

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS
E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

SUÉLEN MERLO

Estudo dos grânulos de lipofuscina e das sinapses do córtex temporal
durante o envelhecimento

RIBEIRÃO PRETO – SP

2011

SUÉLEN MERLO

Estudo dos grânulos de lipofucsina e das sinapses do córtex temporal
durante o envelhecimento

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Concentração: Neurologia

Subárea: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Moreira

RIBEIRÃO PRETO – SP

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

Suélen Merlo

Estudo dos grânulos de lipofuscina e das sinapses
do córtex temporal durante o envelhecimento

Dissertação apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do Comportamento da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre.

Área de Concentração: Neurologia

Subárea: Neurociências

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof. Dr. (orientador): Jorge Eduardo Moreira

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr.: João Pereira Leite

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr.: Luiz Eugênio Araújo de Moraes Mello

Instituição: EPM-UNIFESP Assinatura: _____

*A todos aqueles que de alguma maneira me fizeram
refletir pré-conceitos, fazendo com que eu
evolua pessoal e profissionalmente.*

AGRADECIMENTOS

São tantas pessoas a agradecer pela oportunidade, pelo conhecimento, pela força, pela cumplicidade e pelas críticas. Agradeço aos meus pais Edemar e Marení Merlo e ao meu irmão Oendel Merlo por me proporcionarem a oportunidade de estar aqui. Agradeço ao meu noivo José Inácio Lemos por seu carinho em todo trajeto. Agradeço ao meu orientador Jorge Eduardo Moreira pela confiança e contribuição na minha formação acadêmica e científica. Agradeço as amigas de laboratório Janaína Brusco, Erika Ikeda e Ana Beatriz Nakayama pelos auxílios e sugestões. Agradeço aos professores colaboradores Marcos Rossi e Carlos Gilberto Carlotti Júnior. Agradeço ao professor Luis Lamberti pela sua contribuição voluntária. Agradeço ao meu amigo irmão Rafael Sales de Albuquerque e aos amigos Reginaldo Ribeiro e Carlos José Salgado pelas risadas que me proporcionaram durante esses anos de convivência. Agradeço as pessoas que doaram parte de si para a pesquisa científica, aos quais devo respeito. Agradeço aos animais utilizados neste trabalho que deram suas vidas em troca do meu conhecimento. Agradeço a Universidade de São Paulo e aos órgãos financiadores CNPq, FAPESP e FAEPA. Agradeço a todos que realmente estudam e pesquisam, pois a partir do conhecimento descrito posso fazer o que amo.

“Não, Eu Não Me Arrependo de Nada

Não! Nada de nada...

Não! Eu não lamento nada...

Nem o bem que me fizeram

Nem o mal - isso tudo tanto faz!”

(Edith Piaf)

RESUMO

Alterações morfológicas e funcionais ocorrem durante o envelhecimento, período da vida com maior incidência de doenças neurodegenerativas. No presente trabalho acompanhou-se a evolução dos grânulos de lipofucsina durante o envelhecimento para investigar alterações sinápticas, assim como proteínas associadas com doenças neurodegenerativas (alfa-sinucleína) e com o sistema ubiquitina-proteossoma em indivíduos de diferentes idades. No córtex temporal humano e de ratos determinou-se, nos diferentes grupos etários, seguindo a área, o número e as características dos grânulos de lipofucsina, o número de sinapses excitatórias, inibitórias e elétricas, os locais de contatos pós-sinápticos, o número de vesículas sinápticas por terminal e a expressão das proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina. Amostras de córtex temporal humano de indivíduos com diferentes idades (20 - 28, 37 - 41 e 50 - 55 anos) foram coletadas de pacientes com epilepsia submetidos à lobectomia do lobo temporal. Amostras de ratos de 2, 6, 10 e 12 meses também foram coletadas. Foram utilizadas técnicas de microscopia de luz, eletrônica, confocal e *western blots*. Os dados obtidos de grânulos de lipofucsina são consistentes com outros estudos que observaram aumento dessa estrutura em mamíferos de maior idade. No entanto, os grânulos parecem crescer em volume, mas não em número, com aumento considerável da fração elétron lúcida (lipídica). Não houve diferença na expressão das proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina entre os grupos das idades estudadas. A densidade sináptica foi similar entre os grupos experimentais, assim como o local de contato pós-sináptico. O aumento de vesículas elétron densas em sinapses inibitórias deve estar associado à demanda de neurotransmissores catecolaminérgicos. Estes resultados não expressam totalmente o processo de envelhecimento, pois as faixas etárias de humanos e ratos correspondem a uma idade ainda jovem. A coleta de material humano mais idoso foi impossibilitada pela faixa etária dos doentes submetidos à lobectomia. Os ratos do biotério da FMRP, não sobrevivem mais do que 12 meses em no nosso ambiente, incluindo manutenção dos animais isolados em racks.

Palavras chave: córtex temporal humano e de ratos, grânulos de lipofucsina, sinapses, contatos sinápticos, vesículas sinápticas, alfa-sinucleína, ubiquitina, microscopia de luz, microscopia eletrônica, microscopia confocal, *western blots*.

ABSTRACT

Morphological and functional changes occur during the aging, period of life with increased incidence of neurodegenerative diseases. Following the evolution of the lipofuscin granules along three periods of life in humans and rats, the present work investigated synaptic changes, as well as proteins associated with neurodegenerative diseases (alpha-synuclein) and the ubiquitin-proteasome system in individuals of different ages. The objectives of the study were to analyze the temporal cortex of humans and rats: the number of excitatory, inhibitory, and electric synapses, the site of postsynaptic contacts, the number of synaptic vesicles per terminal, and the expression of the proteins alpha-synuclein and ubiquitin following the size and features of the lipofuscin granules. Samples of temporal cortex of human subjects with different ages (20-28, 37-41 and 50-55 years) were collected from patients with epilepsy who underwent temporal lobectomy. Samples from rats of 2, 6, 10 and 12 months were also collected. Light, confocal, and electron microscopy, and western blots techniques were used as procedures. The data obtained on lipofuscin granules were coincident with other studies that observed a higher area occupied by this structure in older mammals. However, the granules seem to grow in volume, but not in number, with considerable increase of the electron lucid fraction (lipidic). There was no difference in the alpha-synuclein and ubiquitin expressions between the experimental groups. The synaptic densities were similar between the groups, as well as the postsynaptic contacts. Increase of the electron dense vesicles in inhibitory synapses, appeared to be associated with the demand of catecholamines. These results do not express totally the aging process, because the range of age used in humans, and rats belong to a young age. The human samples from older ages was difficult because, in general, of the age of the patients submitted to lobotomy. The rats of the FMRP bioterium do not survived more that 12 months in our environment, even in controlled conditions.

Keywords: human and rat temporal cortex, lipofuscin granules, synapses, synaptic contacts, synaptic vesicles, alpha-synuclein, ubiquitin, light, confocal, and electron microscopy, western blots.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porções de duas células ganglionares e uma célula satélite. Observar áreas elétricas e elétricas densas dos grânulos de lipofucsina no citoplasma dos neurônios. Observar que as áreas elétricas dos grânulos de lipofucsina são muito menores que as elétricas densas. Modificado de Samorajski e colaboradores (1965)..... 21
- Figura 2.** Porções elétricas e elétricas densas dos grânulos de lipofucsina e lisossomos no citoplasma da célula ganglionar. Modificado de Samorajski e colaboradores (1965)..... 22
- Figura 3.** Sinapses excitatórias e uma inibitória na camada molecular do cerebelo de gatos. Observar vesículas redondas e densidade pós-sináptica assimétrica nas sinapses excitatórias e vesículas pleomórficas e densidade pós-sináptica simétrica nas sinapses inibitórias. O local de contato pós-sináptico representado é um dendrito. Modificado de Uchizono (1965)..... 35
- Figura 4.** Coloração de PAS, AFIP e *Sudan Black*. As setas indicam os grânulos de lipofucsina nos corpos neuronais..... 49
- Figura 5.** **A)** Lipofucsina no interior do citoplasma do neurônio piramidal. **B)** Padrão de marcação para contagem pelo programa Leica QWin Software V. 3.2.0. Coloração de *Sudan Black*..... 50
- Figura 6.** Fotomicrografia de córtex temporal humano, corado com azul de toluidina. Em destaque, observa-se neurônio piramidal com dendrito apical, o qual se dirige a pia-máter..... 52
- Figura 7.** **A.** Porcentagem de grânulos de lipofucsina em relação à área do corpo neuronal. **B.** Área do corpo neuronal de amostras de indivíduos de diferentes idades..... 56
- Figura 8.** Amostras de córtex temporal humano dos diferentes grupos experimentais: **A.** Grupo 1 (20 a 28 anos). **B.** Grupo 2 (37 a 41 anos) e **C.** Grupo 3 (50 a 55 anos). Observa-se que os grânulos de lipofucsina ocupam maior área no corpo neuronal de indivíduos de maior idade. A área analisada do corpo neuronal foi similar entre grupos. Coloração: *Sudan Black*..... 58
- Figura 9.** **A.** Porcentagem de grânulos de lipofucsina em relação à área do corpo neuronal. **B.** Área do corpo neuronal em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 59
- Figura 10.** Observar membrana única das porções elétrica e elétrica densa de um grânulo de lipofucsina. Amostra de córtex temporal humano..... 60
- Figura 11.** Grânulos de lipofucsina no interior de neurônio com aspecto apoptótico. Amostra de córtex temporal humano..... 61
- Figura 12.** Porcentagem de grânulos de lipofucsina em relação à área do citoplasma neuronal **(A)** e em relação à área do corpo neuronal **(B)** em indivíduos dos diferentes grupos experimentais..... 62

- Figura 13.** **A.** Número de grânulos de lipofuscina por neurônio. **B.** Número de porções lipídicas por neurônio em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 63
- Figura 14.** Área neuronal analisada em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 64
- Figura 15.** Porcentagem da área da porção elétron densa (protéica) e porcentagem da área da porção elétron lúcida (lipídica) dos grânulos de lipofuscina nos diferentes grupos experimentais..... 65
- Figura 16.** Grânulos de lipofuscina. Porções elétron lúcida e elétron densa de um grânulo de lipofuscina. Córtex cerebral humano do grupo 1 (20 a 28 anos)..... 66
- Figura 17.** Grânulos de lipofuscina. Porções elétron lúcida e elétron densa de um grânulo de lipofuscina. Amostra de córtex cerebral humano do grupo 3 (50 a 55 anos). Pode-se observar que a porção elétron lúcida dos grânulos de lipofuscina nesta amostra é maior que na amostra da figura 15. Por outro lado, não há diferenças em relação ao número de grânulos entre as duas amostras..... 67
- Figura 18.** Porcentagem de grânulos de lipofuscina em relação à área do citoplasma (**A**) e em relação à área do corpo neuronal (**B**) em ratos de 2, 6, 10 e 12 meses..... 69
- Figura 19.** Número de grânulos de lipofuscina por neurônio (**A**) e número de porções lipídicas por neurônio (**B**) em ratos de 2, 6, 10 e 12 meses..... 69
- Figura 20.** Área neuronal (μm^2) em amostras de ratos de 2, 6, 10 e 12 meses..... 70
- Figura 21.** Porcentagem da área da porção elétron densa e da porção elétron lúcida do grânulo de lipofuscina em ratos de diferentes idades..... 70
- Figura 22.** Reconstrução tridimensional de um grânulo de lipofuscina de córtex temporal humano do grupo 3. Observar as porções elétron densa e elétron lúcidas..... 71
- Figura 23.** Grânulos autofluorescentes de lipofuscina vistos através de microscopia confocal. Núcleo celular marcado com DAPI. Amostra de córtex cerebral humano do grupo 2 (37 a 41 anos)..... 72
- Figura 24.** Intensidade da expressão de alfa-sinucleína nos diversos grupos experimentais..... 73
- Figura 25.** *Western blots* de alfa-sinucleína e beta actina nos grupos experimentais 1, 2 e 3..... 73
- Figura 26.** Intensidade da expressão de ubiquitina nos diversos grupos experimentais..... 74
- Figura 27.** *Western blots* de ubiquitina e beta actina nos grupos experimentais 1, 2 e 3..... 74
- Figura 28.** Número de sinapses (**A**) e área do terminal pré-sináptico (**B**) em relação à área total analisada em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 76
- Figura 29.** Porcentagem de sinapses excitatórias (**A**) e inibitórias (**B**) em indivíduos dos diversos grupos experimentais..... 76
- Figura 30.** Porcentagem de sinapses elétricas em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 77

- Figura 31.** Porcentagem de sinapses excitatórias sobre dendritos (**A**) e espinhos dendríticos (**B**) em indivíduos dos diversos grupos experimentais..... 78
- Figura 32.** Porcentagem de sinapses excitatórias sobre axônios (**A**) e somas (**B**) em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 78
- Figura 33.** Porcentagem de sinapses inibitórias sobre dendritos (**A**) e espinhos dendríticos (**B**) dos diversos grupos experimentais..... 79
- Figura 34.** Porcentagem de sinapses inibitórias sobre axônios (**A**) e somas (**B**) em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 79
- Figura 35.** Porcentagem de vesículas elétron lúcidas redondas em sinapses excitatórias (**A**) e inibitórias (**B**) em indivíduos dos diversos grupos experimentais..... 80
- Figura 36.** Número de vesículas elétron lúcidas (**A**) e elétron densas (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico em sinapses excitatórias em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 82
- Figura 37.** Número de vesículas elétron lúcidas redondas (**A**) e pleomórficas (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico em sinapses excitatórias dos diversos grupos experimentais..... 82
- Figura 38.** Número de vesículas elétron densas pequenas (**A**) e grandes (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico em sinapses excitatórias em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 83
- Figura 39.** Número de vesículas ancoradas e fusionadas (**A**) e vesículas revestidas de clatrina (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico em sinapses excitatórias em indivíduos dos diversos grupos experimentais..... 83
- Figura 40.** Número de vesículas elétron lúcidas (**A**) e elétron densas (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico em sinapses inibitórias de indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 85
- Figura 41.** Número de vesículas elétron lúcidas redondas (**A**) e pleomórficas (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico em sinapses inibitórias de indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 85
- Figura 42.** Número de vesículas elétron densas pequenas (**A**) e grandes (**B**) em relação á área do terminal pré-sináptico em sinapses inibitórias de indivíduos dos grupos 1, 2 e 3..... 86
- Figura 43.** Porcentagem de vesículas ancoradas e fusionadas (**A**) e vesículas revestidas de clatrina (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico em sinapses inibitórias dos diversos grupos experimentais..... 86
- Figura 44. A.** Sinapses excitatórias: vesículas redondas e densidade pós-sináptica assimétrica. **B.** Sinapse inibitória: vesículas pleomórficas e densidade pós-sináptica simétrica. As sinapses apontadas fazem contato sobre dendritos..... 87

