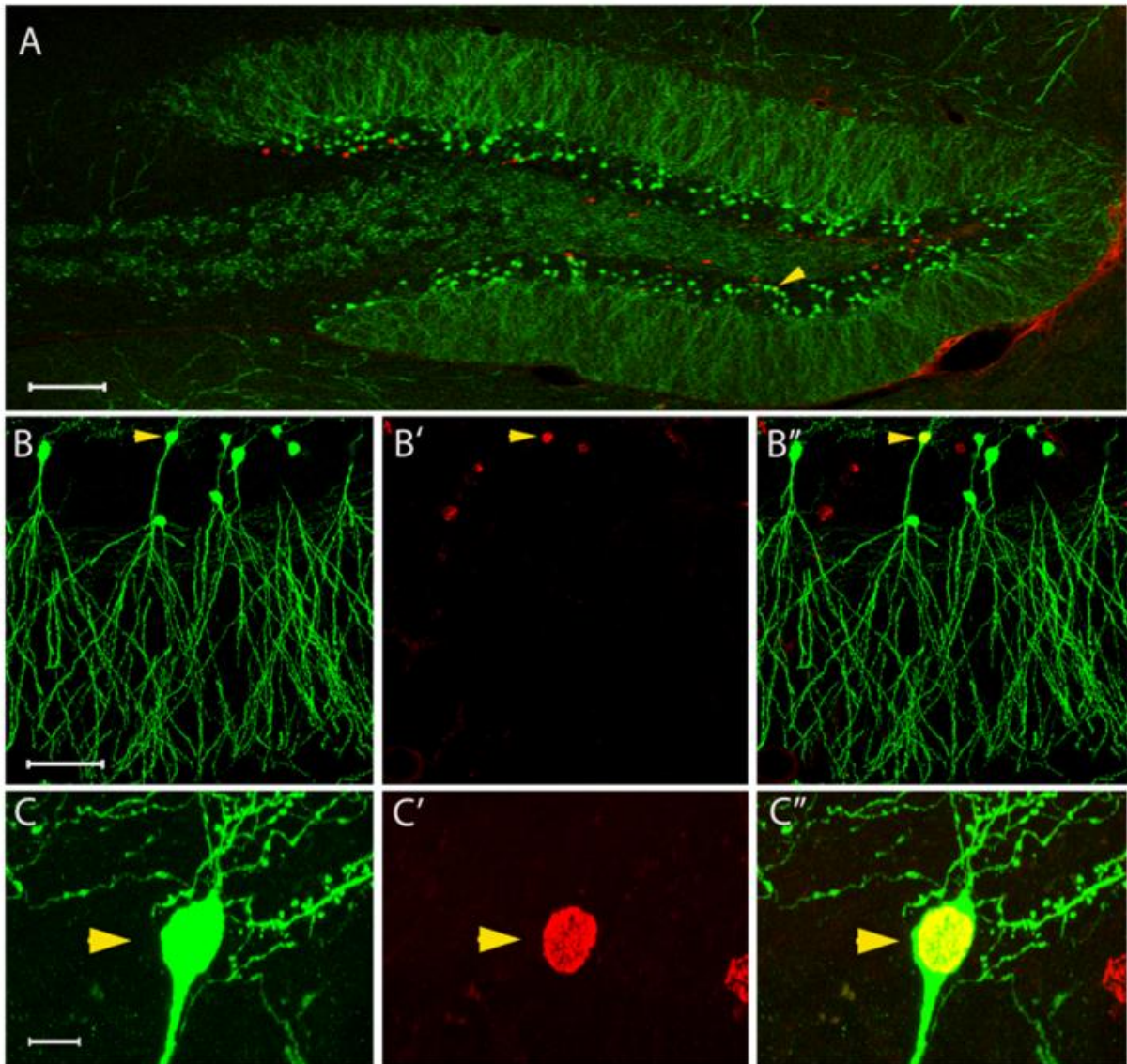


Figura 45. Imagem panorâmica da região hipocampal de camundongos submetidos ao SE por injeção sistêmica de PILO, mostrando células BrdU^+ (vermelho) e GFP^+ (verde). Células co-localizadas com BrdU^+ (vermelho), marcação nuclear utilizada para datar o dia de nascimento das células e células GFP^+ (verde) mostrando a morfologia das células.

Foram desenvolvidos quatro grupos experimentais, para obtenção das células analisadas: **1)** Células Maduras/sem SE (12 semanas), provenientes dos animais injetados com BrdU e perfundidos 12 semanas depois (n= 18 células). **2)** Células Maduras/SE (12 semanas), dos animais que foram injetados com BrdU 8 semanas antes do tratamento com PILO e perfundidos 4 semanas após SE (n= 21 células). **3)** Células Imaturas/sem SE (5 semanas), dos animais injetados com BrdU e após 5 semanas foram perfundidos (n= 19 células). **4)** Células Imaturas/SE (5 semanas), injetadas com BrdU, tratadas com PILO 1 semana depois e então perfundidas após 4 semanas (n = 27) (**Figura 46**).

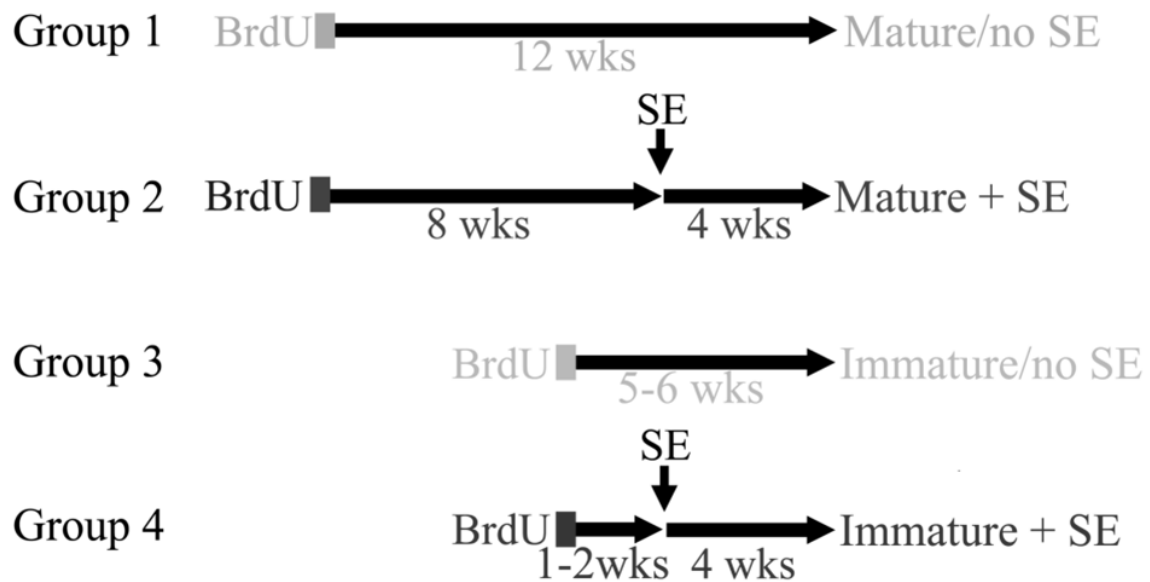


Figura 46. Desenho experimental dos grupos utilizados.

20.1. Células Granulares Maduras expostas ao SE

20.1.1. Estrutura Dendrítica

As células maduras expostas ao SE, apresentaram árvore dendrítica qualitativamente normal, exibindo projeções dendríticas espalhadas na camada molecular com alguns ramos alcançando a fissura hipocampal (**Figura 47**). A morfologia dos dendritos apicais dessas células foram indistinguíveis daqueles das células com a mesma idade do grupo de animais controle, sem SE, ou seja, sem alterações morfológicas “grosseiras”. Interessantemente, em 11,1% das células maduras expostas ao SE (2 de 18 células), encontramos a presença de um grande dendrito basal (152 e 153 μm), projetando para o *hilus*, enquanto que o dendrito basal estava ausente em todas as células maduras/sem SE. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,467$, z-test) e foram consideradas dentro da média normal, já que células granulares de animais controles, ocasionalmente possuem dendritos basais (Walter *et al.*, 2007; Ribak *et al.*, 2000).

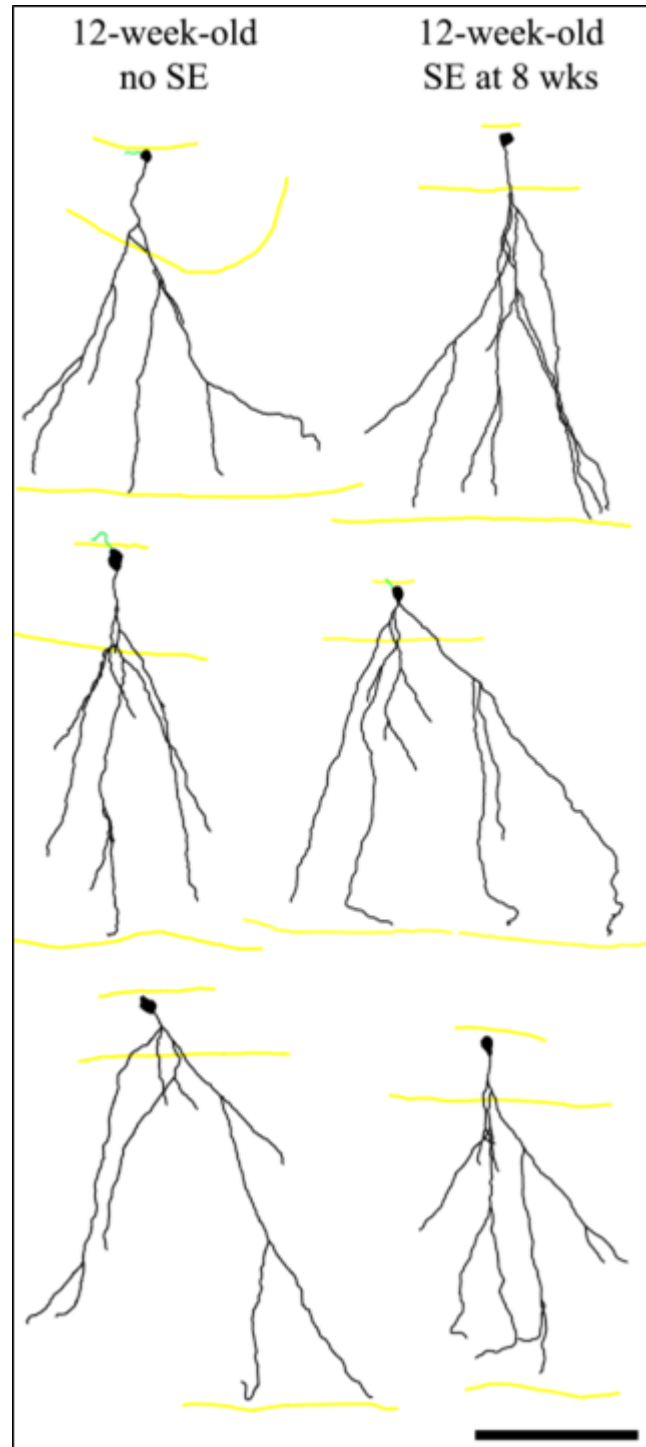


Figura 47. Reconstrução digital de neurônios maduros de animais controle e animais epiléuticos. Não encontramos diferenças estatísticas na morfologia entre os dois grupos analisados. Barra = 500 μm .

Através da reconstrução digital utilizando o *software* Neurolucida, foram realizadas outras análises quantitativas nas células de cada grupo. Essas medidas revelaram similar estrutura dendrítica nos dois grupos analisados (**Tabela 5**). Foi também analisada a trajetória do segmento inicial do dendrito apical em relação ao soma (C. Maduras/sem SE, 14.8 [0-33]; C. Madura/SE, 14.2 [0-38]; $p=0.962$, Mann-Whitney). O número de vezes em que os ramos dendríticos se cruzam com ramos da mesma célula (*self-crossing*), é uma medida utilizada para avaliar o grau em que os ramos dendríticos ocupam espaço e se sobrepõem na camada molecular; essas medidas também foram similares entre os dois grupos. Assim, demonstramos que morfologicamente os dois grupos de células (expostas ou não ao SE) são similares.

Tabela 5. Os valores são correspondentes as médias \pm SEM ou medianas.

	# cells	BD Length (μm)	Soma area (μm^2)	% cells with 2 AD's [median (range)]	AD Branch Points	Self-crossing AD's	Terminal branch order of natural endings	AD Length				
								DGCL layer	IML	MML	OML	Total
Mature/no SE	18	0.0 (0-0)	63.0 \pm 3.7	11.1% [1(1-2)]	6.3 \pm 0.4	3.0 (0-7)	4.6 (3-8)	74.2 (18-121)	139.3 (93-226)	315.4 (96-525)	204.5 (79-353)	786.0 (432-956)
Mature +SE	21	0.0 (0-153)	58.1 \pm 3.7	14.3% [1(1-2)]	6.2 \pm 0.5	3.0 (0-8)	4.0 (1-6)	69.9 (10-144)	158.8 (105-308)	330.9 (215-555)	233.2 (38-581)	799.6 (553-1290)

20.1.2. Espinhos Dendríticos

Para avaliação do número e densidade dos espinhos dendríticos presentes nos dendritos foram capturados um ramo do dendrito apical presente em cada subregião da camada molecular (IML, MML e OML). Apesar das células granulares maduras expostas ao SE não apresentarem variações morfológicas quando comparadas às células controle, encontramos diferenças nas análises de quantificação dos espinhos dendríticos. As células maduras expostas ao SE apresentaram consistente redução na densidade dos espinhos (número de espinhos/comprimento) nas três subregiões da camada molecular relativa às células controle (**Figuras 48**; IML, $p=0.006$; MML, $p=0.004$; OML, $p=0.044$). A reconstrução digital da árvore dendrítica possibilitou a contagem do número de espinhos para cada subregião e fazer a estimativa para a célula inteira (densidade de espinhos x comprimento do dendrito). O número de espinhos das células maduras+SE foi significativamente reduzido nas subcamadas interna e média da camada molecular em relação às células controle (**Figura 48**; IML, $p=0,018$; MML, $p=0,009$). Nos dendritos da camada molecular externa, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas evidentes entre os grupos SE e controle (**Figura 48**). Reduções na densidade dos espinhos nessa região são compensadas pelo grande tamanho do dendrito presente nessa região (Tabela 5).

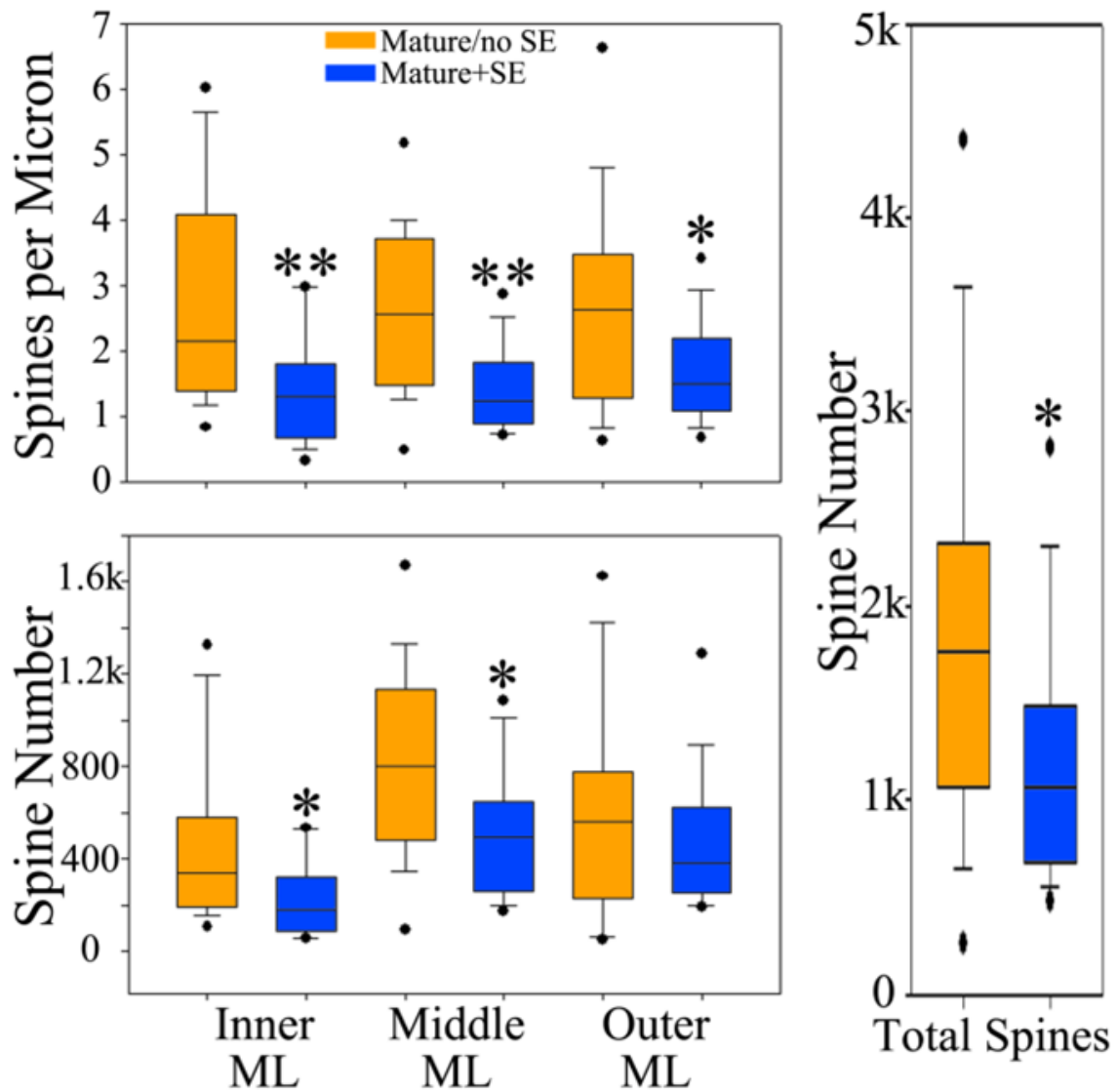


Figura 48. Densidade de espinhos dendríticos reduzida em células com 12 semanas que os animais foram submetidos ao SE quando estavam com 8 semanas após nascimento (maduras). Podemos notar a redução da densidade dendrítica nas 3 subregiões da camada molecular (IML, MML, OML) nas células dos animais SE (azul) em relação às células controle (marrom). IML, $p=0.006$; MML, $p=0.004$; OML, $p=0.044$.

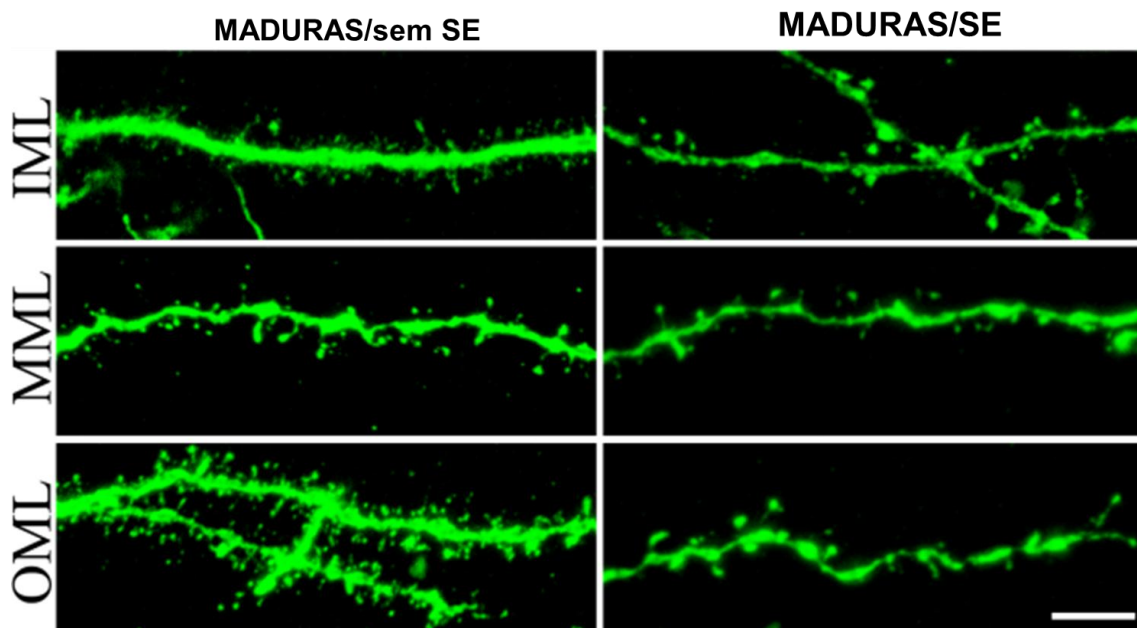


Figura 49. Imagens de confocal de dendritos nas camadas molecular interna (IML), média (MML) e externa (OML), usadas para reconstrução e contagem de espinhos dendríticos em células de 12 semanas, mostrando redução da densidade de espinhos nas três subregiões da camada molecular (IML, MML e OML). Barra de calibração = 10 μm .

Os dois grupos de células também foram avaliados para determinar se havia alguma relação entre a área do soma e a densidade dos espinhos. Estudos prévios, estudando novos neurônios com 3 meses nascidos após indução de SE, mostraram associação positiva entre área do soma e densidade de espinhos dendríticos (Murphy et al., 2011). Interessantemente, a densidade dos espinhos foi significativamente correlacionada com o soma nas subregiões da camada molecular. Na camada molecular interna ($R=0.600$, $p=0.011$; Correlação de PPM / *Pearson Product Moment Correlation - PPM Correlation*), na média ($R=0.780$, $p<0.0002$; Correlação de PPM) e externa ($R=0.498$, $p=0.0498$; PPM Correlation/ Correlação de PPM). Por outro lado, não encontramos correlação direta entre a densidade de espinhos e a área do soma nas células controles em nenhuma subregião da camada molecular (interna, $R=0.120$, $p=0.635$; média, $R=0.328$, $p=0.183$; externa, $R=0.360$, $p=0.142$; PPM Correlation/ Correlação de PPM) (Figura SS gráfico de densidade soma).