- Figuras 45.** Sinapses excitatórias: vesículas redondas e densidade pós-sináptica assimétrica sobre espinho dendrítico. Observar microtúbulos no dendrito, antes da formação do espinho. Sinapse elétrica..... 88
- Figuras 46.** Sinapses excitatórias: vesículas redondas e densidade pós-sináptica assimétrica sobre espinho dendrítico. Observar microtúbulos no dendrito, antes da formação do espinho..... 88
- Figura 47.** Em destaque, podem-se visualizar membranas internas na periferia do que Samorajski e colaboradores (1965) descrevem como porção elétron lúcida do grânulo de lipofucsina, e que por isso parece ser uma mitocôndria. Na fotomicrografia, modificada de Boellaard e Schlote (1986) observa-se mais claramente a natureza lipídica e a membrana única da porção elétron lúcida dos grânulos de lipofucsina 96

LISTA DE ABREVIATURAS

GLs: grânulos de lipofucsina

MTPT: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MPP+: 1-methyl-4-phenylpyridinium

EUA: Estados Unidos da América

PAS: coloração ácido periódico de Schiff

AFIP: método do Instituto de Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 Envelhecimento cerebral	16
1.2 Envelhecimento e lipofucsina	19
1.3 Envelhecimento e proteínas ubiquitina e alfa-sinucleína	28
1.4 Envelhecimento e transmissão sináptica	33
2. Objetivos	42
3. Hipótese	43
4. Material e Métodos	44
4.1 Amostras	44
4.2 Córtex temporal humano	44
4.3 Córtex temporal animal	46
4.4 Procedimentos morfológicos e de biologia molecular	47
4.4.1 Microscopia de luz	47
4.4.2 Microscopia eletrônica	51
4.4.2.1 Reconstrução tridimensional	53
4.4.3 Microscopia confocal	53
4.4.4 Western blots	54
4.5 Análise gráfica e estatística	55
5. Resultados	56
5.1 Análise dos grânulos de lipofucsina por microscopia de luz	56
5.1.1 Córtex temporal humano	56
5.1.2 Córtex temporal de ratos	58
5.2 Análise dos grânulos de lipofucsina por microscopia eletrônica	59
5.2.1 Córtex temporal humano	62
5.2.2. Córtex temporal de ratos	68

5.2.3 Reconstrução tridimensional dos grânulos de lipofucsina por microscopia eletrônica	71
5.3 Análise dos grânulos de lipofucsina por microscopia confocal	72
5.4 Expressão de proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina	73
5.5 Análise das sinapses	75
5.5.1 Córtex temporal humano.....	75
5.5.2 Córtex temporal de ratos	89
6. Discussão	91
7. Conclusões.....	105
8. Bibliografia	106
9. Anexos	112
Artigo científico	116

1. Introdução

1.1 Envelhecimento cerebral

Estudos apontam que durante o envelhecimento ocorrem declínios significativos quanto à velocidade de processamento de informação, memória de trabalho, memória de curta duração e memória verbal, enquanto as memórias de longa duração e implícita parecem estar mais preservadas. Imagens de ressonância magnética funcional e estudos de tomografia de emissão de pósitrons sugerem que as mudanças relacionadas com o envelhecimento podem estar associadas a modificações na ativação funcional do córtex pré-frontal e hipocampo. No entanto, a perda patológica da memória, que compromete o desenvolvimento de atividades rotineiras, assim como o declínio cognitivo acentuado, estariam relacionados a alterações nos lobos temporais mediais, principalmente no córtex entorrinal (Yankner *et al.*, 2008).

Durante muitos anos estudos apontaram perda neuronal como fator principal do declínio das funções cognitivas com o envelhecimento. No entanto, trabalhos recentes apontam que diversas regiões encefálicas parecem não ter perda neuronal significativa. Em contrapartida, alguns trabalhos descrevem que a ramificação dendrítica pode inclusive aumentar em algumas regiões hipocampais com a idade. Outros estudos não observaram diferenças na densidade de espinhos dendríticos no hipocampo de ratos e humanos idosos (Burke e Barnes, 2006).

Alterações plásticas neuronais parecem estar mais fortemente associadas aos danos cognitivos durante o envelhecimento. Trabalhos apontam que o envelhecimento interfere com a neurogênese, reduzindo as taxas de proliferação, sobrevivência e diferenciação das células no giro denteado do hipocampo (Kempermann *et al.*, 1998; Montaron *et al.*, 2006). Estudos também apontam redução no número de sinapses em regiões do neocórtex e hipocampo (Geinisman *et al.*, 1977; Uemura, 1980; Adams e Jones, 1982). Ratos idosos com déficits na

memória espacial apresentam perda de sinapses axo-espinhais perfurantes quando comparados a ratos adultos jovens e ratos idosos com boa memória (valores similares aos adultos jovens no teste do labirinto radial) (Geinisman *et al.*, 1986).

A expressão de genes, analisada por *microarray*, também sofre modificações com o envelhecimento. Genes envolvidos com funções sinápticas como as subunidades dos receptores de glutamato, proteínas de vesículas sinápticas ou proteínas que medeiam transporte de vesículas sofrem regulação negativa, assim como genes relacionados à função mitocondrial. Ao contrário, genes envolvidos na ação antioxidante, reparo ao DNA e funções imunes sofrem regulação positiva com a idade (Yankner *et al.*, 2008). Também alterações na condutância de íons cálcio, essenciais na transmissão sináptica, ocorrem durante o envelhecimento (Burke e Barnes, 2006).

Morfologicamente, os grânulos de lipofuscina, visualizados no citoplasma de neurônios e outros tipos celulares, são considerados “marcadores” da idade cronológica das células (Seehafer e Pearce, 2006). Existem ainda muitas questões em relação ao seu acúmulo ser homeostático ou se poderia influenciar a morte neuronal ou doenças neurodegenerativas (Jung *et al.*, 2007; Kurz, 2008; Tripathi *et al.*, 2009).

No presente trabalho, analisamos as sinapses e a expressão das proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina, utilizando os grânulos de lipofuscina como marcadores de envelhecimento no córtex temporal, mais precisamente no giro temporal médio do lobo temporal de humanos durante o envelhecimento. Essas proteínas foram escolhidas uma vez que a ubiquitina está relacionada à degradação de diversas proteínas intracelulares, enquanto a alfa-sinucleína possui papel na transmissão sináptica (Conaway, 2002; Cookson, 2009).

O córtex cerebral, fina camada de corpos celulares de 2 a 4 cm de espessura, é uma área de integração e processamento de informações muito desenvolvido em mamíferos, principalmente humanos. Durante a evolução, o córtex cerebral cresceu muito em volume,

devido ao desenvolvimento de circunvoluções. O córtex cerebral apresenta seis estratos: camada I (molecular), camada II (granular externa), camada III (piramidal externa), camada IV (granular interna), camada V (piramidal interna) e camada VI (fusiforme). Na camada I visualizam-se poucos somas neuronais, na II e IV neurônios granulares, na III neurônios piramidais (caracterizados pela presença de um dendrito apical proeminente) e na V e VI células fusiformes, neurônios granulares e piramidais (Ong e Garey, 1991).

Ao se analisar panoramicamente o córtex cerebral com microscopia eletrônica observa-se um intenso neurópilo entre os numerosos corpos neuronais e células gliais. O neurópilo consiste de dendritos, espinhos dendríticos, axônios mielinizados, axônios não mielinizados, terminais axonais formando sinapses e processos gliais. O córtex humano possui reduzido número de sinapses axo-somáticas. Grânulos de lipofucsina intracitoplasmáticos são frequentemente visualizados, principalmente em corpos de neurônios piramidais (Ong e Garey, 1991).

Funções relacionadas à linguagem estão localizadas principalmente no córtex frontal e temporo-parietal. Além disso, parece haver uma lateralização dessas funções no hemisfério dominante. Estudos observaram que 67% dos neurônios registrados no lobo temporal anterior dominante estão relacionadas ao nomeamento de objetos, leitura, e memória verbal. Além disso, os neurônios do giro temporal superior e médio parecem estar relacionados à percepção e produção da fala (Ojemann, 1991). No nomeamento de objetos por via auditiva ou visual os giros temporal superior e médio são equivalentemente ativados. No entanto, o córtex cerebral é altamente complexo, sendo que ocorre grande variação na organização encefálica entre os indivíduos, além disso, devido à intensa associação entre as áreas, funções de uma área lesionada podem, em parte, ser recuperadas em outra (Hamberger *et al.*, 2007). O declínio das funções cognitivas durante o envelhecimento está associado a um conjunto de fatores, alguns foram descritos acima e serão discutidos em maior detalhe.

1.2 Envelhecimento e lipofucsina

Os grânulos de lipofucsina, conhecidos como pigmentos da idade, são acúmulos lipoprotéicos que ocorrem durante a senescência. A lipofucsina é formada por 30 a 58% de proteínas e 19 a 51% de lipídeos, além de carboidratos e metais (predominantemente ferro) (Jung *et al.*, 2007; Seehafer e Pearce, 2006). Os grânulos de lipofucsina são encontrados frequentemente em células de vida longa, como os neurônios; no entanto também são visualizados em células gliais, fagocitárias, endoteliais, hepáticas e cardíacas, entre outras (El-Ghazzawi e Malaty, 1975; Porta, 2002). Esses grânulos foram estudados em diferentes espécies, principalmente em mamíferos, como camundongos, ratos, cobaias, cães, porcos, macacos e humanos (Brody, 1960; Nandy e Bourne, 1966; Brizzee *et al.*, 1969; Nanda e Getty, 1973; El-Ghazzawi e Malaty, 1975; Benavides *et al.*, 2002; Boellaard *et al.*, 2004).

O termo ceróide, “*lipofuscin-like*”, é utilizado para o acúmulo de lipopigmentos em condições patológicas resultantes de doenças de armazenamento lisossomal. O ceróide apresenta características muito semelhantes aos grânulos de lipofucsina como a autofluorescência, com excitação entre 360 e 539 nm e positividade para carboidratos e lipídios, nas colorações PAS e *Sudan Black* respectivamente (Seehafer e Pearce, 2006; Double, 2008).

Devido à complexa inter-relação entre os constituintes celulares e ambiente extracelular, vários estudos vêm sendo conduzidos a fim de entender a origem intracelular, composição química e significância funcional dos grânulos de lipofucsina (Samorajski *et al.*, 1965; Hirsch, 1970; Ivy *et al.*, 1984; Thal e Schlote, 1994). Ao longo de anos, diversas organelas celulares como mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e lisossomos, foram estudadas em neurônios e outros tipos celulares a fim de identificar a origem dos grânulos de lipofucsina. Os estudos foram baseados na proximidade espacial

dessas organelas com os grânulos de lipofucsina e na avaliação histoquímica de algumas enzimas (Toth, 1968; Colcolough *et al.*, 1972).

Após o descobrimento dos lisossomos por de Duve, na década de 50, tornou-se mais clara a origem lisossomal dos grânulos de lipofucsina. Com microscopia eletrônica, os lisossomos são observados como um grupo de vacúolos elétrons densos de diferentes tamanhos, que contêm material para degradação oriundos de autofagia ou heterofagia. Enzimas lisossomais são produzidas no retículo endoplasmático, maturadas nas cisternas *cis* do aparelho de Golgi e transportadas para as cisternas *trans* do mesmo. Vesículas, denominadas lisossomos primários, que possuem pH intermediário entre o pH citoplasmático e do lisossomo secundário, contêm as enzimas lisossomais na sua forma inativa. Os lisossomos primários se fundem com endossomos tardios ou autofagossomos, processos que levam a redução do pH no interior dos mesmos e ativam enzimas, hidrolases ácidas, para a digestão do material armazenado. Alguns lisossomos, sem atividade lítica, parecem ser o local de armazenamento de produtos que não conseguem ser digeridos, podendo levar à formação dos grânulos de lipofucsina (Kurz *et al.*, 2008). As características básicas que permitiram o descobrimento da origem lisossomal dos grânulos de lipofucsina foram a autofluorescência em comprimentos de onda similares a atividade das enzimas hidrolíticas e a membrana única das duas estruturas (Koenig, 1964; Brunk e Ericsson, 1972; Maslinska *et al.*, 1984).

Samorajski e colaboradores (1965) analisaram a estrutura dos grânulos de lipofucsina nos gânglios dorsais e corno ventral da medula espinhal em camundongos com 24 meses de idade. Usando a técnica histológica de coloração por *Sudan Black*, os autores observaram grânulos dispersos pequenos em grande quantidade ou maiores formando agrupamentos nos corpos neuronais e, com microscopia eletrônica, descreveram porções elétrons densas e elétrons lúcidas formando grânulos de 1 a 3 μm de diâmetro.