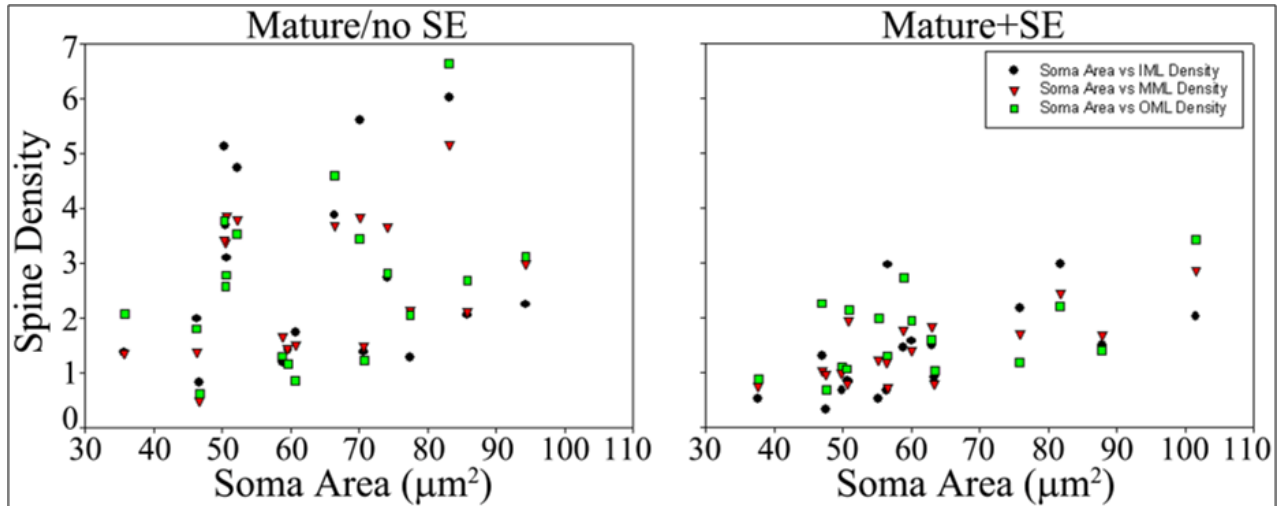


Figura 50. Correlação entre área do soma e densidade de espinhos dendríticos encontrada nas subregiões da camada molecular. As células maduras (Mature+SE) apresentam relação direta entre a área do soma e densidade de espinhos, sugerindo que células menores apresentam menos densidade de espinhos.

20.2. Células Granulares Imaturas expostas ao SE

20.2.1. Estrutura Dendrítica

As análises morfológicas no grupo de células imaturas submetidas ao SE revelaram grandes alterações morfológicas dendríticas em relação às células de mesma idade nos animais controles (**Figura 51**; $p=0.027$, z -test). Especialmente, todas as células imaturas/sem SE foram qualitativamente normais, já em 30% das células SE ocorreu falha ao espalhar (*spreading*) seus dendritos apicais através da camada molecular, dando a essas células uma aparência *fanlike* e desorganizada da árvore dendrítica, exibindo uma área de inervação menor, quando comparado com as células de mesma idade do grupo controle (4 de 27 células). As células SE apresentaram sobreposição das ramificações dendríticas (*self-crossing*) ao invés de espalhar mais os dendritos (2 de 27 células, **Figura 51**). Outra característica importante encontrada, essas células se projetavam mais obliquamente para a camada molecular em relação ao soma ao invés de diretamente (2 de 27 células, **Figura 51**).

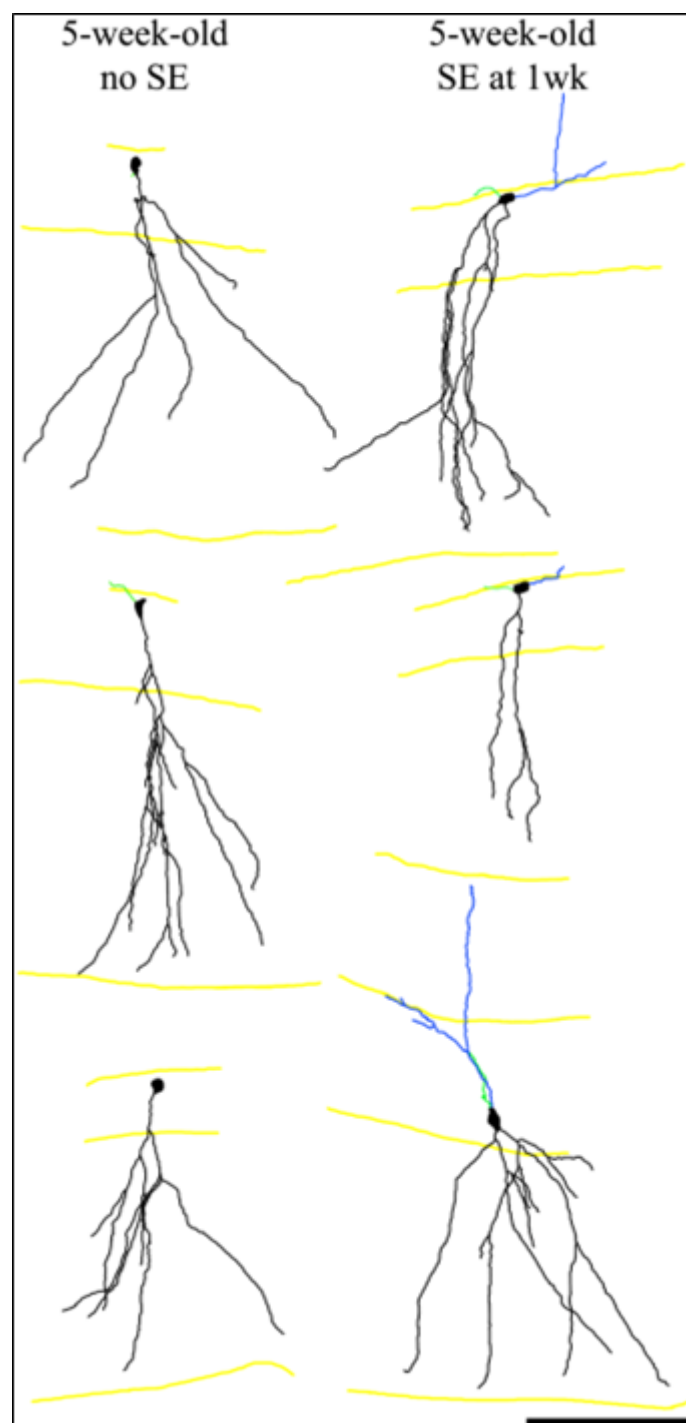


Figura 51. Reconstrução digital de células imaturas submetidas ao SE, encontramos alterações na morfologia da árvore dendrítica apical (preto) e presença de dendritos basais (azul) e axônio (verde).

Interessantemente, o comprimento dos dendritos apicais presentes dentro da camada de células granulares foi significativamente maior para as células imaturas SE em relação às células controles (**Tabela 6**; $p=0,007$ ANOVA *two-way*). O aumento no comprimento dos dendritos encontrado no *stratum granulare* (onde estão os corpos celulares), comumente reflete mudanças na trajetória e padrões de ramificação, embora nenhum desses parâmetros fosse significativo por si só. Especialmente, os dendritos das células imaturas/SE tendem a se projetar com trajetória mais oblíqua na camada de células granulares (em relação à linha perpendicular dessa camada, células controles, $14.1\pm 3.0^\circ$; células imaturas+SE, $23.9\pm 3.2^\circ$, $p=0.145$). A trajetória mais oblíqua encontrada nessa camada aumenta o comprimento dos dendritos dentro da camada de células granulares. Células expostas ao SE também tendem a se ramificar mais dentro da camada granular (células controle, pontos de ramificações 2 [1-4]; células imaturas+SE, 3[0-10]; $p=0.06$, ANOVA *two-way*), similarmente, esse processo também aumenta o comprimento dendrítico nessa camada. Um importante dado é que, enquanto neurônios imaturos+SE tendem a apresentar mais ramificações na camada de células granulares, em geral este grupo tendeu para menos ramos (*branches*), embora, novamente, o efeito não foi estatisticamente significativo (**Tabela 6**).

Para melhor explorar esta tendência, foram determinados os tipos de terminações naturais (não cortadas pelas extremidades do tecido) ou truncados (*truncades*) encontrados nos ramos dendríticos para cada célula. O número de terminações é igual ao número de ramificações entre o soma e a terminação natural + 1, e portanto, oferece outra medida de ramificação dendrítica. Uma vez que analisamos apenas ramificações que apresentaram terminações intactas (naturais), encontramos que o número de ramificações em células imaturas+SE foi significativamente reduzido em relação às células controle (Tabela2, $p=0,004$, ANOVA). Este achado indica que células imaturas expostas ao SE se ramificam menos vezes antes de alcançar seu final na fissura hipocampal. Por outro lado, outras medidas da estrutura neuronal, incluindo a área do soma, comprimento total do dendrito apical, comprimento dendrítico por subregião da camada molecular e número de cruzamentos entre os dendritos foram equivalentes, não apresentando diferenças estatísticas entre os dois grupos de células (**Tabela 6**).

Tabela 6. Os valores são medias \pm SEM ou medianas; *P<0.05, **P<0.01; ANOVA *two-way* . Os valores significativos estão destacados em **negrito**.

	# cells	BD Length (μm)	Soma area (μm^2)	% cells with 2 AD's [median (range)]	AD Branch Points	Self-crossing AD's	Terminal branch order of natural endings	AD Length				
								DGCL layer	IML	MML	OML	Total
Immature/no SE	19	0.0 (0-0)	52.0 \pm 3.6	5.3% [1 (1-2)]	7.1 \pm 0.6	3.5 (0-13)	4.9 (3.5-6.5)	58.8 (29-125)	159.6 (37-198)	259.3 (79-599)	164.5 (46-376)	748.7 (228-1185)
Immature+SE	27	0.0 (0-267)**	54.8 \pm 2.3	29.6% [1 (1-2)]*	6.6 \pm 0.6	3.0 (0-25)	4.0 (2.0-6.0)*	90.3 (10-69)**	166.7 (52-530)	215.5 (38-906)	192.7 (0-475)	654.3 (277-2186)

20.2.1. Espinhos Dendríticos

Da mesma forma do grupo de células maduras, nesse grupo de células imaturas, para avaliação do número e densidade dos espinhos dendríticos presentes nos dendritos, foram capturados um ramo do dendrito apical presente em cada subregião da camada molecular (IML, MML e OML). As células granulares imaturas dos animais SE, apresentaram significativa redução da densidade dos espinhos nas células submetidas ao SE em relação às células controle. A redução foi semelhante nas três subregiões interna, média e externa da camada molecular (**Figura 52** , IML, $p < 0.001$; MML, $p < 0.001$; OML, $p = 0.002$; *ANOVA two-way*), dados consistentes com estudos prévios (Murphy et al., 2011). O número total de espinhos nas células imaturas+SE foi significativamente reduzido em relação as células controles ($p = 0.003$, *ANOVA two-way*). Quando o número de espinhos foi analisado separadamente para cada subregião, encontramos significância estatística na camada molecular média e externa (**Figura 52**; MML, $p = 0.003$; OML, $p = 0.017$; *ANOVA two-way*).

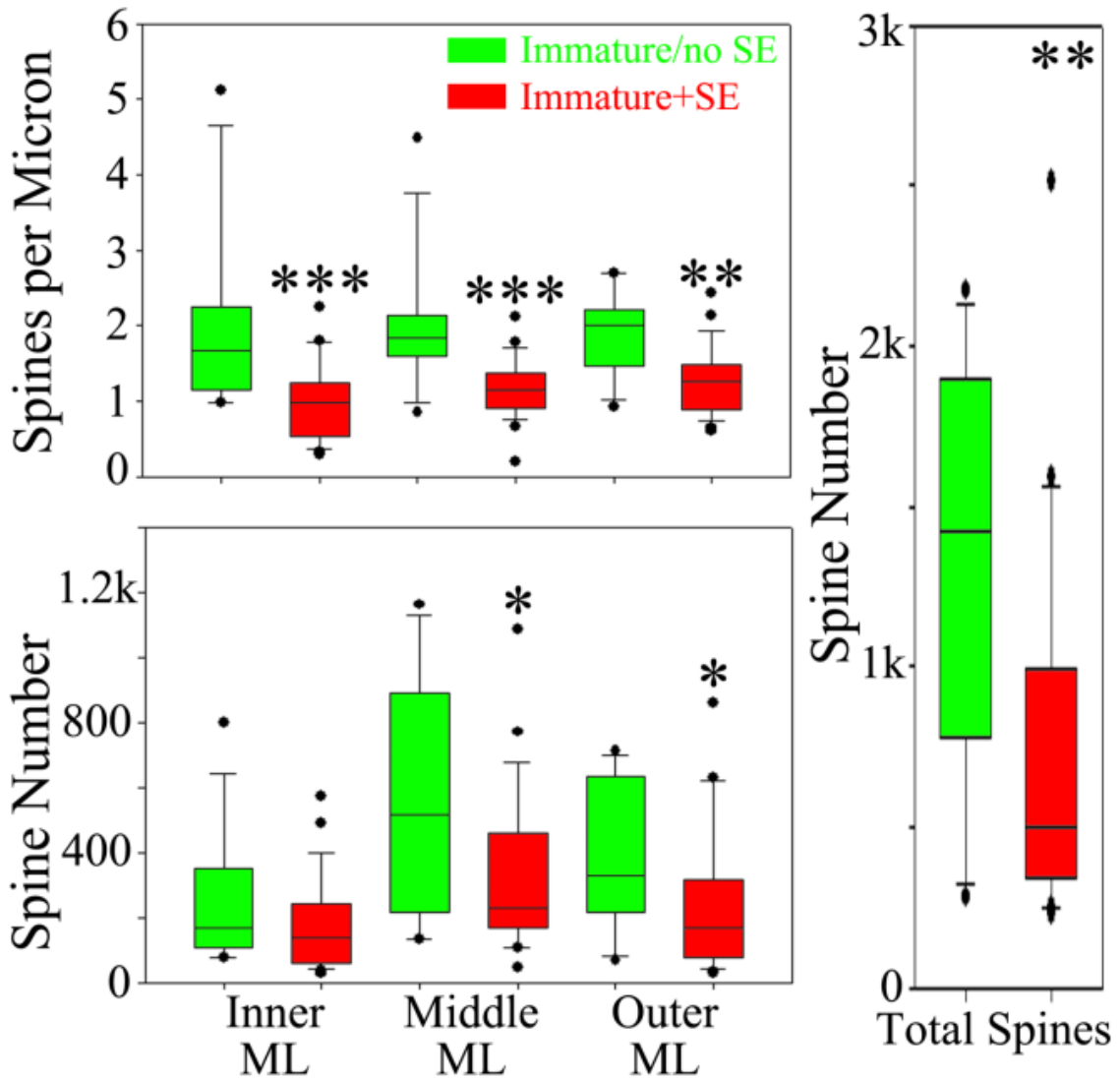


Figura 52. Mostrando que a densidade de espinhos dendríticos reduz em células com 5 semanas de animais que foram submetidos ao SE quando estas células estavam com 1 semanas após nascimento (imaturas). Podemos notar a redução da densidade dendrítica nas 3 camadas da camada molecular (IML, MML, OML) nas células imaturas+SE (vermelho) em relação às células controle (verde). IML, *** $p < 0.001$; MML, *** $p < 0.001$; OML, ** $p = 0.002$; ANOVA two-way.

Outras análises em relação à densidade dos espinhos foram exploradas. Investigamos se a densidade de espinhos estava relacionada com a área do soma ou o comprimento do dendrito basal. Não encontramos relações significativas entre a densidade de espinhos na camada molecular interna e a área do soma ($R= 0.104$, $p=0.607$; *Pearson Product Moment Correlation*) ou em relação ao comprimento do dendrito basal = -0.087 , $p=0.662$; *Spearman Rank Order Correlation*). De maneira similar, não encontramos correlações significativas entre a densidade de espinhos nas camadas moleculares média e externa com a área do soma ou comprimento do dendrito basal. Por final, não encontramos relação entre a densidade de espinhos nas camadas moleculares e área do soma nas células controles (dados não mostrados).

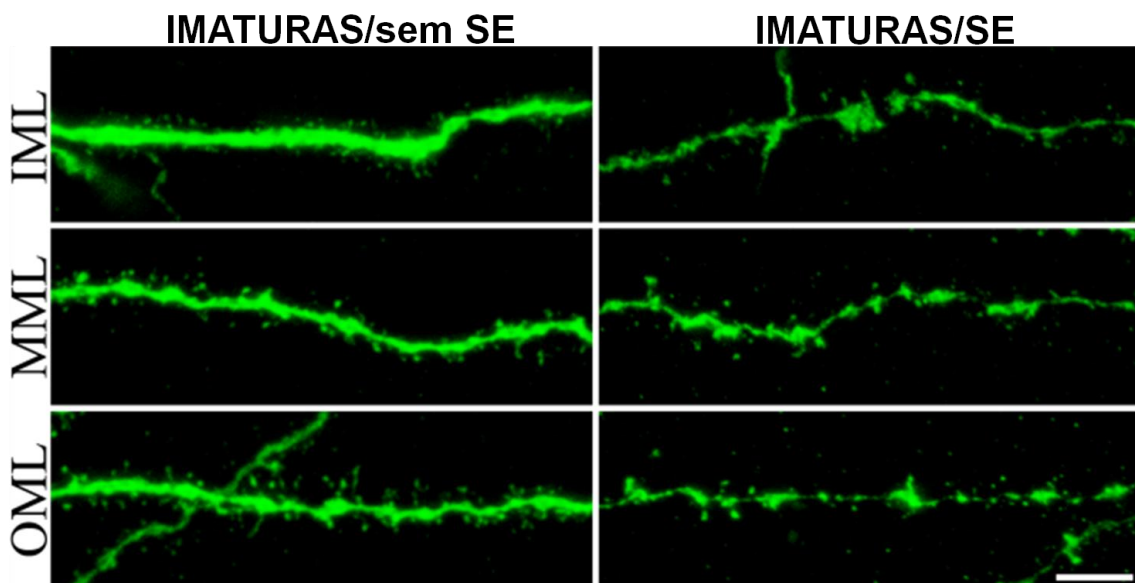


Figura 53. Imagens de microscópio confocal de dendritos nas camadas molecular interna (IML), média (MML) e externa (OML), usadas para reconstrução e contagem de espinhos dendríticos em células de 5 semanas, mostrando redução da densidade de espinhos nas três subregiões da camada molecular (IML, MML e OML) de células expostas ao status epilepticus. Barra de calibração = 10 μm .

21. Discussão

Sob condições fisiológicas, no cérebro adulto de mamíferos, ocorre constante produção de novos neurônios em duas áreas específicas. Na parede do ventrículo lateral (SVZ), novas células são constantemente produzidas e migram, através da via rostral (RMS), até o bulbo olfatório onde se diferenciam em interneurônios se inserindo no sistema. Na zona subgranular (SGZ) do giro dentado do hipocampo, novos neurônios granulares são produzidos e inseridos na camada granular diariamente. Com a produção constante de novos neurônios nessas regiões, o giro dentado contém um conjunto de células maduras e imaturas variando a idade em dias, meses e até anos. Quando insultos ocorrem no cérebro, essas diferenças de idade se tornam importantes, representando diferentes formas de como as células respondem a estímulos desenvolvendo fenômenos plásticos.

Já foi mostrado na literatura que alterações na morfologia das células granulares são dependentes do estágio de maturação em que elas se encontram no momento do insulto (Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007; Kron *et al.*, 2010). No presente estudo, comparamos as respostas de células granulares imaturas e maduras ao SE. Células imaturas foram expostas ao SE com uma semana de idade e células maduras expostas com 2 meses após nascimento (8 semanas). Ambos os grupos foram examinados 4 semanas após SE, garantindo que as células estudadas estavam no estágio da epileptogênese. Nos modelos de ELT, as CRE normalmente se iniciam em aproximadamente 1 mês após indução de SE, embora a progressão da doença continue por mais tempo (Williams *et al.*, 2009). Consistente com estudos prévios (Walter *et al.*, 2007; Jessberger *et al.*, 2007; Kron *et al.*, 2010), células granulares imaturas expostas ao SE, exibem uma gama de alterações plásticas um mês após SE, incluindo formação de dendritos basais, morfologia alterada dos dendritos apicais e perda de espinhos dendríticos. Com esses achados podemos delinear a dinâmica das mudanças na estrutura das células granulares pós-SE e servem como importantes controles positivos para comparação e interpretação das mudanças encontradas nas células maduras.

Em contraste com as células imaturas, que apresentam expressivas alterações estruturais em resposta à exposição ao SE, as células maduras apresentam morfologia da árvore dendrítica qualitativamente e quantitativamente normal. Por outro lado, a redução na densidade de espinhos dendríticos encontrada em células imaturas após SE,

foi evidente também nas células maduras exibindo significativa redução na densidade e no número de espinhos nessas células. A redução na densidade dos espinhos foi consistente nas três lâminas da camada molecular e a significativa redução no número dos espinhos foi evidente apenas nas lâminas interna e média da camada molecular (IML e MML). A perda na densidade de espinhos nessas áreas sugere redução de inputs (afêrências) da comissura hipocampal/córtex de associação e do córtex entorrinal medial, respectivamente. Dessa maneira, esses dados confirmam estudos anteriores demonstrando que células granulares imaturas sofrem mais profundas alterações plásticas durante estágios iniciais de epileptogênese e juntamente com esses achados, células maduras também sofrem significantes reestruturações morfológicas, especialmente na perda de espinhos durante o desenvolvimento da epilepsia. O impacto dessas mudanças na epileptogênese e cognição continuam desconhecidos.

21.1. Mudanças plásticas nas células granulares imaturas expostas ao SE

Estudos da literatura utilizando a mesma estratégia para marcar o dia de nascimento das células com BrdU em animais transgênicos (*Thy1-GFP*), encontraram que células imaturas que foram submetidas ao SE, apresentaram alterações plásticas 3 meses após a exposição ao SE similares às encontradas em nosso trabalho um mês após SE (Murphy *et al.*, 2011). Mesmo após 3 meses que as células foram expostas ao SE, foram encontradas alterações na árvore dendrítica apical, presença de dendritos basais e diminuição na densidade de espinhos, mostrando assim que essas alterações são persistentes após 3 meses. Nesse trabalho, as células estudadas exibiram significantes diferenças em relação ao nosso estudo como aumento no número de cruzamentos dendríticos (“*self-crossing*”). Células granulares normalmente projetam seus ramos dendríticos para longe dos ramos vizinhos, aumentando assim a área de “inervação” dendrítica, criando uma característica bem espalhada da árvore dendrítica (“*fanlike*”). Esse padrão de inervação presumivelmente aperfeiçoa a área amostrada pelas afêrências dendríticas. Assim com o aumento nos auto-cruzamentos dos dendritos, teoricamente ocorre diminuição na região amostrada ou inervada na camada molecular ou a mesma área pode ser amostrada mais de uma vez. Interessante que, o fato dessas mudanças serem encontradas em células 3 meses após SE e não 1 mês depois, implica que células aumentam seus ramos dendríticos nesse intervalo, apresentando mudanças estruturais

tardias e a médio-longo prazo. Ainda sobre o trabalho de Murphy et al., 2011, a despeito da perda de espinhos dendríticos encontrado pelos autores, foi encontrada uma porcentagem das células (~10 %) que apresentaram um aumento na densidade dos espinhos e hipertrofia dos corpos celulares freqüentemente acompanhados de longos dendritos basais, que na maioria das vezes eram inervados por brotamentos das fibras musgosas.