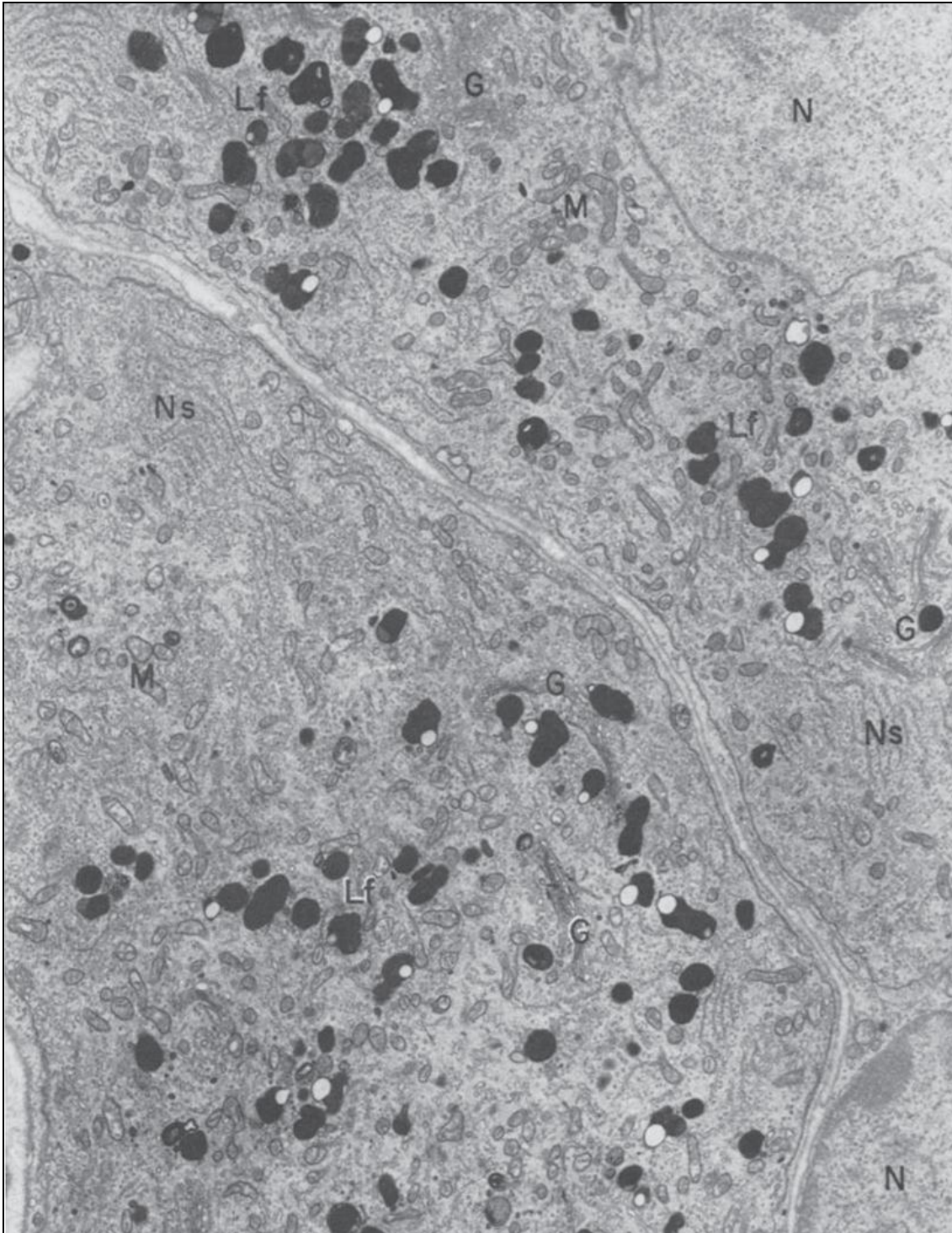


Figura 1. Porções de duas células ganglionares e uma célula satélite (ângulo inferior direito). Observar áreas elétronicamente lúcidas e elétronicamente densas dos grânulos de lipofucsina (Lf) no citoplasma dos neurônios. (M) mitocôndrias, (G) áreas de Golgi, (Ns) substância de Nissl, (N) núcleo de neurônio e de célula satélite. Observar que as áreas elétronicamente lúcidas dos grânulos de lipofucsina são muito menores que as elétronicamente densas. Modificado de Samorajski e colaboradores (1965).

Samorajski e colaboradores (1965) também observaram que tanto os lisossomos quanto os grânulos de lipofucsina são circundados por uma membrana única. Em grandes aumentos visualizam-se bandas e partículas densas no interior dos grânulos. Além disso, esses autores descrevem que, quando há a presença de numerosos grânulos, os mesmos apresentam menor tamanho, cerca de 1 μm de diâmetro, e possuem matriz densa e homogênea, com poucas bandas ou lamelas, sendo mais distribuídos no citoplasma. Ao contrário, quando estão em menor número são usualmente maiores, cerca de 3 μm de diâmetro, e apresentam uma estrutura interna com bandas mais complexas e localização perinuclear. Nem todos os neurônios observados no estudo continham grânulos em seu interior. Posteriormente será discutido com maior detalhe a imagem de Samorajski e colaboradores (1965), é importante salientar que mitocôndrias e grânulos de lipofucsina são frequentemente vistos em proximidade, inclusive estudos procuraram diferenciar a origem lisossomal ou mitocondrial dos mesmos (Hirsch, 1970).

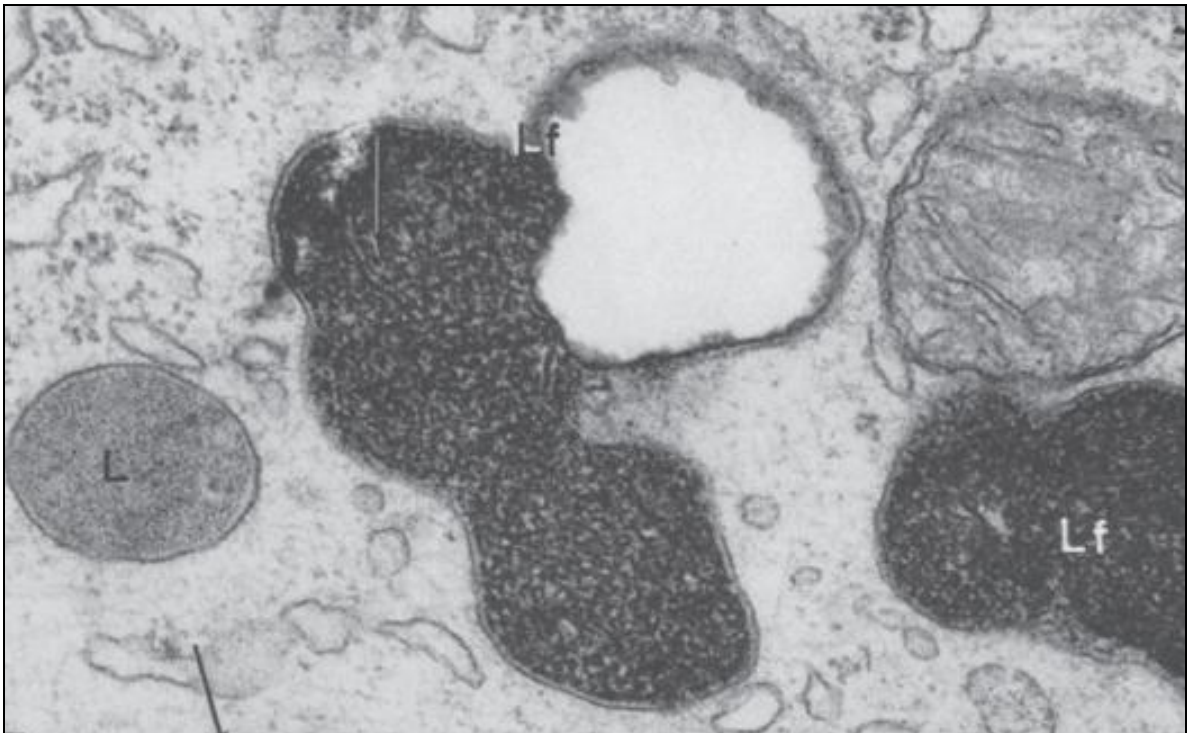


Figura 2. Porções elétron lúcidas e elétron densas dos grânulos de lipofucsina (Lf) e lisossomos (L) no citoplasma da célula ganglionar. Modificado de Samorajski e col. (1965).

Reichel e colaboradores (1968) observaram por fluorescência, sem distinção entre os corpos celulares neuronais e gliais em ratos de 9 a 11 meses e 23 a 29 meses, que células hipocâmpais apresentam maior acúmulo de grânulos de lipofucsina quando comparadas as células do córtex cerebral parietal e as células de Purkinje do cerebelo. Sendo que no hipocampo de ratos, esse acúmulo começaria antes que nas outras áreas. Além disso, aproximadamente 7% a 9% do volume celular seria ocupado por lipofucsina nas células do hipocampo e córtex cerebral de ratos.

Brody (1960), usando coloração por PAS, encontrou aumento na quantidade de lipofucsina no córtex cerebral humano com o envelhecimento. Seu estudo foi baseado na diferenciação dos neurônios piramidais na camada III do córtex cerebral em três grupos: neurônios sem pigmentação, neurônios com pigmentos dispersos no citoplasma celular e neurônios com agregação de pigmentos. Foram avaliadas quatro regiões corticais: giro pré-central, giro pós-central, giro temporal superior e área estriada.

No giro pré-central, giro pós-central e giro temporal superior, cérebros de recém nascidos de 2 meses de idade apresentaram 100% dos neurônios sem grânulos de lipofucsina. Indivíduos de 16 a 21 anos apresentaram, aproximadamente, 70% de neurônios sem grânulos de lipofucsina, 25% de neurônios com pigmentos dispersos e 5% de neurônios com agregação de pigmentos. Cérebros de adultos entre 45 a 48 anos apresentaram 25% de neurônios sem pigmento, 68% de neurônios com pigmentos dispersos e 7% de neurônios com agregação de pigmentos. Indivíduos de 70 a 95 anos apresentaram, aproximadamente, 5% de neurônios não pigmentados, 75% com pigmentos dispersos e 20% com agregação de pigmentos. Na área estriada observou-se velocidade e quantidade de acúmulo de lipofucsina menor que nas outras regiões. Assim, o autor sugeriu que exista uma relação entre o tamanho celular e o acúmulo de lipofucsina, sendo assim os neurônios da área estriada, que são células de pequeno tamanho, apresentam menor acúmulo de lipofucsina (Brody, 1960).

Nandy e Bourne (1966) demonstraram, em cobaias, que os pigmentos de lipofucsina estão presentes em neurônios tanto de animais jovens como idosos. No entanto, os grânulos de lipofucsina são mais proeminentes a partir dos quatro anos aumentando constantemente no citoplasma neuronal até os seis anos. Os autores observaram diferenças na distribuição de lipofucsina em diversas regiões do sistema nervoso central. Observaram uma maior concentração desses pigmentos em neurônios da formação reticular do tronco encefálico e núcleo olivar, enquanto uma menor concentração foi observada nos neurônios do córtex cerebral e núcleos hipotalâmicos. Em animais jovens os pigmentos aparecem dispersos no citoplasma, acumulando-se em locais próximos ao núcleo celular em animais de cinco anos. O tratamento com “*centrophenoxine*” reduziu os pigmentos de lipofucsina em diversas regiões do sistema nervoso central, sendo este efeito significativo a partir da oitava semana, aumentando com o prolongamento do tratamento.

“*Centrophenoxine*” é uma substância classificada originalmente como “neuroenergética”. O mecanismo de ação dessa droga ainda não é compreendido, mas parece atuar no ciclo de síntese da colina, aumentando o fornecimento de acetilcolina no encéfalo. Também parece reduzir radicais livres. Em humanos tem sido utilizada em idosos com fins de melhora cognitiva, principalmente em relação à memória. Em ratos os estudos descrevem aumento da expectativa de vida e melhora das habilidades de aprendizado em animais velhos que receberam “*centrophenoxine*” (Nagy, 2002). O trabalho de Nandy e Bourne (1966) foi um dos pioneiros em demonstrar que não somente o envelhecimento, mas outros fatores, como as drogas, podem alterar o acúmulo de lipofucsina no sistema nervoso central.

Brizzee e colaboradores (1969) analisaram a camada granular externa (II) e a camada piramidal interna (V) do córtex cerebral de ratos de cerca de 100 e 700 dias. Os autores observaram aumento da área ocupada pelos grânulos em relação à área do soma de neurônios em ambas as regiões, ocupando 7,91% e 18,30% na lâmina II e 12,67% e 19,44% na lâmina V

em ratos jovens e idosos respectivamente. Em ratos jovens observaram diferenças entre as duas lâminas; mas não observaram essas diferenças nos ratos idosos. Os autores sugeriram que a taxa de acúmulo dos grânulos de lipofucsina pode estar relacionada à função celular.

Hirsch (1970) utilizou neurônios humanos do corno anterior da medula espinhal com o objetivo de selecionar neurônios com alta e baixa quantidade de lipofucsina. Os corpos celulares dos neurônios que apresentavam de 60 a 90% do seu volume ocupado por lipofucsina foram classificados como sendo de alta quantidade, sendo que os que apresentavam menos de 40% do volume foram classificados como com baixa quantidade da substância. Posteriormente os autores analisaram neurônios individualmente, separando os mesmos em duas porções, a porção com os grânulos de lipofucsina deveria conter de 30% a 60% do volume com os mesmos. Os autores avaliaram as enzimas malato, lactato desidrogenase, fosfatase ácida e β -galactosidase, não encontrando diferenças em relação aos neurônios com alta ou baixa quantidade de lipofucsina. No entanto, quando comparadas, num mesmo neurônio, as porções com e sem grânulos de lipofucsina, observaram que as enzimas lisossomais fosfatase ácida e β -galactosidase (hidrolases ácidas) estavam mais ativas e que as enzimas malato (enzima citoplasmática) e lactato desidrogenase (associada à mitocôndria e fração microssomal) estavam menos ativas na porção com grânulos de lipofucsina no interior celular. Os autores concluíram que os dados são condizentes de que os grânulos de lipofucsina possuem origem lisossomal.