A ocorrência de hipertrofia (aumento do soma) e hiperconectividade (aumento da densidade dos espinhos) nas células granulares imaturas, parece ser uma das últimas alterações plásticas que acometem células imaturas após SE (Murphy *et al.*, 2011). O desenvolvimento tardio dessas características é significativo, já que, CRE se desenvolvem antes de um ou 3 meses, assim, a presença dessas células hipertróficas no sistema não é uma característica essencial para o surgimento de CRE (Williams *et al.*, 2009). Contudo, células hipertróficas devem ter alguma função na progressão da epilepsia. Portanto, é importante mencionar que células granulares nascidas em outras janelas temporais relativas ao SE, exibem diferentes características patológicas (Walter *et al.*, 2007; Kron *et al.*, 2010; Danzer, 2011), assim devemos analisar com cautela o presente estudo e explorar a presença de outras variáveis no processo de epileptogênese, como por exemplo, brotamento de fibras musgosas e morte neuronal (Arisi & Garcia-Cairasco, 2007; Castro *et al.*, 2011).

A presença dessas alterações vistas um mês depois da exposição ao insulto (neste caso SE), indicam que essa patologia se desenvolve rapidamente depois do insulto inicial. Outros trabalhos indicam que, algumas alterações plásticas encontradas, se desenvolvem em células ainda mais jovens, como em células granulares imaturas expressando DCX (Arisi & Garcia-Cairasco, 2007; Shapiro *et al.*, 2007). Em estudos anteriores do nosso laboratório (Arisi & Garcia-Cairasco, 2007), estudando células expressando DCX nascidas após indução do SE, foi observado que essas células apresentaram morfologia alterada dos dendritos apicais com maior número de ramos presentes nas camadas granular e molecular interna, mas com ramos dendríticos mais curtos, apresentando uma eventual “poda” na região onde usualmente encontramos o brotamento de fibras musgosas.

Shapiro *et al.*, (2007), demonstraram que células DCX+ dois dias após SE, já apresentam dendrito basal projetando em direção ao *hilus* e que no quarto dia após SE os dendritos basais recebem sinapses de fibras com características morfológicas e funcionais de um circuito excitatório recorrente.

Redução da densidade de espinhos entre as células granulares maduras e imaturas expostas ao SE.

Apesar de estudos anteriores não marcarem o dia exato de nascimento das células granulares, um padrão inicial de perda de espinhos (Isokawa, 1998; Isokawa, 2000; Kurz *et al.*, 2008; Thind *et al.*, 2010) é seguido de uma recuperação na densidade dos espinhos (Isokawa, 1998; Isokawa, 2000; Thind *et al.*, 2010), uma característica frequentemente encontrada em modelos de epilepsia. As principais aferências recebidas pelas células granulares são provenientes do córtex entorrinal, através da via perfurante e de células musgosas presentes no *hilus*. A geração do SE geralmente resulta na morte de células musgosas (Borges *et al.*, 2003; Boulland *et al.*, 2007; Jiao & Nadler, 2007) e de neurônios principais das camadas II e III do córtex entorrinal (Kumar & Buckmaster, 2006; Castro *et al.*, 2011). A perda neuronal resulta na perda de suas projeções para a camada molecular e assim “des-aferenciação” das células granulares. Assim, a rápida perda de espinhos encontrada no presente estudo pode refletir à perda de aferências pelas células granulares provenientes do córtex entorrinal e células musgosas do *hilus* devido a mecanismos insultos excitotóxicos (Swann *et al.*, 2000).

Jakubs *et al.*, (2006), encontraram que células granulares nascidas uma semana após SE e estudadas 4-6 semanas depois através de *patch clamp*, apresentaram significativa redução na frequência de correntes excitatórias pós-sinápticas (ESPC). A janela temporal estudada nesse trabalho é similar à nossa e a redução na frequência de correntes excitatórias pós-sinápticas é consistente com a perda na densidade de espinhos dendríticos. Nesse mesmo estudo, os autores observam que as ESPC registradas nas células maduras expostas ao SE, apresentam frequências normais.

22. Conclusões

- ✓ Células nascidas antes do SE são susceptíveis a alterações plásticas em decorrência ao SE.
- ✓ Células imaturas apresentam alteração na morfologia da árvore dendrítica apical.
- ✓ Células imaturas apresentam formação de dendrito basal.
- ✓ Células imaturas diminuem a densidade de espinhos dendríticos após SE.
- ✓ Células maduras não apresentam formação de dendrito basal.
- ✓ Células maduras não sofrem alterações na morfologia da árvore dendrítica apical após SE.
- ✓ Células maduras diminuem a densidade de espinhos dendríticos após SE.

23. Neuroplasticidade e Epilepsia

Um dos mais intrigantes temas da neurociências é a habilidade do SNC em mudar sua estrutura em resposta a estímulos externos, um fenômeno referido como plasticidade ou neuroplasticidade. A epilepsia é uma multifatorial e debilitante patologia que está entre os processos que mais alteram aguda ou cronicamente a estrutura cerebral. Vários são os modelos utilizados na tentativa de mimetizar os eventos plásticos que tornam o cérebro normal em epilético apresentando crises espontâneas. Dentre as estruturas envolvidas na epilepsia de lobo temporal, o hipocampo parece ser a mais proeminente envolvida na geração, propagação e manutenção das crises. Uma vez que, uma característica marcante nesse tipo de epilepsia e em sua circuitaria é a presença de um insulto inicial que após um período latente variado leva ao surgimento de crises espontâneas. Entender os processos chave que se desenvolvem durante o período latente é de fundamental importância para entender as causas da epilepsia e buscar novas terapias e prevenções para pacientes que sofrem dessa patologia.

As células granulares do giro denteado são neurônios excitatórias que estão situadas na entrada do hipocampo, agindo como intermediárias entre o córtex entorrinal e as células piramidais em CA3 e CA1. Assim, o giro denteado atua como “comporta” (“*gate*”), controlando a quantidade de aferências excitatórias que adentram no hipocampo. O controle inibitório das células granulares é feito através de interneurônios GABAérgicos presentes no *hilus*. Assim, o controle da informação que passa pelo giro denteado é importante para controlar que a propagação do estímulo excitatório que entra no hipocampo se espalhe subsequentemente às estruturas adiantes. Finalmente, falha em barrar a passagem de excesso de aferências nessa circuitaria é evidente em vários modelos de epilepsia e parece exercer um papel importante na hiperexcitabilidade tecidual, encontrada em pacientes epiléticos. Essa falta de inibição pode ser em

decorrência a extensa morte celular de interneurônios presentes no *hilus*, que já é bem demonstrado essas células serem vulneráveis à excitotoxicidade após crises epiléticas. No primeiro capítulo de nosso trabalho, demonstramos que 24h após insulto epileptogênico inicial, SE, ocorre vasta marcação de neurônios em degeneração pela histoquímica de Fluorojade C. Analisando animais, após 14 dias, encontramos que na mesma região dos neurônios FJC⁺, observamos ausência de células através da marcação com NeuN, corroborando com dados de outros modelos, onde morte neuronal nessa região pode levar ao aumento na excitabilidade da circuitaria do giro denteado pela falta de inibição das células granulares.

Outra alteração plástica importante, presente no giro denteado de animais após SE, é o aparecimento de brotamento de colaterais das fibras musgosas, axônios das células granulares que se comunicam excitatóriamente neurônios piramidais em CA3. O brotamento dessas fibras cresce até a camada molecular interna se comunicando excitatóriamente com dendritos apicais de células granulares vizinhas podendo formar circuitos excitatórios recorrentes, auto-excitando células granulares e conseqüentemente aumentando a excitabilidade local. Entretanto, em nosso estudo não encontramos essa alteração plástica, embora utilizando o mesmo modelo Nissinen et al., 2000 encontrou brotamento em animais 6 meses após SE. Entendemos que as janelas temporais estudadas por nós, não é suficientemente longa para aparecimento dessas alterações.

Um evento comumente visto em pacientes com ELT e em modelos animais, é a migração e inserção de células ectópicas na circuitaria hipocampal. Células granulares migram erroneamente para o *hilus* se inserindo e perturbando a circuitaria local. Essas células apresentam características fisiológicas semelhantes às demais células granulares maduras presentes na camada granular (excitatórias) e conexão mono-sináptica com neurônios piramidais presentes em CA3. Essas células recebem inervações excitatórias de células granulares presentes na camada granular e se comunicam

desorganizadamente com outras células vizinhas, perturbando a circuitaria local, podendo levar ao aumento na excitabilidade do hipocampo. Em nosso trabalho, encontramos aumento expressivo de células granulares presentes no *hilus*, podendo essas favorecer à hiperexcitabilidade tecidual.

Encontramos o aumento significativo da neurogênese, processo que produz e insere funcionalmente mais neurônios granulares no giro denteado no cérebro adulto. Vários estudos sobre esse processo, demonstraram aumento significativo na proliferação e diferenciação de neurônios após SE. Embora esse processo pudesse refletir uma tentativa do sistema em repor células mortas, a migração, inserção e maturação desses novos neurônios acontece em parte da população neuronal de forma aberrante. Estudos demonstraram morfologia alterada nos dendritos apicais dessas células, surgimento de dendrito basal e alterações na densidade de espinhos dendríticos após SE. Nós encontramos a presença de dendrito basal de células granulares no *hilus* e redução na densidade de células granulares em diferentes estágios de maturação.

Concluindo, várias alterações plásticas são encontradas no hipocampo de animais após insulto epileptogênico inicial, como o SE. Afirmar qual deles é o responsável pelo surgimento de crises recorrentes espontâneas é difícil, senão insensato, já que dificilmente pacientes ou modelos animais apresentam apenas um ou outro desses processos. Talvez, afirmar que, a junção dos vários fatores culminam em alterações suficientemente grandes o bastante para tornar um cérebro normal em epilético apresentando diversas crises recorrentes espontâneas seja mais prudente. Talvez se conseguíssemos isolar os eventos isoladamente uns dos outros, tais como, neurodegeneração, brotamento de fibras musgosas, neurogênese e migração ectópicas de células granulares, poderíamos esclarecer melhor os processos por trás da ELT. Outros trabalhos são necessários para elucidar e detalhar os eventos que levam ao surgimento da epilepsia de lobo temporal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

24. Referências bibliográficas

Altman J, & Bayer SA. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. **J Comp Neurol.** 1990 Nov 15;301(3):365-81.

Altman J, & Das GD. (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. **Nature.** 1965 Aug 28;207(5000):953-6.

Altman J, & Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol.** 1965 Jun;124(3):319-35.

Altman J, & Das GD. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **J Comp Neurol.** 1966 Mar;126(3):337-89.

Amaral DG.(1999). Introduction: what is where in the medial temporal lobe? **Hippocampus.** 1999;9(1):1-6.

Amaral GD, Witter PM (2004) Hippocampal formation In The rat nervous system. George Paxinos. Third edition.Sydiney Australia. P. 635-703.

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. (2007). The Hippocampus Book. Published by Oxford University Press, Inc.

Anderson JE, Wible CG, McCarley RW, Jakab M, Kasai K, Shenton ME.(2002). An MRI study of temporal lobe abnormalities and negative symptoms in chronic schizophrenia. **Schizophr Res.** 2002 Dec 1;58(2-3):123-34.

Arisi GM, Garcia-Cairasco N. (2007) Doublecortin-positive newly born granule cells of hippocampus have abnormal apical dendritic morphology in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Res.;** 1165:126-34. Epub 2007 Jul 5.

Arisi GM, Foresti ML, Mukherjee S, Shapiro LA. (2011). The role of olfactory stimulus in adult mammalian neurogenesis. **Behav Brain Res.** 2011 Mar 29. [Epub ahead of print]

Aroniadou-Anderjaska V, Fritsch B, Qashu F, Braga MF. (2008). Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. **Epilepsy Res.** 2008 Feb;78(2-3):102-16. Epub 2008 Jan 15.

Baimbridge KG, Miller, JJ (1982) Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. **Brain Res**, 245(2):223-9.

Baker GA, Smith DF, Dewey M, Jacoby A, Chadwick DW.(1993) The initial development of a health-related quality of life model as an outcome measure in epilepsy. **Epilepsy Res.** Volume 16, Issue 1, September 1993, Pages 65-81

Ben-Ari Y, Lagowska Y, Le Gal La Salle G, Tremblay E, Ottersen OP, Naquet R. (1978). Diazepam pretreatment reduces distant hippocampal damage induced by intra-amygdaloid injections of kainic acid. **Eur J Pharmacol.** 1978 Dec 1;52(3-4):419-20.

Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Meldrum BS (1980) The role of epileptic activity in hippocampal and remote cerebral lesions induced by Kainic, 191:79-97.

Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Naquet R (1979) Evidence suggesting secondary epileptogenic lesions after Kainic acid: Pretreatment with diazepam reduces distant but not local brain damage. **Brain Res**, 165:362-365.

Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1997 Sep 16;94(19):10432-7.

Bertam, EH, Cornet JF (1994) The evolution of rat model of chronic spontaneous limbic seizures. **Brain Res**, 661:157-162.

Bernard C, Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y. (1998). Interneurons are not so dormant in temporal lobe epilepsy: a critical reappraisal of the dormant basket cell hypothesis. *Epilepsy Res.* 1998 Sep;32(1-2):93-103

Briellmann RS, Berkovic SF, Syngeniotis A, King MA, Jackson GD. (2002). Seizure-associated hippocampal volume loss: a longitudinal magnetic resonance study of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 2002 May;51(5):641-4.

Brenner C, Merrit HH (1942) Effects of certain derivatives on electrical activity of the cortex. **Arch Neurol Phychiartr**, 48:382-395.

Castro OW, Furtado MA, Tilelli CQ, Fernandes A, Pajolla GP, Garcia-Cairasco N. (2011). Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain Res.** 2011 Feb 16;1374:43-55. Epub 2010 Dec 11.

Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM.(1990). Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. **J Comp Neurol.** 1990 Dec 8;302(2):206-19.

Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience.** 1987 Dec;23(3):953-68.

Clifford DB, Olney JW, Benz AM, Fuller TA, Zorumski CF. (1990). Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizure-related brain damage. **Epilepsia.** 1990 Jul-Aug;31(4):382-90.

Delgado Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ (1999) New waves of research in the epilepsies: crossing into the third millennium. In: Delgado Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW and Poter. (Eds). *Jasper's Basic Mechanism of the Epilepsies*. Third Edition: **Advances in Neurology**, 79. Lippincott Willians, Wilkins, Philadelphia.

De Lorenzo RJ, Garnett LK, Towne AR, Waterhouse EJ, Boggs JG, Morton L, Choudhry MA, Barnes T, KO D (1999) Comparison of status epilepticus with prolonged seizures episodes lasting from 10 to 29 minutes. **Epilepsia**. 40(2):164-169.

Doretto MC, Fonseca CG, Lôbo RB, Terra VC, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). **Behav Genet**. 2003 Jan;33(1):33-42.

Danzer SC, Pan E, Nef S, Parada LF, McNamara JO. (2004). Altered regulation of brain-derived neurotrophic factor protein in hippocampus following slice preparation. **Neuroscience**. 2004;126(4):859-69.

Danzer SC, He X, Loepke AW, McNamara JO. (2004). Structural plasticity of dentate granule cell mossy fibers during the development of limbic epilepsy. **Hippocampus**. 2010 Jan;20(1):113-24.

De Lorenzo RJ, Garnett LK, Towne AR, Waterhouse EJ, Boggs JG, Morton L, Choudhry MA, Barnes T, KO D (1999) Comparison of status epilepticus with prolonged seizures episodes lasting from 10 to 29 minutes. **Epilepsia**, 40(2):164-169.

De Lorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. (2005). Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. **Pharmacol Ther**. 2005 Mar;105(3):229-66. Epub 2004 Dec 9.

Delgado Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ (1999) New waves of research in the epilepsies: crossing into the third millennium. In: Delgado Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW and Porter. (Eds). *Jasper's Basic Mechanism of the Epilepsies*. Third Edition: **Advances in Neurology**, 79. Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia.

Deller T, Drakew A, Frotscher M. (1999). Different primary target cells are important for fiber lamination in the fascia dentata: a lesson from reeler mutant mice. **Exp Neurol**. 1999 Apr;156(2):239-53.

Doetsch F, & Alvarez-Buylla A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1996 Dec 10;93(25):14895-900.

Dragunow M, & Robertson HA. (1987) Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. **Nature.** 1987 Oct 1-7;329(6138):441-2.

Dragunow M, Robertson HA, Robertson GS. (1988). Amygdala kindling and c-fos protein(s). **Exp Neurol.** 1988 Nov;102(2):261-3.

Dubé C, André V, Covolan L, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A.(1998). C-Fos, Jun D and HSP72 immunoreactivity, and neuronal injury following lithium-pilocarpine induced status epilepticus in immature and adult rats. **Brain Res Mol.** 1998 Dec 10;63(1):139-54.

Dudek FE.(2006). Activation of Fos during spontaneous hippocampal seizures in a model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Curr.** 2006 Mar-Apr;6(2):57-8.

Dudek FE. (2006). How independent are initiation, propagation, and termination of epileptiform activity? **Epilepsy Curr.** 2006 May-Jun;6(3):93-5.

Ehninger D, Kempermann G. (2006). Paradoxical effects of learning the Morris water maze on adult hippocampal neurogenesis in mice may be explained by a combination of stress and physical activity. **Genes Brain Behav.** 2006 Feb;5(1):29-39.

Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Nov 11;100(23):13632-7. Epub 2003 Oct 27.

Engel J. Jr (2001) A Proposed Diagnostic Scheme for People with epileptic Seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and Terminology. **Epilepsia**, 42(6):796-803.

Fabene PF, Andrioli A, Priel MR, Cavalheiro EA, Bentivoglio M. (2004). Fos induction and persistence, neurodegeneration, and interneuron activation in the hippocampus of epilepsy-resistant versus epilepsy-prone rats after pilocarpine-induced seizures. **Hippocampus**. 2004;14(7):895-907.

Fanarraga ML, Avila J, Zabala JC. (1999). Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. **Eur J Neurosci**. 1999 Feb;11(2):517-27.

Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. **Neuron** 28(1):41-51.

Freund TF, Buzsáki G.(1996). Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus**. 1996;6(4):347-470.

Fisher RS (1989) Animal models of epilepsies. **Brain Res**, 14:245-278.

Fountain NB, Lothman EW (1995) Pathophysiology of status epilepticus. **J Clin Neurophysiol**, 12(4):326-42.

Fuerst D, Shah J, Shah A, Watson C. (2003). Hippocampal sclerosis is a progressive disorder: a longitudinal volumetric MRI study. **Ann Neurol**. 2003 Mar;53(3):413-6

Fujikawa DG. (1996). The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res**. 1996 Jun 24;725(1):11-22.

Fujikawa DG (2005) Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. **Epilepsy Behav**. Suppl, 3:S3-11.

Furtado MA, Braga GK, Oliveira JA, Del Vecchio F, Garcia-Cairaso N (2002) Behavioral, Morphological and Electroencephalographic Evaluation of seizures induced by intrahippocampal Microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, 43 (Suppl) 5:37-39.

Furtado MA (2003) Crises induzidas por pilocarpina intra-hipocampal em ratos wistar: aspectos comportamentais, morfológicos e eletrencefalográficos. Tese de doutorado apresentada à faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de fisiologia – Universidade de São Paulo.

Furtado MA, Castro OW, Del Vecchio F, de Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. (2010). Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Epilepsy Behav.** 2011 Feb;20(2):257-66. Epub 2011 Jan 14

Gage FH. (1998). Stem cells of the central nervous system. **Curr Opin Neurobiol.** 1998 Oct;8(5):671-6.

Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. **Science.** 2000 Feb 25;287(5457):1433-8.

Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. **J Neurobiol.** 1998 Aug;36(2):249-66.

Galvis-Alonso OY, Cortes De Oliveira JA, Garcia-Cairasco N (2004) Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). **Neuroscience**,125(3):787-802.

Galvis-Alonso O, Garcia-Cairasco N (2002) Behavioral electroencephalographic and cellular alterations induced by audiogenic kindling. Program No. 793. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience. On-line.

Galvis-Alonso OY (2002) Estudo de alterações comportamentais, eletrofisiológicas e celulares induzidas pelo abrasamento audiogênico. Tese de doutorado apresentada à faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de fisiologia – Universidade de São Paulo.

Garcia-Cairasco N, Doreto M.C, Lobo R.B (1990) Genetic selection of Wistar rats susceptible to audiogenic seizures: a quantitative analysis. **Epilepsia**, 31: 815.

Garcia-Cairasco N, Sabbatini RM (1991) Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. **Physiol Behav**, 50:421-427.

Garcia-Cairasco N, Doretto MC, Prado P, Jorge BPD, Terra VC, Oliveira J.A.C (1992) News insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods. **Behav. Brain Res**, 48:49-56.

Garcia-Cairasco N, Terra VC, Oliveira J.A.C, Antunes-Rodrigues J (1994) Diuresis and Natriuresis in non-seizing and kindled rats from a genetically audiogenic susceptible strain. **Neuro Report** 5, 1873-1876.

Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JÁ, Gomes EL, Del Bel EA and Mello LE (1996) Neuroethological and morphological (Neo Timm Staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizures susceptible Wistar rats. **Epilepsy Res**, 26:177-192.

Garcia-Cairasco N, Rossetti F, Oliveira JA, Furtado M A (2004) Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). **Epilepsy Behav**. 5(4):455-63.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. **Nature**. 2006 Feb 2;439(7076):589-93. Epub 2005 Dec 11.

Geddes JW, Cotman CW (1986) Plasticity in hippocampal circuitary amino acid receptors in **Alzheimer's disease**. **Brain Res**, 339: 156-161.

Ghosh A, & Greenberg ME. (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. **Science**. 1995 Apr 14;268(5208):239-47.