Nanda e Getty (1971) analisaram histologicamente diversas áreas do sistema nervoso de porcos de menos de 6 meses a 10 anos de idade, através de autofluorescência, e colorações por PAS e *Alican blue*, durante o envelhecimento. Eles descreveram que a idade de início de aparecimento e a taxa de acúmulo de lipofucsina foi variável nas diferentes áreas analisadas. Os pigmentos apareceram mais cedo e com maior taxa de acúmulo no núcleo olivar inferior, núcleo hipoglosso e núcleo rubro. O núcleo coclear, núcleo vestibular, núcleo dorsal motor do

vago, núcleo oculomotor e córtex cerebral (neurônios piramidais da V camada cortical do córtex frontal) apresentaram acúmulo posterior às áreas mencionadas anteriormente e taxa de acúmulo mais moderada. O córtex cerebelar (células de Purkinje), giro parahipocampal e tálamo apresentaram as menores taxas de acúmulo de lipofucsina. Em relação aos neurônios piramidais da V camada do córtex frontal os autores observaram que os grânulos de lipofucsina são amplamente distribuídos entre 11 meses a 1 ano de idade e a distribuição é concentrada em determinadas áreas do citoplasma entre 9 meses a 2 anos de idade. O padrão de distribuição é axonal e perinuclear. A partir de 4 anos o acúmulo torna-se mais moderado. Os autores sugerem que a diferença no padrão de acúmulo de lipofucsina entre diversas áreas do sistema nervoso e entre diferentes espécies pode ser devida a diferenças na atividade funcional dos neurônios.

Nanda e Getty (1973) analisaram, com as mesmas técnicas utilizadas no trabalho anterior, o sistema nervoso de cães entre 1 dia a 16 anos de idade. Observaram que os grânulos aparecem em áreas perinucleares de neurônios, aumentando progressivamente com a idade. Os grânulos de lipofucsina foram observados mais cedo nas células piramidais do córtex frontal, núcleo olivar inferior, núcleo hipoglosso e núcleo rubro. Os grânulos apareceram mais tardiamente nos núcleos cerebelares, putamen, globo pálido, núcleo caudado e giro parahipocampal.

Benavides e colaboradores (2002) observaram, em crianças de até cinco anos, que os grânulos de lipofucsina estão presentes em menos de 5% dos neurônios corticais do córtex temporo-parietal. Entretanto, da segunda a nona década de vida, esses grânulos são encontrados em praticamente todos os neurônios dessa região cerebral.

Boellaard e colaboradores (2004) avaliaram diferenças na estrutura da lipofucsina entre neurônios hipocámpais e neocorticais em diversas espécies animais (camundongos,

ratos, cachorros, vacas, cavalos, símios). Os autores verificaram dois padrões ultraestruturais distintos em neurônios piramidais do hipocampo. Os grânulos de lipofucsina dos neurônios piramidais da região CA1 hipocampal apresentaram gotículas lipídicas pequenas e grande porção pigmentada. Por outro lado, os grânulos das regiões CA3 e CA4 apresentaram gotículas lipídicas amplas e pequena porção pigmentada.

Ivy e colaboradores (1984) injetaram intracerebroventricularmente em ratos duas substâncias inibidoras das proteinases lisossomais: leupeptina, que se liga reversivelmente a tiol proteinases e inibe sua atividade, e cloroquina, que causa elevação do pH do lisossomo bloqueando indiretamente as proteinases ácidas. Portanto ambas as substâncias agem interrompendo o metabolismo lisossomal em diferentes vias. Os autores observaram acúmulo de inclusões lipoprotéicas, às quais denominaram “*ceroid-lipofucsin*” por serem induzidas pelas drogas. Sob microscopia eletrônica as estruturas apresentaram dimensões aproximadas de 0,5 a 3 µm. No entanto observaram, através de diversas colorações especiais (PAS, *Sudan Black*, AFIP, azul de toluidina) e autofluorescência, que existem variações na taxa de acúmulo dessas inclusões, sendo as células de Purkinje do cerebelo e as células piramidais do córtex motor as mais afetadas. O tratamento com elevada concentração de leupeptina resultou em degeneração das células de Purkinje do cerebelo. Os autores sugeriram que esses resultados podem ajudar no entendimento da etiologia da lipofucsigenose ceróide neuronal, a qual apresenta degeneração das células de Purkinje, uma vez que a inibição de enzimas lisossomais em indivíduos jovens parece levar ao acúmulo de inclusões semelhantes à lipofucsina, o qual é uma das características dessa doença.

A lipofucsigenose ceróide neuronal caracteriza um grupo de doenças neurodegenerativas autonômicas recessivas herdadas, de armazenamento lisossomal em crianças. Podem ser congênitas, infantis, infantis tardias, juvenis ou adultas. Formas espontâneas foram observadas em animais. Sete diferentes genes e mais de 150 mutações em

humanos foram observadas, muitas mutações estão associadas a defeitos em enzimas lisossomais. Nos Estados Unidos a incidência é de 1:12.500. As características clínicas mais comuns em crianças são deterioração mental e motora, perda progressiva da visão, crises epiléticas e morte prematura. Em adultos são caracterizadas por demência. Há atrofia cerebral e cerebelar, com perda neuronal e gliose. As características patomorfológicas são determinadas por autofluorescência, positividade em colorações como PAS e *Sudan Black*, resistência a solventes lipídicos e acúmulo no citoplasma principalmente de células nervosas. Sob microscopia eletrônica observa-se acúmulo de inclusões lipoprotéicas estruturalmente muito semelhantes à lipofucsina e ceróide (Haltia, 2003; Haltia, 2006).

Portanto, os grânulos de lipofucsina são característicos do envelhecimento celular e, acúmulos lipoprotéicos semelhantes à lipofucsina estão relacionados a doenças neurodegenerativas como a lipofuscigenose ceróide neuronal, o que torna necessário novos estudos que possam associar morte neuronal normal ou patológica, como em doenças como Alzheimer e Parkinson, com o acúmulo de lipofucsina durante o envelhecimento.

1.3 Envelhecimento e proteínas ubiquitina e alfa-sinucleína

A sobrevivência celular depende de um balanço entre a síntese e a degradação de proteínas. Dentre as vias de degradação de proteínas celulares, pode-se destacar a via ubiquitina-proteossoma e a via autofágica-lisossomal. Deficiências no funcionamento desses sistemas podem levar a acúmulo e agregação de proteínas, resultando em toxicidade celular e eventual neurodegeneração. Em algumas doenças neurodegenerativas como Alzheimer ou Parkinson, pode-se verificar acúmulo de agregados protéicos em neurônios (Gorman, 2008). Com o aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, da incidência de doenças

neurodegenerativas, tornaram-se mais necessárias pesquisas a fim de determinar etiologias e possíveis intervenções terapêuticas para essas doenças.

O sistema ubiquitina-proteossoma está envolvido em processos celulares de degradação e regulação de proteínas intracelulares. A ubiquitinação, ligação covalente da ubiquitina a proteínas alvo, é um processo celular vital para a degradação de proteínas por proteassomas, essa via é denominada de proteólise dependente de ubiquitina. A ubiquitina é uma proteína de células eucariotas altamente conservada e constituída por 76 aminoácidos, podendo ser encontrada livre ou conjugada (Conaway, 2002). O processo de conjugação necessita de uma cascata de reações envolvendo três enzimas: E1 (enzima ativadora da ubiquitina), E2 (enzima conjugadora da ubiquitina) e E3 (ubiquitina ligase). As enzimas E1 e E2 são responsáveis pela conjugação, enquanto a E3 liga a ubiquitina à proteína que é reconhecida pelo proteassoma 26S, um complexo proteolítico com multi-unidades e multi-catalítico que degrada as proteínas ubiquitinadas em fragmentos menores. O processo proteolítico envolve a participação de um complexo enzimático denominado proteassoma 26S, formado por duas subunidades regulatórias (19S) e uma subunidade catalítica (20S) (Goldberg, 1995; Conaway, 2002; Dawson e Dawson, 2003).

Estudos demonstram aumento de conjugados de ubiquitina de alto peso molecular durante o envelhecimento, principalmente no cerebelo e tronco cerebral. Os dados são controversos em relação à ubiquitina monomérica. Com relação ao proteassoma, diversos trabalhos apontam declínio funcional ao se compararem roedores velhos com animais mais jovens. Inclusões proteínicas ubiquitinadas estão relacionadas a diversas doenças neurodegenerativas (Gray *et al.*, 2003). Superexpressão ou agregação de alfa-sinucleína inibe a proteólise dependente de ubiquitina, podendo estar associada à morte neuronal (Dawson e Dawson, 2003).

A sinucleína, em humanos, é formada por uma família de três membros: α , β e γ . A proteína é bastante conservada intra e inter espécies. A alfa-sinucleína é uma proteína pequena, de 140 aminoácidos, expressa em altos níveis no encéfalo, normalmente observada de forma solúvel. Além disso, está associada a vesículas pré-sinápticas e possui papel, ainda não compreendido, na atividade sináptica. Alguns pesquisadores acreditam que a agregação de alfa-sinucleína, através da formação de oligômeros que podem formar estruturas fibrilares insolúveis, seja tóxica e cause morte celular (Rajagopalan e Andersen, 2001; Cookson, 2008; Cookson, 2009).

A alfa-sinucleína foi identificada como o maior componente dos corpos de Lewy em casos típicos da doença de Parkinson, juntamente com outros agregados protéicos. Os sintomas mais evidentes da doença de Parkinson são tremores, lentidão de movimentos, problemas de equilíbrio e rigidez dos membros (Savica *et al.*, 2010). A maior parte dos casos de doença de Parkinson são esporádicos, a descoberta de que mutações nessa proteína podem causar uma forma familiar da doença trouxe avanços importantes para seu entendimento. Por exemplo, uma única mudança de um par de bases nitrogenadas, alanina por treonina na posição 53 (A53T), está associada aos casos familiares. Outras mutações já foram descritas, como a troca de alanina por prolina na posição 30 (A30P). Um fato interessante é que a substituição do aminoácido treonina para alanina na posição 53 é uma característica de primatas (Burke, 2004; Cookson, 2009).

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, afetando cerca de 1% da população com idade acima de 60 anos. Nessa doença ocorre a perda de dopamina no estriado, resultando na perda da projeção dopaminérgica para a parte compacta da substância negra. Estudos apontam que para o aparecimento de sintomas clínicos é necessária a diminuição de pelo menos 70% da dopamina do estriado. No entanto é importante mencionar que com o envelhecimento ocorre perda progressiva normal de

neurônios dopaminérgicos, embora nem todos os neurônios dopaminérgicos sejam afetados e nem todos os neurônios afetados sejam dopaminérgicos (Cookson, 2009). Portanto, são vários os fatores a considerar para estudar as causas da morte dos neurônios na doença de Parkinson (Gorman, 2008).

Meredith e colaboradores (2002) demonstraram que ratos tratados durante 1, 3 e 24 semanas com 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) e probenecida (com a finalidade de inibir a liberação da toxina) apresentam significativa perda celular nos neurônios da substância negra e declínio das funções dopaminérgicas quando comparados a animais controles somente tratados com probenecida ou veículo. Após 24 semanas de tratamento com MPTP e probenecida o citoplasma de neurônios da substância negra apresentaram filamentos e grânulos imunopositivos para alfa-sinucleína e ubiquitina. Nos outros animais não foi observada imunoreatividade para alfa-sinucleína ou ubiquitina no interior de corpos neuronais ou dendritos. Nestes, alfa-sinucleína estava densamente distribuída em terminais sinápticos do córtex, estriado e substância negra. A expressão gênica de alfa-sinucleína estava reduzida 3 semanas após o tratamento, mas retornava aos valores controle em 24 semanas de tratamento. Após 24 semanas de tratamento, foram observados numerosos lisossomos secundários contendo grânulos de lipofuscina em neurônios imunopositivos a alfa-sinucleína. Nos animais tratados 45% das células continham grânulos de lipofuscina, contra 37% nos controles, diferença significativa. Os autores discutem que ubiquitina conjugada pode se acumular no interior de lisossomos quando as funções de degradação celulares não estão adequadas, sendo que ubiquitina está envolvida na degradação de alfa-sinucleína.

Serulle e colaboradores (2007) verificaram que a administração de 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), metabólito do MPTP o qual é encontrado em agrotóxicos como o Rompun (utilizado em áreas endêmicas da doença de Parkinson nos EUA), em terminais pré-sinápticos da lula *Loligo pealii* bloqueia a transmissão sináptica. A densidade de vesículas com

neurotransmissores na zona ativa pré-sináptica foi reduzida quando comparada a controles. Moreno e colaboradores (2009) verificaram que o beta amiloide 42 oligomérico intra-axonal também inibe a transmissão sináptica, reduzindo a densidade de vesículas ancoradas ao terminal pré-sináptico. Morfini e colaboradores (2007) observaram que no interior do axoplasma da lula *Loligo pealii* o MPP⁺ produz alterações no transporte axonal rápido, aumentando o transporte retrógrado dependente de dineína e reduzindo o transporte anterógrado mediado pela quinesina, significando que as vesículas de transporte axonal tendem a retornar em direção ao soma, reduzindo o número de vesículas sinápticas nos terminais. Os autores sugerem que a doença de Parkinson está associada à perda da função sináptica, classificando essa doença como uma disferopatia (do grego *pheros*, transporte) ou distúrbio do transporte axonal. Alfa-sinucleína mutantes, A30P e A53T, aumentam o transporte retrógrado e diminuem o anterógrado do mesmo modo que MPP⁺. A presença de alfa-sinucleína mutante pode afetar vias regulatórias críticas para manter o balanço normal entre o transporte anterógrado e retrógrado em neurônios dopaminérgicos, sugerindo um novo mecanismo patogênico na doença de Parkinson (Brady e colaboradores, em preparação; comunicado por um dos autores).