Gilbert ME. (2001). Does the kindling model of epilepsy contribute to our understanding of multiple chemical sensitivity? **Ann N Y Acad Sci.** 2001 Mar;933:68-91.

Gloor P (1991) Mesial Temporal sclerosis: historical background and overview from a modern perspective. In: Lüders H (ed). **Epilepsy Surgery.** New York, Raven Press, p 689-703.

Gloor P (1997). The hippocampal system. In the temporal lobe and limbic system. Gloor P. Oxford university Press, Inc New York. P 325-589.

Goddard GV (1967) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, 214:1020-1021.

Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical. **Exp Neurol.** 25, 295-330.

Gould E, & Cameron HA. (1996). Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. **Dev Neurosci.** 1996;18(1-2):22-35.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosci.** 1997 Apr 1;17(7):2492-8.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1998 Mar 17;95(6):3168-71.

Gratzner HG. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. **Science.** 1982 Oct 29;218(4571):474-5.

Gross CG. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nat Rev Neurosci.** 2000 Oct;1(1):67-73.

Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM.(1997). Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1997 Nov 25;94(24):13311-6

Handforth A, Ackermann RF (1993). Electrogenic status epilepticus induced from numerous limbic sites. **Epilepsy Res**. 1993 May;15(1):21-6.

Han ZS, Buhl EH, Lörinczi Z, Somogyi P. (1993). A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. **Eur J Neurosci**. 1993 May 1;5(5):395-410.

Hartmann J, & Konnerth A.(2005). Determinants of postsynaptic Ca²⁺ signaling in Purkinje neurons. **Cell Calcium**. 2005 May;37(5):459-66.

Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. **Nature**. 2000 Oct 12;407(6805):770-6.

Henshall DC, & Simon RP. (2005). Epilepsy and apoptosis pathways. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2005 Dec;25(12):1557-72.

Herdegen T, & Leah JD. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res Brain Res Rev**. 1998 Dec;28(3):370-490.

Hosford DA. (1995). Models of primary generalized epilepsy. **Curr Opin Neurol**. 1995 Apr;8(2):121-5.

Houser CR. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. **Brain Res**. 1990 Dec 10;535(2):195-204.

Hudson LP, Munoz DG, Miller L, McLachlan RS, Girvin JP, Blume WT (1993) Amygdaloid Sclerosis in Temporal Lobe Epilepsy. **Ann Neurol**, 33:622-631.

Herdegen T, Leah JD.(1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res Brain Res Rev.** 1998 Dec;28(3):370-490.

Herrera DG, Robertson HA.(1996). Activation of *c-fos* in the brain. **Prog Neurobiol.** 1996 Oct;50(2-3):83-107.

Hudson LP, Munoz DG, Miller L, McLachlan RS, Girvin JP, Blume WT (1993) Amygdaloid Sclerosis in Temporal Lobe Epilepsy. **Ann Neurol.** 33:622-631.

Jessberger S, Römer B, Babu H, Kempermann G. (2005). Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. **Exp Neurol.** 2005 Dec;196(2):342-51. Epub 2005 Oct 5.

Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD Jr, Li Y, Gage FH. (2007). Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. **J Neurosci.** 2007 Aug 29;27(35):9400-7.

Jokeit H, Ebner A, Arnold S, Schüller M, Antke C, Huang Y, Steinmetz H, Seitz RJ, Witte OW. (1999). Bilateral reductions of hippocampal volume, glucose metabolism, and wada hemispheric memory performance are related to the duration of mesial temporal lobe epilepsy. **J Neurol.** 1999 Oct;246(10):926-33.

Jones SP, Rahimi O, O'Boyle MP, Diaz DL, Claiborne BJ. (2003). Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. **Hippocampus.** 13(3):413-27.

Kälviäinen R, Salmenperä T, Partanen K, Vainio P, Riekkinen P, Pitkänen A. (1998). Recurrent seizures may cause hippocampal damage in temporal lobe epilepsy. **Neurology.** 1998 May;50(5):1377-82.

Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ. (2003) Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor

neuropathology. **J Child Neurol.**; 18(12):851-66; discussion 867. Review. Erratum in: *J Child Neurol.* 2004 Jul;19(7):531.

Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. **J Neurosci Methods.** 30;115(1):97-105.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature.** 1997 Apr 3;386(6624):493-5.

Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. (1998). Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Curr Biol.** 1998 Jul 30-Aug 13;8(16):939-42.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends Neurosci.** 2004 Aug;27(8):447-52.

Kerr J.F, Winterford C.M, Harmon B.V (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer.** 73(8), 2013-26.

Kerr J.F (1972) Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. **J pathol**, 107(3), 217-9.

Kosaka T.(1983). Neuronal gap junctions in the polymorph layer of the rat dentate gyrus. **Brain Res.** 1983 Oct 31;277(2):347-51.

Kosaka T, Hama K, Wu JY.(1984). GABAergic synaptic boutons in the granule cell layer of rat dentate gyrus. **Brain Res.** 1984 Feb 20;293(2):353-9.

Kubova H, Druga R, Lukasiuk k, Suchomelova L, Haugvicovba R, Jirmanova I, Pitkanen A (2001) Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of thalamus in immature rats. **J Neurosci**, 21(10), 3593-9.

Kubova H, Druga R, Suchomelova L, Haugvicovba R, Jirmanova I, Pitkanen A (2002) Dynamic changes of status epilepticus-induced neuronal degeneration in the

mediodorsal nucleus of the thalamus during postnatal development of the rat. **Epilepsia**, 43 Suppl 5:54-60.

Lallement G, Carpentier P, Pernot-Marino I, Baubichon D, Collet A, Blanchet G. (1991). Involvement of the different rat hippocampal glutamatergic receptors in development of seizures induced by soman: an autoradiographic study. **Neurotoxicology**. 1991 Winter;12(4):655-64.

LeDoux J. (1998). Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biol Psychiatry**. 1998 Dec 15;44(12):1229-38.

Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA (2002) New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Res**. 50(1-2):93-103.

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1990) Spontaneous recurrent seizures in rats: experimental model of partial epilepsy. **Neurosci Biobehav Rev**, 14(4):511-517.

Lemos T, Cavalheiro EA (1995) Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Exp Brain Res**, 102(3):423-428.

Leuner B, & Gould E. (2010). Structural plasticity and hippocampal function. **Annu Rev Psychol**. 2010;61:111-40, C1-3.

Lewis PR, Shute CC (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. **Brain**, 90(3):521-40.

Liu Z, Nagao T, Desjardins GC, Gloor P, Avoli M. (1994). Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. **Epilepsy Res**. 1994 Mar;17(3):237-47.

Longo BM, Mello LE (1998) Supragranular mossy sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. **Epilepsy Res**, 32(1-2):172-82.

Longo BM, Mello LE (1997) Blockade of pilocarpina or Kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. **Neurosci Lett**, 226(3), 163-6.

Lorente de Nó, R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. Continuation of the study of the ammonic system. **J Psychol. Neurol**, 46, 113-177.

Lothman EW, Bertram III EH, Stringer JL (1991). Functional anatomy of hippocampal seizures. **Prog Neurobiol**, 37:1-82. 1991.

Lothman EW, Bertram III EH (1993) Epileptogenic Effects of Status Epilepticus. **Epilepsia** 34 (Suppl. 1): S59-S70.

Lowenstein DH (1999) Status epilepticus an overview of the clinical problem. **Epilepsia** 40 (Suppl 1):S3-S8; discussion S21-S22.

Maccaferri G, McBain CJ. (1995). Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. **Neuron**. 1995 Jul;15(1):137-45.

Maglóczy Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halász P, Vajda J, Czirják S, Freund TF. (2000). Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. **Neuroscience**. 2000;96(1):7-25.

Majno G, & Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol**. 1995 Jan;146(1):3-15.

Marescaux C, Vergnes M, Kiesmann M, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM. (1987). Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. **Exp Neurol**. 1987 Jul;97(1):160-8.

Mattson MP. (2007). Calcium and neurodegeneration. **Aging Cell**. 2007 Jun;6(3):337-50. Epub 2007 Feb 28.

McCloskey DP, Croll SD, Scharfman HE. (2005). Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci*. 2005 Sep 28;25(39):8889-97.

McGeer EG, McGeer PL, Singh K (1978). Kainate-induced degeneration of neostriatal neurons: dependency upon corticostriatal tract. *Brain Res*. 1978 Jan 13;139(2):381-3.

McGeer PL, McGeer EG. (1978). Intracerebral injections of kainic acid and tetanus toxin: possible models for the signs of chorea and dystonia. *Adv Neurol*. 1978;21:331-8.

McDonald AJ. (2003). Is there an amygdale and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Apr;985:1-21.

McNamara JO (1999) Emerging insights into genesis of epilepsy. *Nature*, 399: A15-A22.

McNamara JO (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci*,14(6):3413-3425.

Meldrum B.S, Horton, R.W (1973). Physiology of status epilepticus in primates. *Arch. Neurol*, 28: 1-9.

Meldrum B.S (1984). Amino acid transmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia*, 22: 140-149.

Meldrum B.S (1991). Excitatory amino acid transmitters in epilepsy. *Epilepsy* 32(suppl 2):S1-S3.

Mello LE, Cavalheiro EA. Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM (1993). Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpina model chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 34:985-995.

Ming GL, Song H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annu Rev Neurosci.** 2005;28:223-50.

Ming GL, Song H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron.** 2011 May 26;70(4):687-702.

Mohapel P, Dufresne C, Kelly ME, McIntyre DC.(1996). Differential sensitivity of various temporal lobe structures in the rat to kindling and status epilepticus induction. **Epilepsy Res.** 1996 Apr;23(3):179-87.

Moraes MFD, Galvis-Alonso, Garcia-Cairasco N (2000) Audiogenic Kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Res,** 39:251-259.

Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T.(1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. **Science.** 1987 Jul 10;237(4811):192-7.

Motte J, Fernandes MJ, Baram TZ, Nehlig A.(1998). Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in lithium–pilocarpine seizures in adult rats. **Brain Res.** 1998 May 18;793(1-2):61-72.

Murphy BL, Pun RY, Yin H, Faulkner CR, Loepke AW, Danzer SC. (2011). Heterogeneous integration of adult-generated granule cells into the epileptic brain. **J Neurosci.** 2011 Jan 5;31(1):105-17.

Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell DR, McEwen BS. (2003). NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. **Neurobiol Aging.** 2003 Mar-Apr;24(2):273-84.

Nadler J.V (1978) Intraventricular Kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. **Nature,** 271(5646), 676-7.

Naritoku DK, Mecozzi LB, Aiello MT, Faingold CL. (1992). Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. **Exp Neurol**. 1992 Mar;115(3):317-24.

Neves G, Cooke SF, Bliss TV.(2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nat Rev Neurosci**. 2008 Jan;9(1):65-75.

Niquet J, Liu H, Wasterlain CG (2005) Programmed neuronal necrosis and status epilepticus. **Epilepsia**, 2005;46 Suppl 5:43-8.

Nottebohm F. (2004). The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. **Ann N Y Acad Sci**. 2004 Jun;1016:628-58.

Olney JW, Sharpe LG, De guabareff T (1975). Excitotoxic amino acid. **Neurosc Abs**, 1:371-378.

Olney JW, Rhee V, Ho OI (1974). Kainic acid: A powerful neurotoxic analogue of glutamate. **Brain Res**, 77:507-512.

Olney J.W (1994). Excitatory transmitter neurotoxicity. **Neurobiol Aging**, 15(2),259-60.