Al-Wande e colaboradores (2010) analisaram neurônios dopaminérgicos da substância negra e sinapses do estriado em camundongos mutantes para alfa-sinucleína, mutantes para gama-sinucleína ou selvagens de 24 a 26 meses de idade. Os autores observaram que a ausência de alfa-sinucleína, mas não de gama-sinucleína, leva a redução nos níveis de dopamina e na expressão de dois marcadores sinápticos, ampifisina e sinaptotagmina, no estriado, sem redução no número de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra. Os autores sugerem que alfa-sinucleína pode ter um papel de proteção sináptica e que a ausência dessa proteína torna as sinapses dopaminérgicas do estriado mais vulneráveis as mudanças associadas com o envelhecimento.

Portanto, o envelhecimento e a propensão ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas nesse período da vida podem estar relacionados a alterações em proteínas essenciais relacionadas à degradação de diversas proteínas intracelulares, como a ubiquitina, ou com papel ainda não esclarecido na transmissão sináptica, como a alfa-sinucleína.

1.4 Envelhecimento e transmissão sináptica

Santiago Ramón y Cajal, considerado o pai da neurociência moderna, utilizando a técnica de impregnação pela prata desenvolvida por Camillo Golgi, descreveu células no sistema nervoso, subdividindo-as em três regiões: soma, dendritos e axônio. Além disso, a partir da técnica de Golgi, observou a presença de projeções a partir dos dendritos, as quais foram denominadas espinhos dendríticos (Peters, 2007). Estudos posteriores com microscopia eletrônica demonstraram que os espinhos dendríticos são locais de contato sináptico (Gray, 1959b).

Os dendritos podem ser identificados por sua abundância em organelas, principalmente microtúbulos e neurofilamentos, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e grupamentos de ribossomos livres. Os espinhos dendríticos não apresentam microtúbulos, neurofilamentos e outras organelas, mas possuem um aparato de armazenamento de cálcio e material granular no citoplasma (Adams e Jones, 1982).

Os espinhos dendríticos possuem, aproximadamente, comprimento de 2 μm e diâmetro de 1 μm , no entanto na região próxima ao dendrito (onde surge o espinho) observa-se uma haste medindo entre 0,1 μm a 0,3 μm de diâmetro. No terminal pré-sináptico, o qual faz contato sináptico com o topo da cabeça do espinho, observam-se mitocôndrias e numerosas vesículas sinápticas (Gray, 1959b).

Gray (1959a) analisou o córtex occipital de ratos adultos com microscopia eletrônica com o objetivo de estudar sinapses do córtex cerebral. O autor descreveu dois tipos de sinapses: tipo 1 e 2. As sinapses tipo 1 são caracterizadas pela larga fenda sináptica e densidade pós-sináptica exuberante. As sinapses do tipo 2 são caracterizadas pela fenda sináptica mais estreita e menor densidade pós-sináptica. Apesar das diferenças morfológicas, o autor não sugeriu diferenças funcionais entre as sinapses tipo 1 e 2.

Uchizono (1965) sugeriu a classificação das sinapses como excitatórias ou inibitórias de acordo com o tamanho e a forma das vesículas sinápticas. O autor analisou a camada molecular e a camada de células de Purkinje do encéfalo de gatos através de microscopia eletrônica. As sinapses excitatórias seriam caracterizadas por vesículas esféricas com diâmetro aproximado de 400 Å. As sinapses inibitórias seriam caracterizadas por vesículas pleomórficas de menor tamanho. O autor sugere, que devido a estudos de eletrofisiologia que observaram que a superfície do soma das células de Purkinje seria cercada por sinapses inibitórias, que as vesículas pleomórficas observadas nessa região seriam relacionadas a sinapses inibitórias. O autor sugere que as sinapses do tipo 1, classificadas por Gray, corresponderiam as vesículas redondas associadas a sinapses excitatórias. Por outro lado, as sinapses do tipo 2, corresponderiam as vesículas pleomórficas associadas a sinapses inibitórias.



Figura 3. Sinapses excitatórias (E) e uma inibitória (I) na camada molecular do cerebelo de gatos. Observar vesículas redondas e densidade pós-sináptica assimétrica nas sinapses excitatórias e vesículas pleomórficas e densidade pós-sináptica simétrica nas sinapses inibitórias. O local de contato pós-sináptico representado é um dendrito (D). Modificado de Uchizono (1965).

Landis e Reese (1974), mediante congelamento e fratura analisaram membranas pré e pós-sinápticas em sinapses excitatórias e inibitórias do córtex cerebelar de camundongos, chinchilas e ratos. As sinapses excitatórias seriam caracterizadas por pequenos agregados de partículas na metade citoplasmática da membrana pré-sináptica, fenda sináptica alargada e amplos agregados de partículas na metade externa da membrana pós-sináptica. As sinapses inibitórias não possuem comparáveis especializações na membrana pré ou pós-sináptica. Os autores sugerem que esses achados indicam diferenças na composição ou organização das proteínas integrais da membrana para a função sináptica. Landis e colaboradores (1974)

observaram resultados similares no bulbo olfatório, nessa região os autores também observaram junções *gap*, que poderiam estar associadas à comunicação elétrica entre as células.

Podemos classificar as vesículas sinápticas quanto a sua morfologia em: vesículas elétricas lúcidas e elétricas densas. As vesículas elétricas lúcidas são redondas ou pleomórficas, e contêm aminoácidos (glutamato, ácido γ -aminobutírico, acetilcolina e glicina, por exemplo). As vesículas elétricas densas se subdividem em pequenas e grandes, contendo, respectivamente, catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina, por exemplo) e neuropeptídeos (vasopressina, substância P e β -endorfina, por exemplo) (Lopes *et al.*, 1999). As vesículas sinápticas elétricas lúcidas possuem diâmetro de 40 a 60 nm, enquanto as vesículas elétricas densas pequenas e grandes possuem diâmetro, respectivamente, de 50 a 70 nm e 80 a 100 nm (Gotow *et al.*, 1991; dados observados no presente estudo).

Moor e colaboradores (1969) foram pioneiros no estudo morfológico de sinapses usando microscopia eletrônica de congelamento rápido, com o objetivo de analisar vesículas sinápticas em maior detalhe. Os autores utilizaram órgãos subfornicais de gatos, observaram, através de técnicas convencionais de microscopia, que as vesículas elétricas lúcidas com formato redondo possuíam diâmetro em torno de 700 Å, enquanto as vesículas elétricas densas possuíam diâmetro entre 600 e 1200 Å. O autor sugere que somente as vesículas sinápticas com diâmetro superior a 800 Å podem ser classificadas como vesículas elétricas densas pela técnica de congelamento rápido.

Dois modelos para a liberação de neurotransmissor e reciclagem das membranas das vesículas sinápticas vêm sendo debatidos durante a última década: 1) o conceito secretório tradicional da fusão completa das vesículas na membrana pré-sináptica e 2) a fusão parcial ou “Kiss-and-run” (Rizzoli e Jahn, 2007). No primeiro modelo, após estímulo e liberação de

neurotransmissores para a fenda sináptica, as membranas das vesículas se fundem com a membrana plasmática pré-sináptica. A recuperação da membrana depende de sítios pré-sinápticos de clatrina para a reciclagem da membrana, onde ocorre o brotamento pré-sináptico de vesículas encapadas resgatando membranas. As vesículas de clatrina são facilmente observadas em microscopia eletrônica. Na formação das vesículas sinápticas recicladas a capa de clatrina é perdida num processo que acompanha a maturação do neurotransmissor nas nove etapas descritas por Südhof (1995): “docking” (ancoragem, ou seja, o contato inicial entre as membranas das vesículas sinápticas e a membrana pré-sináptica), “priming” (engatilhamento, vesículas aptas para fusão das membranas), “fusão/exocitose” (fusão das membranas das vesículas sinápticas e pré-sinápticas após influxo rápido de cálcio, seguindo-se a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica), “endocitose” (as membranas das vesículas extruídas são internalizadas por um mecanismo dependente de clatrina), “translocação” (as vesículas recobertas com clatrina se direcionam a endossomos e perdem sua capa de clatrina), “fusão com endossomas”, “budding” (brotamento de vesículas a partir dos endossomas), “recaptação de neurotransmissores” (envolve transporte ativo) e “translocação” (através de processos dependentes de citoesqueleto as vesículas são direcionadas a zona ativa para um novo ciclo). A totalidade do ciclo dura em torno de 1 minuto (Südhof, 1995; Südhof, 2000).

No modelo do “Kiss-and-run” as vesículas formam um pequeno poro de fusão com a membrana plasmática pré-sináptica para a liberação de neurotransmissores e são rapidamente endocitadas, num processo entre 1 e 10 segundos (Rizzoli e Jahn, 2007). Daly e colaboradores (2000) observaram que em terminais pré-sinápticos da lula *Loligo pealii* a disfunção do complexo dinamina/sinaptofisina, em um mecanismo independente de clatrina, resulta na redução da liberação de transmissores. Ou seja, o complexo dinamina/sinaptofisina é essencial para eficiente transmissão sináptica (Daly *et al.*, 2000). O modelo do “Kiss-and-run” é atualmente o mais aceito em relação à extrusão de vesículas sinápticas, uma vez que a

velocidade da transmissão sináptica ocorre em milissegundos e o resgate de membrana pela clatrina em cerca de 1 minuto (Rizzoli e Jahn, 2007).

Alterações sinápticas durante o envelhecimento têm sido descritas em diversos estudos (Geinisman *et al.*, 1977; Uemura, 1980; Adams e Jones, 1982). Geinisman e colaboradores (1977) avaliaram, por microscopia eletrônica, o número de sinapses na zona supragranular da camada molecular do giro dentado do hipocampo em ratos adultos jovens (3 meses) e senescentes (25 meses). Os autores não observaram diferenças na largura da camada molecular, no número e no tamanho dos neurônios granulares e na extensão da densidade pós-sináptica entre os grupos, mas descreveram redução no número de sinapses sobre ramos dendríticos ou espinhos dendríticos por unidade de comprimento de dendrito nos animais senescentes. Geinisman (1979) também observou diminuição nas sinapses axo-somáticas no giro dentado de animais idosos.

Os autores sugerem que a perda das sinapses dessa região pode ser devida a: 1) diminuição do número de neurônios e, conseqüentemente, de axônios pré-sinápticos; 2) perda de terminais axonais numa população constante de neurônios pré-sinápticos; 3) diminuição do número de neurônios e, conseqüente, redução de elementos pós-sinápticos como ramos e espinhos dendríticos e 4) diminuição de elementos pós-sinápticos como ramos e espinhos dendríticos numa população constante de neurônios pós-sinápticos (Geinisman *et al.*, 1977).

Para os autores, a primeira hipótese não pode ser descartada uma vez que todas as vias de entrada para o hipocampo ainda não foram completamente elucidadas. A segunda hipótese pode ser viável, uma vez que foi observado, através de outros estudos no giro dentado, que o transporte axonal de glicoproteínas destinadas ao terminal axonal é diminuído em animais senescentes. A terceira hipótese deveria ser descartada uma vez que o número de neurônios granulares parece ser constante com o envelhecimento. A quarta hipótese não pode ser

descartada, pois outros estudos, usando a coloração de Golgi, observaram redução no número de ramos e espinhos dendríticos em diversas regiões encefálicas de ratos e humanos senescentes. No entanto, para os autores a segunda hipótese é a mais adequada, uma vez que para manter a integridade estrutural das sinapses é necessário que toda a maquinaria neuronal esteja funcionando (Geinisman *et al.*, 1977).

Uemura (1980) analisou o córtex pré-frontal de macacos “*Macaca mullatta*” entre 7 e 28 anos de idade, subdividindo os animais em grupo jovem, meia idade e idoso. O autor observou redução na densidade de sinapses (utilizando microscopia eletrônica) e da densidade de espinhos dendríticos (mediante o método de Golgi) entre os grupos jovem e adulto.

Matsumoto e colaboradores (1982) analisaram sinapses do núcleo arqueado do hipotálamo em ratos de 90 a 100 dias e 720 a 930 dias de idade e observaram redução no número de neurônios dessa região com o passo do tempo. Além disso, encontraram uma redução de 51% e 57% no número de sinapses axo-dendríticas e axo-somáticas, respectivamente.

Adams e Jones (1982) estudaram as mudanças das sinapses corticais da camada molecular (camada I) do córtex parietal em ratos durante o envelhecimento (animais de 3 meses, entre 6 e 10 meses e 17 meses). Os autores avaliaram os seguintes parâmetros: número de sinapses simétricas e assimétricas, número de sinapses axo-dendríticas e axo-espinhais e número de vesículas sinápticas por terminal pré-sináptico (1 a 10, 11 a 50, >50 vesículas). Os autores observaram redução no número total de sinapses (aproximadamente 28%) entre os animais de 6 a 10 meses para os de 17 meses de idade. Além disso, 91-96% das sinapses observadas eram assimétricas, sendo que essa proporção continua constante com o envelhecimento. No entanto, ao se subdividir entre o número de sinapses assimétricas e simétricas, somente as sinapses assimétricas diminuem com o envelhecimento. Ao se

subdividir as sinapses assimétricas quanto ao local de contato pós-sináptico observaram que ambas as axo-dendríticas (significativas entre 3 e 6 meses) e axo-espinosas (significativas entre 10 e 17 meses) diminuem com o envelhecimento. Além disso, as sinapses axo-espinhais são sempre assimétricas, ao contrário das axo-dendríticas que podem ser assimétricas ou simétricas (Adams e Jones, 1982). No entanto, estudos recentes observaram sinapses inibitórias (simétricas) em espinhos dendríticos (Fifková *et al.*, 1992; Kubota *et al.*, 2007).

Em relação à área do terminal pré-sináptico ocorre redução entre os grupos com o envelhecimento. Quando avaliado o número de vesículas sinápticas (1 a 10, 11 a 50, >50 vesículas) nos terminais pré-sinápticos todos os grupos apresentaram maior frequência de terminais contendo entre 11 a 50 vesículas. No entanto, ao se compararem as diferentes idades, os terminais contendo 1 a 10 e 1 a 50 vesículas aumentaram entre animais de 3 e 10 meses e diminuíram entre animais de 10 e 17 meses (Adams e Jones, 1982).

Levine e colaboradores (1988) analisaram o neurópilo do núcleo caudado de gatos de: 1 a 3, 6 a 9 e 12 a 22 anos. Os autores observaram diminuição na densidade de sinapses no segundo e terceiros grupos quando comparados ao primeiro. Além disso, os autores observaram acúmulo de grânulos de lipofucsina no neurônio de gatos idosos.

Portanto, diversas alterações em relação aos grânulos de lipofucsina, proteínas e sinapses têm sido descritas. Não obstante, a idade cronológica das células, nem sempre corresponde a sua “idade funcional”. Neste projeto estudamos as sinapses em relação às proteínas ubiquitina e alfa-sinucleína no córtex temporal durante o envelhecimento utilizando os grânulos de lipofucsina como indicadores do envelhecimento celular. É importante salientar que o envelhecimento e a propensão ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas durante esse período da vida podem estar relacionados a alterações em

proteínas essenciais relacionadas à degradação de diversas outras proteínas intracelulares, como a ubiquitina, ou com papel na transmissão sináptica, como a alfa-sinucleína.

Este projeto foi realizado para revisar experimentalmente diversos resultados sobre o envelhecimento neuronal, como ponto de partida para analisar o envelhecimento de ratos ativos em meio enriquecido em relação à morfologia neuronal e às proteínas envolvidas no envelhecimento.

2. Objetivos

2.1 Gerais

Analisar os grânulos de lipofucsina em relação às proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina e em relação às sinapses no córtex temporal de humanos e/ou de ratos ao longo do envelhecimento.

2.2 Específicos

Quantificar a área dos grânulos de lipofucsina em relação à área do citoplasma neuronal e do corpo neuronal, número de grânulos por neurônio, número de porções lipídicas por neurônio e proporção das porções elétron densa e elétron lúcida em relação à área do grânulo no córtex temporal de humanos e de ratos durante o envelhecimento.

Analisar a expressão das proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina no córtex temporal de humanos durante o envelhecimento.

Analisar porcentagem de sinapses excitatórias, inibitórias ou elétricas, densidade pós-sináptica como assimétrica ou simétrica, número e morfologia de vesículas sinápticas, local de contato pós-sináptico, número de vesículas ancoradas ou fusionadas a membrana pré-sináptica e número de vesículas encapadas por clatrina no córtex temporal de humanos e de ratos durante o envelhecimento.

3. Hipótese

Apesar do acúmulo de grânulos de lipofucsina ser maior em neurônios de indivíduos mais idosos muitos autores consideram esses grânulos como simples produtos do funcionamento e idade celular, sem relacioná-los com doenças ou funcionamento neuronal inadequado. O presente estudo teve como objetivo inicial testar a hipótese de que o acúmulo de grânulos de lipofucsina em neurônios de indivíduos mais idosos poderia ser utilizado como indicador ou precursor de doenças neurodegenerativas ou mau funcionamento de sinapses do córtex temporal. Para testar essa hipótese, foi utilizada como abordagem inicial uma caracterização ampla dos grânulos de lipofucsina utilizando microscopias de luz e eletrônica. Além disso, verificou-se a morfologia sináptica e a expressão de duas proteínas (alfa-sinucleína e ubiquitina) indicadoras de neurodegeneração e envelhecimento a fim de estabelecer uma possível relação entre o acúmulo de grânulos de lipofucsina e a maior expressão dessas proteínas em neurônios do córtex temporal de indivíduos mais idosos.

4. Material e Métodos

4.1 Amostras

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP/USP, processo número 1990/2009, no dia 11 de maio de 2009. Além disso, foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP/USP, processo número 059/2009, no dia 27 de abril de 2009.

4.2 Córtex temporal humano

Durante o procedimento de lobectomia, cirurgia utilizada para tratamento de pacientes com epilepsia que não respondem a tratamento medicamentoso, foram coletadas porções corticais do giro temporal médio do lobo temporal. Essas regiões corticais são removidas durante a cirurgia para acesso às áreas atingidas pela doença (principalmente hipocampo e amígdala), as quais estão localizadas mais internamente no encéfalo.

Foram coletadas 14 amostras corticais de indivíduos submetidos a esse tratamento cirúrgico no Centro de Epilepsia do Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo, entre maio de 2009 a junho de 2010. Foram utilizadas amostras de indivíduos que assinaram o termo de consentimento, que se encontra nos anexos, concordando em participar da pesquisa.

Os critérios para inclusão das amostras foram: indivíduos com epilepsia com indicação ao tratamento cirúrgico de lobectomia temporal, independentemente de sexo ou etnia. Os critérios para exclusão foram: pacientes com presença de tumor ou lesão ocupando a região cortical a ser colhida, pacientes portadores de epilepsia extra-temporal (em outras regiões cerebrais) e pacientes com outras doenças que afetem o sistema nervoso central.

As amostras coletadas foram divididas, conforme a faixa etária dos indivíduos, em três grupos: grupo 1 (pacientes entre 20 a 28 anos, n=4), grupo 2 (pacientes entre 37 a 41 anos, n=5), grupo 3 (pacientes entre 50 e 55 anos, n=5).

Tabela 1. Dados referentes à análise dos prontuários dos indivíduos

INDIVÍDUO	GRUPO/IDADE/SEXO	HEMISFÉRIO/ COGNIÇÃO/ FREQUENCIA DAS CRISES	ESCOLARIDADE/ ETILISMO/ TABAGISMO
A	Grupo 1 20 anos Masculino	Direito Perfil cognitivo geral preservado 7 crises por mês	Ensino médio Não Não
B	Grupo 1 25 anos Masculino	Direito Perfil cognitivo geral preservado 2 a 3 crises por semana	Ensino fundamental Não Sim
C	Grupo 1 28 anos Feminino	Esquerdo Perfil cognitivo geral preservado 3 crises por mês	Ensino superior Não Não
D	Grupo 1 28 anos Masculino	Esquerdo Perfil cognitivo geral no limite inferior da normalidade 1 a 2 crises por mês	Ensino fundamental Não Não
E	Grupo 2 37 anos Masculino	Direito Perfil cognitivo geral no limite inferior da normalidade 3 a 4 vezes por semana	- Não Ex-tabagista
F	Grupo 2 37 anos Feminino	Esquerdo Perfil cognitivo geral no limite inferior da normalidade 3 vezes por semana	Ensino fundamental Não Não
G	Grupo 2 38 anos Masculino	Direito Perfil cognitivo geral preservado 2 a 3 vezes por mês	Ensino fundamental Não Não
H	Grupo 2 40 anos Feminino	Esquerdo Perfil cognitivo geral preservado	Ensino fundamental Não Não
I	Grupo 2 41 anos Masculino	- Esquerdo Perfil cognitivo geral inferior a normalidade Diárias	Ensino fundamental Ex-etilista Ex-tabagista
J	Grupo 3 50 anos Masculino	Direito Perfil cognitivo geral inferior a normalidade 2 vezes ao mês	Ensino médio Não Não

L	Grupo 3 51 anos Masculino	Direito Perfil cognitivo geral no limite inferior da normalidade 3 a 4 vezes por semana	- Não Ex-tabagista
M	Grupo 3 51 anos Feminino	Direito Perfil cognitivo geral no limite inferior da normalidade 3 a 4 vezes por mês	Analfabeta Não Não
N	Grupo 3 54 anos Feminino	Esquerdo Perfil cognitivo geral preservado 1 a 2 vezes por mês	Ensino médio Não Não
O	Grupo 3 55 anos Masculino	Esquerdo Perfil cognitivo geral preservado 1 vez por mês	Ensino fundamental Ex-etilista Ex-tabagista

Nas análises dos prontuários a avaliação do material pela patologia descrevia que na macroscopia havia nítida delimitação entre córtex e substância branca e distribuição normal da substância cinzenta cortical sem alterações na morfologia dos giros, sendo que ventrículos, sulcos, cisternas e fissuras apresentaram dimensões e topografia preservada. Na microscopia os fragmentos de neocórtex apresentaram arquitetura geral preservada, com aumento de celularidade a custa de moderada astrogliose. De forma geral, os grupos foram bastante similares.

4.3 Córtex temporal animal

Foram coletadas amostras do córtex cerebral do lobo temporal de ratos Wistar machos adultos de 2 (grupo 1), 6 (grupo 2), 10 (grupo 3) e 12 meses (grupo 4) de idade (n=2), provenientes do biotério local (FMRP-USP), mantidos em condições padrão, com acesso à comida e à água *ad libitum*, temperatura ambiente em cerca de 22°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os animais foram manipulados de acordo com as leis nacionais e internacionais (Diretriz de Conselho da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) que regem a execução de experimentos com animais de laboratório em condições éticas de trabalho.

Com a finalidade de que o procedimento de fixação e processamento das amostras fosse equivalente entre as amostras de córtex animal e humano, os animais foram analgésicos com isoflurano antes de serem decapitados.

4.4 Procedimentos morfológicos e de biologia molecular

As amostras de córtex temporal humano ou animal foram seccionadas manualmente, sendo cada secção submetida a um fixador adequado para determinado procedimento morfológico e uma secção armazenada em nitrogênio líquido.

4.4.1 Microscopia de luz

As amostras de córtex temporal humano (grupo 1: A, B, C, D; grupo 2: E, F, G, H, I; grupo 3: J, L, M, N, O) ou animal foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH=7,4), por um período de 24 horas. Após, as amostras foram mantidas em tampão fosfato de sódio 0,1M até serem processadas. Para o processamento das amostras as mesmas foram lavadas em solução de álcool 50%, depois colocadas, durante 1 hora, em concentrações crescentes de álcool 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto (3 passagens no álcool absoluto). Na seqüência, colocadas, durante 1 hora, em solução mista de álcool e benzol, passando após por 3 passagens no benzol. Após, o material foi embebido duas vezes durante 2 horas em parafina a 60°C, sendo posteriormente incluído e cortado em micrótomo, em secções de 6 µm seriadas, com intervalo entre os cortes de aproximadamente 60 µm. Para contagem de lipofucsina nas secções em microscopia de luz três colorações foram testadas: PAS, AFIP e *Sudan Black*. Em todos os métodos, os cortes sobre lâminas passaram pelo procedimento de desparafinização em xilol, reidratação em concentração de álcoois decrescentes e lavagem em água destilada.

Para o método de PAS as secções foram colocadas em ácido periódico de Schiff 0,5% em água destilada durante 15 minutos, sendo posteriormente lavadas em água destilada. Em seguida, foram colocadas no reativo de Schiff durante 20 minutos. Após, as secções foram submetidas a 3 banhos de 5 minutos em água sulfurosa (10 ml de ácido clorídrico 1N, 10 ml de bissulfito de sódio 10% e 180 ml de água destilada) e lavadas durante 5 minutos em água corrente e 2 vezes em água destilada. Posteriormente diferenciadas rapidamente em hematoxilina (aproximadamente 30 segundos), lavadas em água corrente e destilada, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e montadas em resina.

Para o método AFIP as secções foram colocadas por uma noite (modificação do método original) em solução de carbolfucsina (4g de fucsina básica, 8g de fenol, 20 ml de álcool etílico 95%, completando com água destilada para um volume final de 100 ml). Após, as secções foram lavadas em água destilada diversas vezes e diferenciadas em solução de álcool ácido 1% (1 ml de ácido clorídrico e 99 ml de álcool 70%) até as secções adquirirem coloração rósea pálida. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente e enxaguados em água destilada, sendo as secções então contrastadas com solução aquosa de ácido pícrico 1% por 1 minuto, desidratadas, diafanizadas e montadas em resina.

Para o método Sudan Black as secções foram hidratadas somente até álcool 70%, sendo, em seguida, colocadas por uma noite na solução de *Sudan Black* (solução saturada de *Sudan Black* em álcool 70%). No dia seguinte, as secções foram diferenciadas em álcool 70% até adquirirem uma coloração cinza pálida, sendo colocadas em água destilada e montadas em glicerol.

Comparadas as três colorações, decidiu-se fazer a contagem de lipofucsina pelo método de *Sudan Black*.

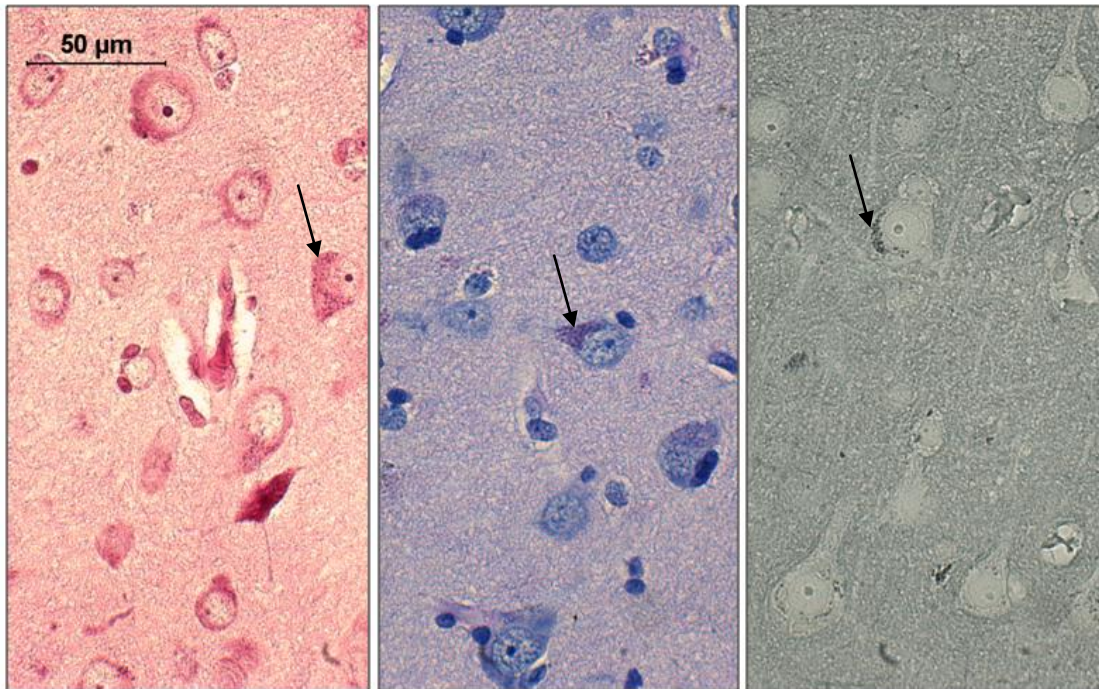


Figura 4. Coloração de PAS, AFIP e *Sudan Black*. As setas indicam os grânulos de lipofuscina nos corpos neuronais.