Overstreet Wadiche L, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. (2005). GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. **J Neurophysiol**. 2005 Dec;94(6):4528-32.

Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. (2006). Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. **J Neurosci**. 2006 Apr 12;26(15):4095-103.

Overstreet-Wadiche LS, Bensen AL, Westbrook GL. (2006). Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. **J Neurosci**. 2006 Feb 22;26(8):2326-34.

Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL. (2006). Functional maturation of adult-generated granule cells. **Hippocampus**. 2006;16(3):208-15.

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **J Comp Neurol**. 2000 Oct 2;425(4):479-94.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **J Neurosci**. 15;17(10):3727-38.

Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH. (1999). Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. **J Neurosci**. 1999 Jun 1;19(11):4508-19.

Parent JM, Elliott RC, Pleasure SJ, Barbaro NM, Lowenstein DH. (2006). Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**. 2006 Jan;59(1):81-91.

PatonJA, & Nottebohm FN. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. **Science**. 1984 Sep 7;225(4666):1046-8.

Paxinos G, Watson C (1996). The rat brain stereotaxic coordinates. Compact third edition. Academic press.

Pereno GL, Balaszczuk V, Beltramino CA. (2011). Kainic acid-induced early genes activation and neuronal death in the medial extended amygdala of rats. **Exp Toxicol Pathol**. 2011 Mar;63(3):291-9. Epub 2010 Feb 24.

Pierce JP, Melton J, Punsoni M, McCloskey DP, Scharfman HE. (2005). Mossy fibers are the primary source of afferent input to ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. **Exp Neurol**. 2005 Dec;196(2):316-31.

Pinel JP, Rovner LI (1978). Experimental epileptogenesis: Kindling-induced epilepsy in rats. **Exp. Neurol**, 58(2):335-346.

Pinel JP, Rovner LI (1978) Experimental epileptogenesis: Kindling-induced epilepsy in rats. **Exp. Neurol**, 58(2):335-346.

Pitkanen A, Kharatishvili I, Narkilahti S, Lukasiuk K, Nissinen J (2005) Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat. **Epilepsy Res**; 63(1):27-42.

Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends Neurosci**. 1997 Nov;20(11):517-23.

Pitkänen A, Tuunanen J, Kälviäinen R, Partanen K, Salmenperä T. (1998). Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**. 1998 Sep;32(1-2):233-53.

Rao MS, Shetty AK. (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. **Eur J Neurosci**.;19(2):234-46.

Racine RJ (1972) Modification of seizures activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 32:281-93.

Ranganath RM, & Nagashree NR. (2001). Role of programmed cell death in development. **Int Rev Cytol**. 2001;202:159-242

Reynolds BA, Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**. 1992 Mar 27;255(5052):1707-10.

Ribak C.E, Nitsch R, Seress L (1990) Proportion of parvalbumin-positive basket cells in the GABAergic innervation of pyramidal and granule cells of the rat hippocampal formation. **J Comp Neurol**, 300(4), 449-61.

Ribak CE (1992). Local circuitry of GABAergic basket cells in the dentate gyrus. **Epilepsy Res Suppl**. 1992;7:29-47.

Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM, Nadler JV. (2000). Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. **J Comp Neurol**. 2000 Dec 11;428(2):240-53.

Romcy-Pereira RN, Garcia-Cairasco N. (2003) Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or fluoro-jade staining. **Neuroscience** 119: 533-546.

Ross KC, Coleman JR.(2000). Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. **Neurosci Biobehav Rev**. 2000 Aug;24(6):639-53. Review.

Sagar SM, Sharp FR, Curran T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**. 1988 Jun 3;240(4857):1328-31.

Salmenperä T, Kälviäinen R, Partanen K, Pitkänen A. (2001). Hippocampal and amygdaloid damage in partial epilepsy: a cross-sectional MRI study of 241 patients. **Epilepsy Res**. 2001 Jul;46(1):69-82.

Sanabria ERG e Cavalheiro EA (2000) IV Epileptogênese: Contribuição dos Modelos Experimentais. *Epilepsia São Paulo*: Lemos Editora, 2000: 29-57;

Savander V, LeDoux JE, Pitkänen A (1997). Interamygdaloid projections of the basal and accessory basal nuclei of the rat amygdaloid complex. **Neuroscience**. 1997 Feb;76(3):725-35.

Schiavon AP, Milani H, Romanini CV, Foresti ML, Castro OW, Garcia-Cairasco N, de Oliveira RM. (2010). Imipramine enhances cell proliferation and decreases neurodegeneration in the hippocampus after transient global cerebral ischemia in rats. **Neurosci Lett.** 2010 Feb 5;470(1):43-8. Epub 2009 Dec 28.

Schmued LC, Albertson, Slikker W Jr (1997) Fluoro-Jade: a novel luorochrome for sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Res**, 751(1): 37-46.

Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. (2000). Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. **J Neurosci.** 2000 Aug 15;20(16):6144-58.

Scharfman HE, Sollas AL, Smith KL, Jackson MB, Goodman JH. (2002). Structural and functional asymmetry in the normal and epileptic rat dentate gyrus. **J Comp Neurol.** 2002 Dec 23;454(4):424-39.

Scharfman HE, Sollas AE, Berger RE, Goodman JH, Pierce JP. (2003). Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience.** 2003;121(4):1017-29.

Schmued LC, Albertson, Slikker W Jr (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration.. **Brain Res**, 751(1): 37-46.

Schwabe K, Ebert U, Löscher W (2000) Bilateral Lesions of the Central but not Anterior or Posterior Parts of the Piriform Cortex Retard amygdala Kindling in Rats. **Neurosci** 101(3):513-521.

Scholzen T, Gerdes J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol.**; 182(3):311-22. Review.

Scoville WB. (1954).The limbic lobe in man. **J Neurosurg.** 1954 Jan;11(1):64-6.

Seress L, Pokorny J (1981). Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. **J Anat.** 1981 Sep;133(Pt 2):181-95.

Seress, L. & Mrzljak, L. (1987). Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampus formations. **Brain Res.**, 405(1): 169-174.

Seress L.(1992). Morphological variability and developmental aspects of monkey and human granule cells: differences between the rodent and primate dentate gyrus. **Epilepsy Res Suppl.** 1992;7:3-28.

Shapiro LA, Ribak CE. (2006). Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. **Epilepsy Res.** 2006 Apr;69(1):53-66. Epub 2006 Feb 15.

Shapiro LA, Ng K, Zhou QY, Ribak CE. (2008). Subventricular zone-derived, newly generated neurons populate several olfactory and limbic forebrain regions. **Epilepsy Behav.** 2009 Jan;14 Suppl 1:74-80. Epub 2008 Oct 26.

Shorvon S.D (1990) Epidemiologia, classificação, história natural e genética da epilepsia. In: Costa JC (ed). **Epilepsy. A Lancet Review.** London, the Lancet, 1990. p 3-13.

Shorvon S.D (2002) Does convulsive status epilepticus (SE) result in cerebral damage or affect the course of epilepsy, the epidemiological and clinical evidence? Progress in **Brain Res.**, Vol. 135.

Sloviter R.S (1987) Decreased hippocampal inhibition and selective loss of interneurons in experimental epilepsy. **Science**, 235(4784), 73-6.

Sloviter R.S (1989) Calcium-binding protein (Calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. **J Comp Neurol**, 308: 381-396.

Sloviter R.S (1991) Feed forward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. **Hippocampus** 1, 31-40.

Sloviter RS (1999) Status epilepticus –induced Neuronal Injury and Network Reorganization. **Epilepsia**, 40 (Suppl. 1) S34-S39.

Spanedda F, Cendes F, Gotman J. (1997). Relations between EEG seizure morphology, interhemispheric spread, and mesial temporal atrophy in bitemporal epilepsy. **Epilepsia**. 1997 Dec;38(12):1300-14.

Spencer SS, So Nk, Engel Jr J, Williamson PD, Levesque MF, Spence DD (1993) .Depth electrodes. In Engel Jr J (ed). Surgical treatment of the epilepsies 2^a edit, New York, Raven Press, pg 359-376.

Spigelman I, Yan XX, Obenaus A, Lee EY, Wasterlain CG, Ribak CE. (1998). Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**. 1998 Sep;86(1):109-20.

Suh H, Deng W, Gage FH. (2009). Signaling in adult neurogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2009;25:253-75.

Sutula T, Cascino C, Cavazos J, Parada I, Scott G (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in epileptic human temporal lobe. **Ann Neurol**, 26(3), 321-30.

Tanapat P, Hastings NB, Reeves AS, Gould E (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. **J. Neurosci**. 19: 5792-801.

Taupin P. (2007). Adult neural stem cells: The promise of the future. **Neuropsychiatr Dis Treat**. 2007 Dec;3(6):753-60.

Tilelli CQ (2003) Estudo das alterações comportamentais, eletrofisiológicas e morfológicas num modelo animal para estudo das epilepsias. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de fisiologia – Universidade de São Paulo.

Tilelli CQ, Del Vecchio F, Fernandes A, Garcia-Cairasco N. (2005) Different types of status epilepticus lead to different levels of brain damage in rats. *Epilepsy Behav.*; 7(3):401-10. Epub 2005 Sep 2.

Treiman DM (1998). Clinical trials for status epilepticus. **Adv Neurol.** 1998;76:173-8.

Turski WA, Czuczwart SJ, Kleinrok Z, Tursk L (1983) Cholinomimetic produce seizures and brain damage in rats. **Experientia**, 30:1408-1411.

Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Tursk L (1984) Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, 9(3):315-335.

Turski L, Cavalheiro EA (1986) Seizures produced by pilocarpine: Neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in rat forebrain. **Brain Res**, 398:37-48.

Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. (1989). Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**. 1989;3(2):154-71. Review.

VanLandingham KE, Lothman EW. (1991).Self-sustaining limbic status epilepticus. II. Role of hippocampal commissures in metabolic responses. *Neurology*. 1991 Dec;41(12):1950-7.

Van Cruchten S, & Van Den Broeck W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat Histol Embryol**. 2002 Aug;31(4):214-23.

van Groen T, Miettinen P, Kadish I.(2003). The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**. 2003;13(1):133-49.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**. 1999 Mar;2(3):266-70.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**. 2002 Feb 28;415(6875):1030-4.

Wang L, Liu YH, Huang YG, Chen LW. (2008). Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. **Brain Res**. 2008 Nov 19;1241:157-67.

West MJ, Andersen AH.(1980). An allometric study of the area dentata in the rat and mouse. **Brain Res**. 1980 Dec;2(3):317-48.

Wieser HG. (2000). Semiology of neocortical temporal lobe epilepsy. **Adv Neurol**. 2000;84:201-14.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**. 1980;68:251-306.

Witter, MP & Amaral, D.G. (2004). Hippocampal formation. In: Paxinos G. (Ed.), *The Rat Nervous System* (3rd Ed.) Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 635-704.

White LE, Price JL (1993). The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. II. The effects of focal deactivation. **J Neurosci**. 1993 Nov;13(11):4810-30.

Yacubian EMT. *Epilepsia* (2000.) Da antiguidade ao Segundo milênio-saindo das sombras. Lemos editorial São Paulo, SP.

Yuste R, Majewska A, Holthoff K. (2000). From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. **Nat Neurosci**. 2000 Jul;3(7):653-9.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Jun 24;100(13):7925-30. Epub 2003 Jun 5.

Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **J Neurosci**. 2006 Jan 4;26(1):3-11.

Ziegler U, & Groscurth P. (2004). Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**. 2004 Jun;19:124-8.