Para a contagem com a coloração do *Sudan Black* avaliaram-se as imagens e se concluiu que a contagem seria mais precisa se não fosse contabilizada a quantidade de lipofuscina em determinada área de tecido, mas a área ocupada pelos grânulos de lipofuscina dentro da área de um determinado número de neurônios.

Primeiramente realizou-se uma estimativa de quantos neurônios seriam necessários em determinada secção. Para isso, definiu-se um padrão de contagem de 5 neurônios por campo óptico na objetiva de 40X do microscópio Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha) acoplado a vídeo câmara (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e analisados no programa programa Leica QWin Software V. 3.2.0., Cambridge, Inglaterra). Contou-se a área ocupada pelos grânulos de lipofuscina dentro de determinado neurônio (área ocupada pelos grânulos de lipofuscina/área do neurônio), e se fez

a média dessa área. Após, fez-se a média da primeira média com a segunda média (definida como a média do primeiro campo mais a média do segundo campo). Depois, fez-se a média da primeira média e da segunda média com a média do terceiro campo, consecutivamente até que as médias encontradas se tornassem aproximadas. Isso foi conseguido após a contagem de 26 campos (130 neurônios), no entanto, para diminuir possível margem de erro contaram-se 150 neurônios por secção.

Assim, iniciou-se a contagem da área ocupada pelos grânulos de lipofucsina dentro de determinado neurônio em cada secção. Para a contagem, com objetiva de 40X, contaram-se todas as células do campo com morfologia de neurônio, sendo necessário que o núcleo e citoplasma pudessem ser observados. Não foram diferenciados neurônios granulares e piramidais. Além disso, nos neurônios aonde pudesse ser visualizado o dendrito apical, a contagem da área do neurônio era medida até o início de implantação do mesmo. Primeiramente, realizou-se a contagem da área total do neurônio (circundando-o), em seguida, realizou-se a contagem da área dos grânulos nesse neurônio definido no programa Leica QWin Software V. 3.2.0 um padrão de marcação dos grânulos naquele neurônio específico. Foram analisados neurônios das seis camadas corticais.

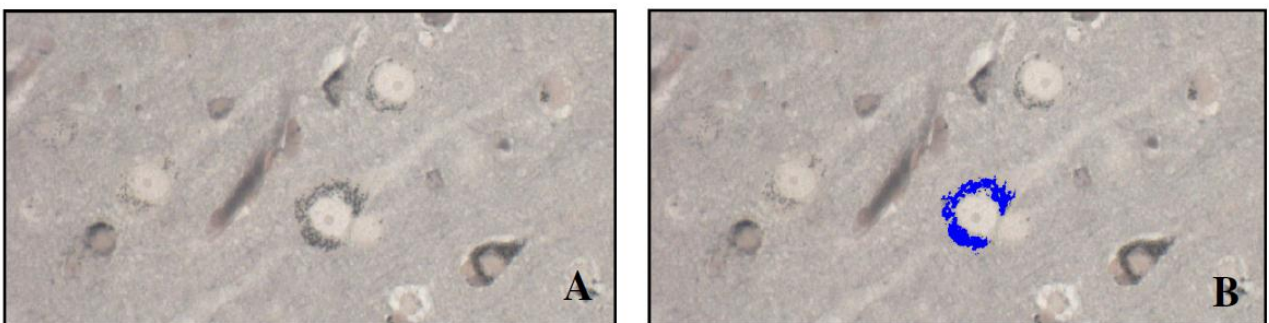


Figura 5. A) Lipofucsina no interior do citoplasma do neurônio piramidal. B) Padrão de marcação para contagem pelo programa Leica QWin Software V. 3.2.0. Coloração de *Sudan Black*, aumento de 400X.

4.4.2 Microscopia eletrônica

Protocolo conforme Moreira e colaboradores (1996; 1998) As amostras de córtex temporal humano ou animal foram fixadas em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH=7,4), por um período de 24 horas. Após, as amostras foram mantidas em tampão cacodilato de sódio 0,1M até serem processadas. Para o processamento das amostras as mesmas foram mantidas durante 2 horas em solução de 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1M, em frascos sobre gelo e mantidos protegidos da luz. Da mesma forma, as amostras foram lavadas 2 vezes de 10 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M e, posteriormente, tampão acetato de sódio 0,1M (pH=5,0). Em seguida, transferidas para solução de acetato de uranila 2% em tampão acetato de sódio, ficando nessa solução por uma noite, sobre agitação em câmara fria.

No dia seguinte, as amostras foram lavadas 2 vezes de 10 minutos em tampão acetato de sódio 0,1M, sendo, posteriormente, desidratadas, durante 10 minutos em cada concentração de álcool (50%, 75%, 85%, 95%, 100% e 100%) e finalmente colocadas em óxido de propileno, 3 trocas de 5 minutos. A infiltração do tecido foi realizada em resina Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, EUA) com óxido de propileno na concentração 1:1 durante 6 horas e na concentração 2:1 por uma noite, sob agitação. No dia seguinte, infiltrava-se o material em resina Embed 812 com óxido de propileno na concentração 3:1 durante 6 horas e em 100% de resina por uma noite, para finalmente incluir e orientar os blocos e polimerizá-los a 60° C durante 36 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrótomo (UCT, Leica, Alemanha). Cortes semi-finos (500 nm) corados com azul de toluidina serviram para a visualização, por microscopia de luz, das áreas corticais (II a IV) e para reparar os blocos e fazer cortes ultrafinos (60 nm). Os cortes ultrafinos foram montados sobre grades de cobre de buraco único numeradas (SynapTek™ NOTCH-NUM Grids, 1 x 2 mm slot, Beryllium-Copper, Ted Pella, CA) recobertas com *Pyoloform* (Ted Pella, CA),

contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados e fotografados no microscópio eletrônico (Zeiss EM-108, Alemanha). Os dados foram analisados pelo *software Image J* (NIH, EUA).

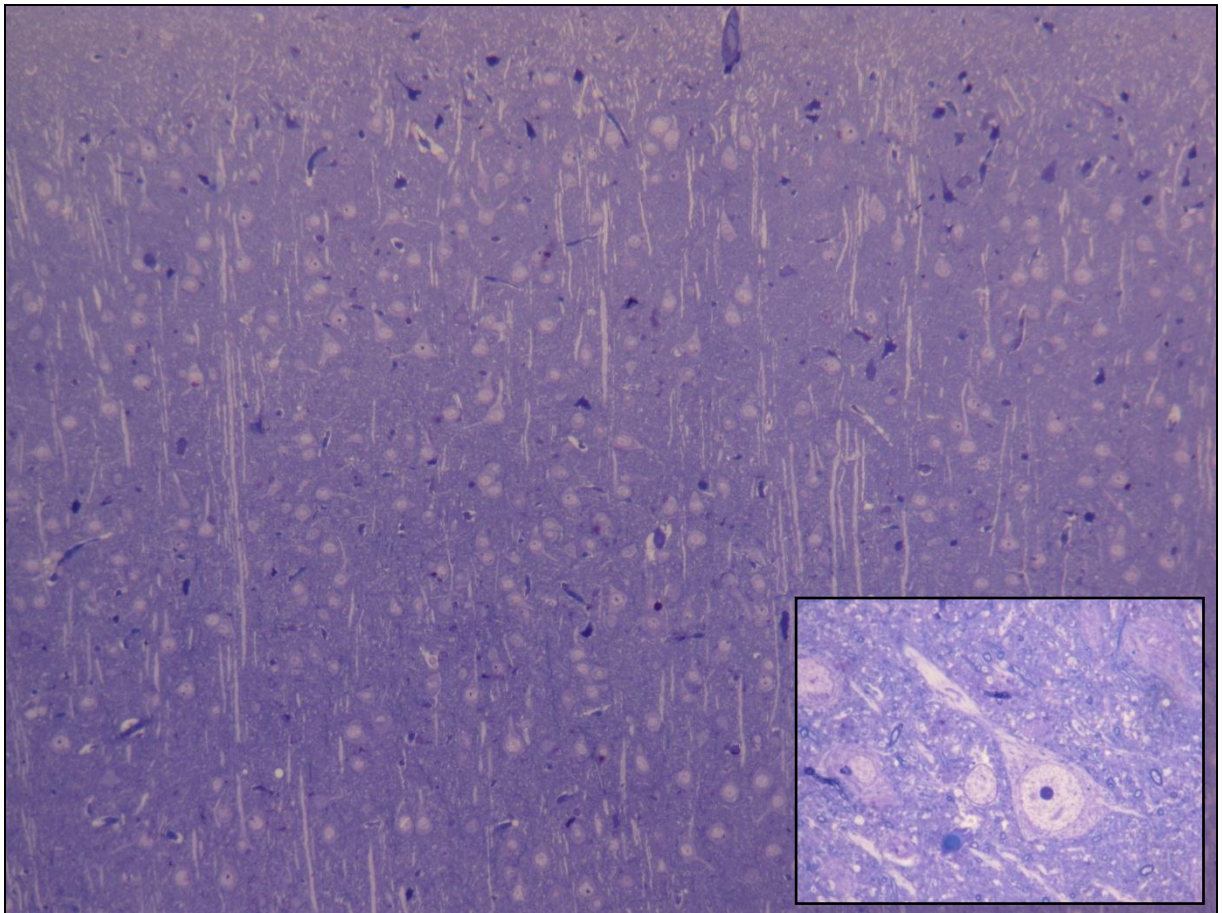


Figura 6. Fotomicrografia de córtex temporal humano (semi-fino, 500 nm), corado com azul de toluidina (aumento de 100X). Em destaque, observa-se neurônio piramidal com dendrito apical, o qual se dirige a pia-máter (aumento de 1.000X).

Para análise dos grânulos de lipofuscina do córtex temporal medial foram analisados, aleatoriamente, 20 neurônios por amostra (grupo 1: A, B, C, D; grupo 2: E, F, G, H, I; grupo 3: J, L, M, N, O), no aumento de 7.000 vezes. Foram analisados a área dos grânulos de lipofuscina em relação à área do citoplasma neuronal e área do corpo neuronal, o número de grânulos por neurônio, o número de porções lipídicas por neurônio e área da porção elétron densa e elétron lúcida em relação à área do grânulo.

Para análise das sinapses do córtex temporal medial foram analisadas, aleatoriamente, aproximadamente 100 sinapses por amostra (grupo 1: A, C, D; grupo 2: F, G, I; grupo 3: J, L, M, N), no aumento de 20.000 vezes. Foram analisados a porcentagem de sinapses excitatórias, inibitórias ou elétricas, a densidade pós-sináptica como assimétrica ou simétrica, o número e morfologia de vesículas sinápticas (elétrons lúcidos redondas ou pleomórficas e elétrons densos pequenas ou grandes) em relação à área do terminal axonal, o local de contato pós-sináptico (dendrito, espinho dendrítico, axônio ou corpo celular), o número de vesículas ancoradas ou fusionadas a membrana e o número de vesículas recobertas com clatrina em relação à área do terminal axonal.

4.4.2.1 Reconstrução tridimensional

Cortes seriados ultrafinos (19 secções) de 80 nm, de um grânulo de lipofucsina de córtex temporal humano do grupo 3 (50 a 55 anos), foram processados como descrito anteriormente, e imagens digitais foram reconstruídas tridimensionalmente com o auxílio do programa ReconstructTM do laboratório da Dra. Kristen Harris (University of Texas, EUA).

4.4.3 Microscopia confocal

Amostras de córtex temporal humano (grupo 1: A; grupo 2: F; grupo 3: J) foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH=7,4), por um período de 24 horas. Após, as amostras foram mantidas em tampão fosfato de sódio 0,1M até serem processadas. Secções de 150 µm foram cortadas em vibrátomo (VT1000S, Leica, Alemanha) e incubadas durante 5 minutos com DAPI (Sigma, EUA - 0,13 ml de DAPI em 6,25 ml de PBS; corante nuclear). As secções nas lâminas foram montadas com Fluoromount (Fluoromount EMS, EUA) e visualizadas no microscópio confocal Leica SP5 (Alemanha) com o laser de argônio. A autofluorescência dos grânulos de lipofucsina nas células do córtex temporal foi visualizada com emissão entre 488 – 620 nm e a marcação dos núcleos entre 405

– 490 nm. Desde que DAPI expõe proteínas nucleares, não foi possível diferenciar núcleos de neurônios e de células gliais. O estudo foi feito sobre a reconstrução de 32 secções de 0,6 µm através do programa LAS AF Lite software (Alemanha).

4.4.4 Western blots

Amostras (alfa sinucleína - grupo 1: A, B, C, D; grupo 2: E, F, G, H; grupo 3: M, N, O e ubiquitina - grupo 1: A, B, C, D; grupo 2: E, F, G; grupo 3: M, N, O) de córtex temporal humano foram colocadas em 150 µl (o volume adicionado em cada amostra foi equalizado em relação ao peso do mesmo) de PBS com inibidor de protease 1%. Em seguida, foram trituradas manualmente com pistilo e sonicadas (3 vezes de 10 segundos), em gelo. As amostras sonicadas foram centrifugadas a 2650 G a 4° C durante 10 minutos, em centrífuga previamente resfriada. Do sobrenadante foram retirados 100 µl, sendo a quantidade total de proteínas medidas através do reagente BIO-RAD (em espectrofotômetro). A quantidade de proteínas totais foi equalizada com PBS e SDS 10% de forma que a concentração final de SDS fosse de 1% e o volume final da solução ficasse em torno de 400 µl, permanecendo durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se igual quantidade de tampão de amostra 0,2M e ferveu-se a solução com as proteínas totais a 95° C durante 5 minutos. A solução foi alíquotada e armazenada a – 80° C em freezer, sendo as alíquotas fervidas e aplicadas em gel vertical de poliacrilamida (formado por um gel de empilhamento a 12% e por um gel de separação a 3,5%). Em cada poço do gel foram aplicados 15 µl das soluções, contendo de 20 a 30 µg de proteínas que correram na eletroforese em tampão Tris-glicina 1X, sob corrente constante de 130 V por cerca de 2 horas à temperatura ambiente. Além disso, num poço, foi adicionado 15 µl do marcador de peso molecular (kDa, SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas). As amostras dos géis foram transferidas para a membrana de nitrocelulose a 0,36 A durante 1 hora. Em seguida, a membrana foi corada com

Ponceau, sendo lavada posteriormente em PBS, bloqueada com leite mólico 5% e BSA 1% em PBS 1 X, por uma noite a 4° C. No dia seguinte, após as membranas serem lavadas (3 vezes por 5 minutos em PBS 1 X), foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: beta-actina (Abcam, 1/5000, durante 1 hora, controle), alfa sinucleína (Abcam, 1/500, durante 2 horas) e ubiquitina (Boston Biochem, 1/2000, durante 1 hora); lavadas 4 vezes por 5 minutos em PBS 1X e incubadas com anticorpo secundário 1/10.000 por 1 hora. Após lavados finais, o sinal foi revelado pelo *kit* ECL, sendo os filmes expostos a raios X. Os dados foram analisados pelo *software Image J* (NIH, EUA), sendo que a intensidade observada em cada amostra foi equalizada em comparação com a expressão de beta-actina. As membranas também foram incubadas com β -amilóide e TAU fosforilada, no entanto não conseguimos controles de indivíduos com Alzheimer e Parkinson para distinguir se as amostras eram negativas para a proteína ou se o anticorpo não estava funcionando adequadamente.

4.5 Análise gráfica e estatística

Devido ao pequeno número amostral os dados foram comparados através de testes estatísticos não paramétricos, Kruskal Wallis (quando comparados 3 ou 4 grupos) e Mann-Whitney (quando comparados 2 grupos). O teste *post hoc* utilizado foi o teste de Dunn. Em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. A variável idade foi avaliada como variável independente e as outras variáveis como variáveis dependentes. Apesar de bastante freqüente a expressão de dados não paramétricos como mediana e intervalo de confiança, os resultados dos experimentos foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM) a fim de facilitar a visualização e comparação dos resultados com outros trabalhos. As análises estatísticas foram feitas no programa Statistica® para Windows 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e a confecção dos gráficos foi feita utilizando-se o programa Graph Pad Prism® 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA).

5. Resultados

5.1 Análise dos grânulos de lipofucsina por microscopia de luz

5.1.1 Córtex temporal humano

O Kruskal Wallis evidenciou que a variável idade influencia a área dos grânulos de lipofucsina nos neurônios do córtex temporal (figura 8). Comparações múltiplas entre os grupos mostraram que a razão entre a área dos grânulos e a área do corpo neuronal foi maior nas amostras do grupo 3 que na amostra do grupo experimental 1 [figura 7 A; $H(2, n = 14) = 9,50, p < 0,01$: grupo 1 ($3,17 \pm 0,73$), grupo 2 ($4,31 \pm 0,99$) e grupo 3 ($7,47 \pm 2,33$)]. Não foram evidenciadas diferenças significativas entre a área do corpo neuronal dos neurônios analisados dos diversos grupos experimentais [figura 7 B; $H(2, n = 14) = 0,27, p > 0,05$: grupo 1 ($361,60 \pm 59,78$), grupo 2 ($334,88 \pm 35,34$) e grupo 3 ($335,51 \pm 48,86$)]. Salienta-se que todas as medidas de área do presente estudo foram mensuradas em μm^2 .

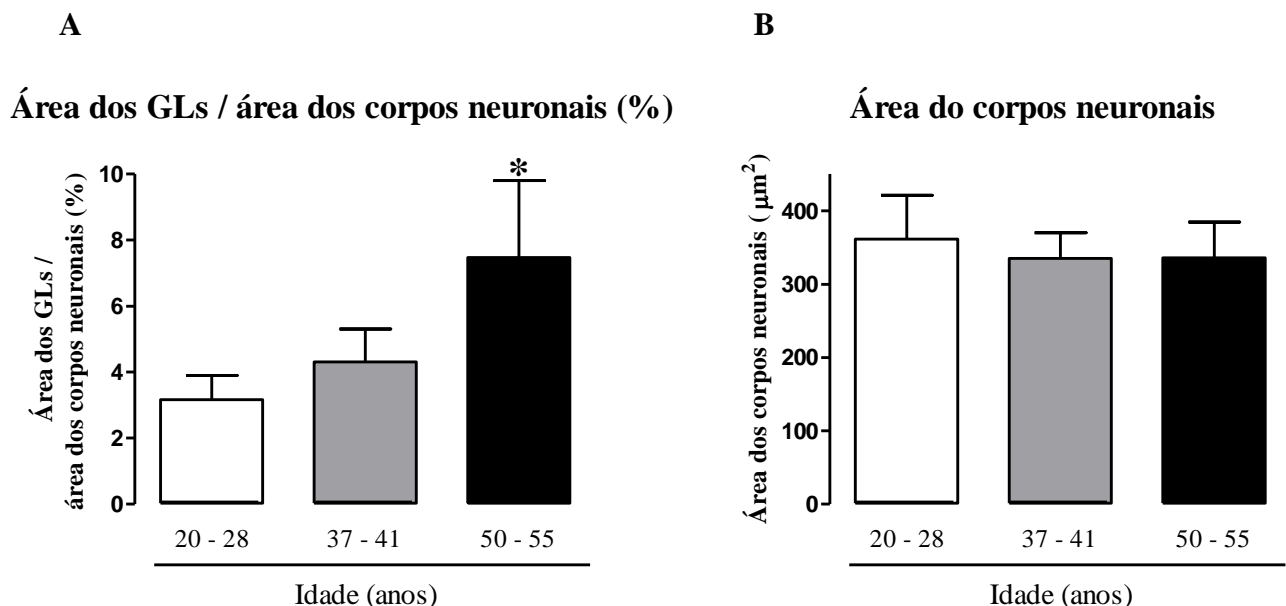
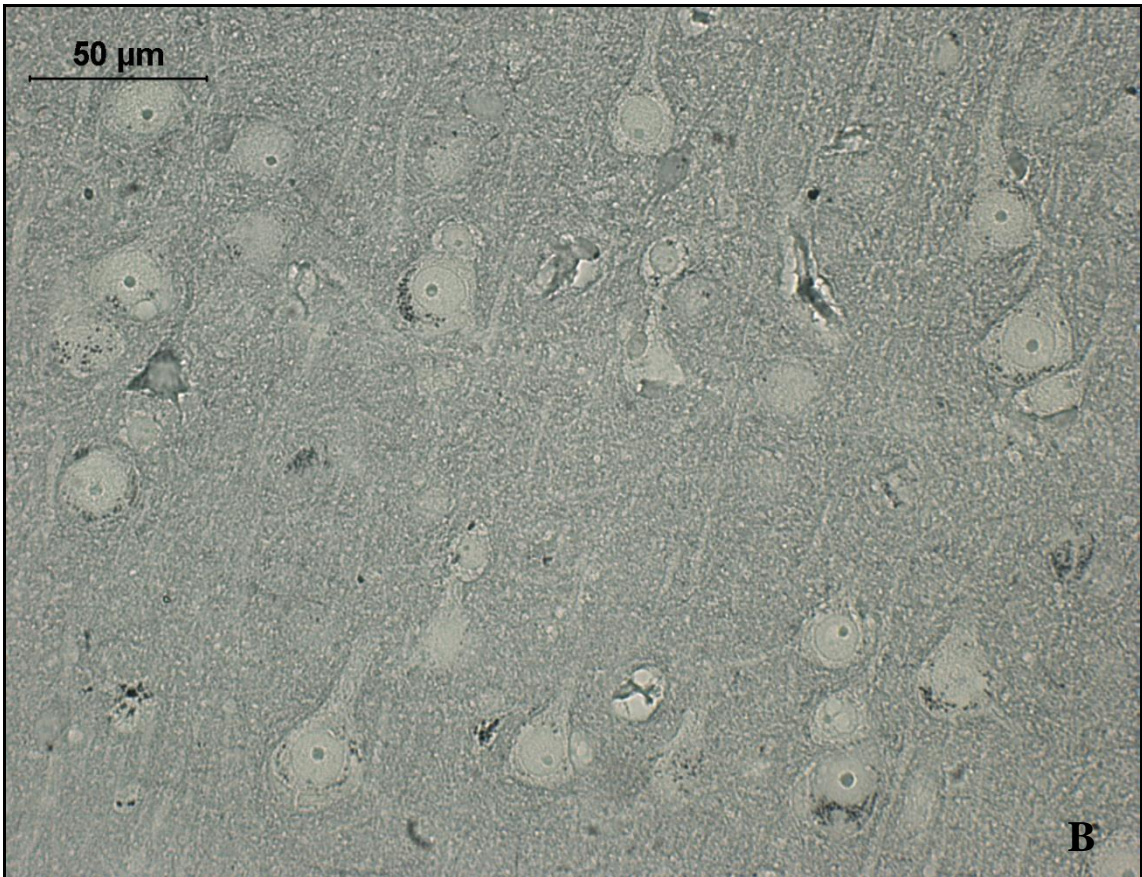
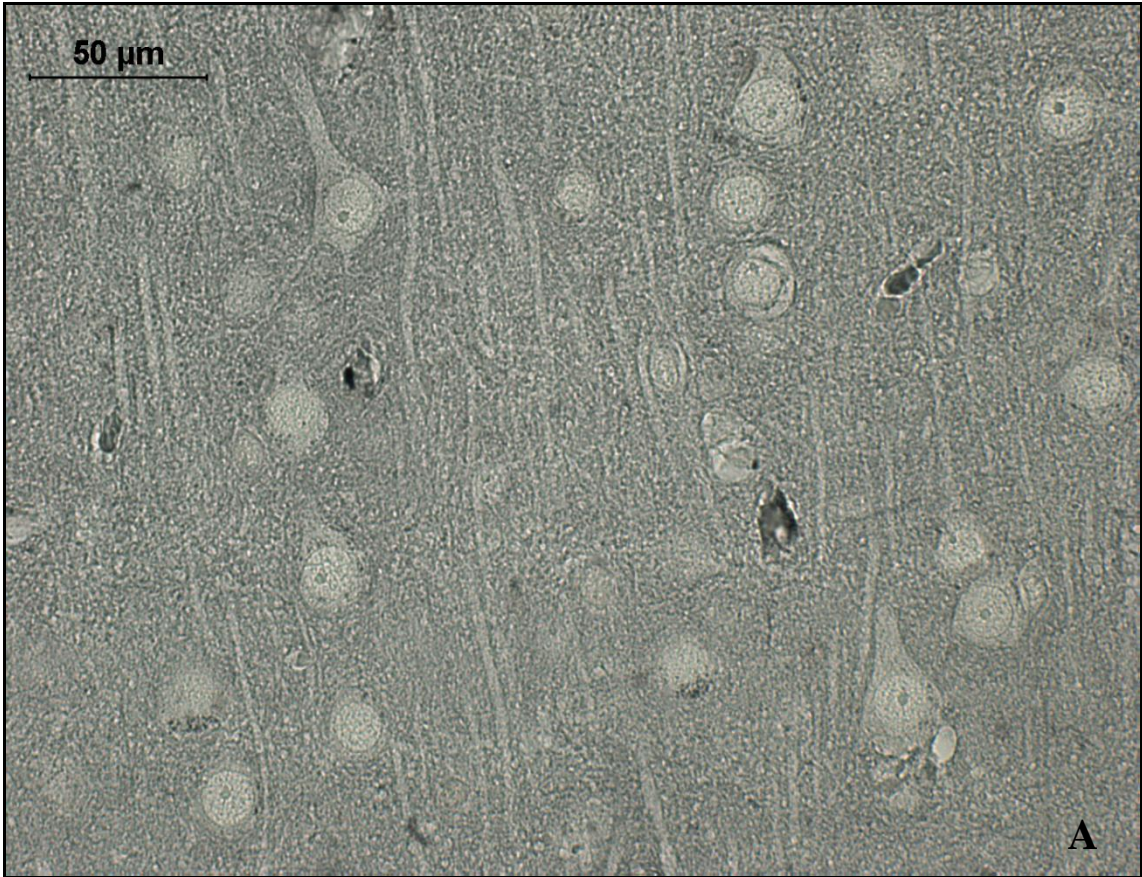


Figura 7. **A.** Porcentagem de grânulos de lipofucsina em relação à área do corpo neuronal. **B.** Área do corpo neuronal (μm^2) de amostras de indivíduos de diferentes idades. * $p < 0,01$ em relação ao grupo 1 (20 a 28 anos).



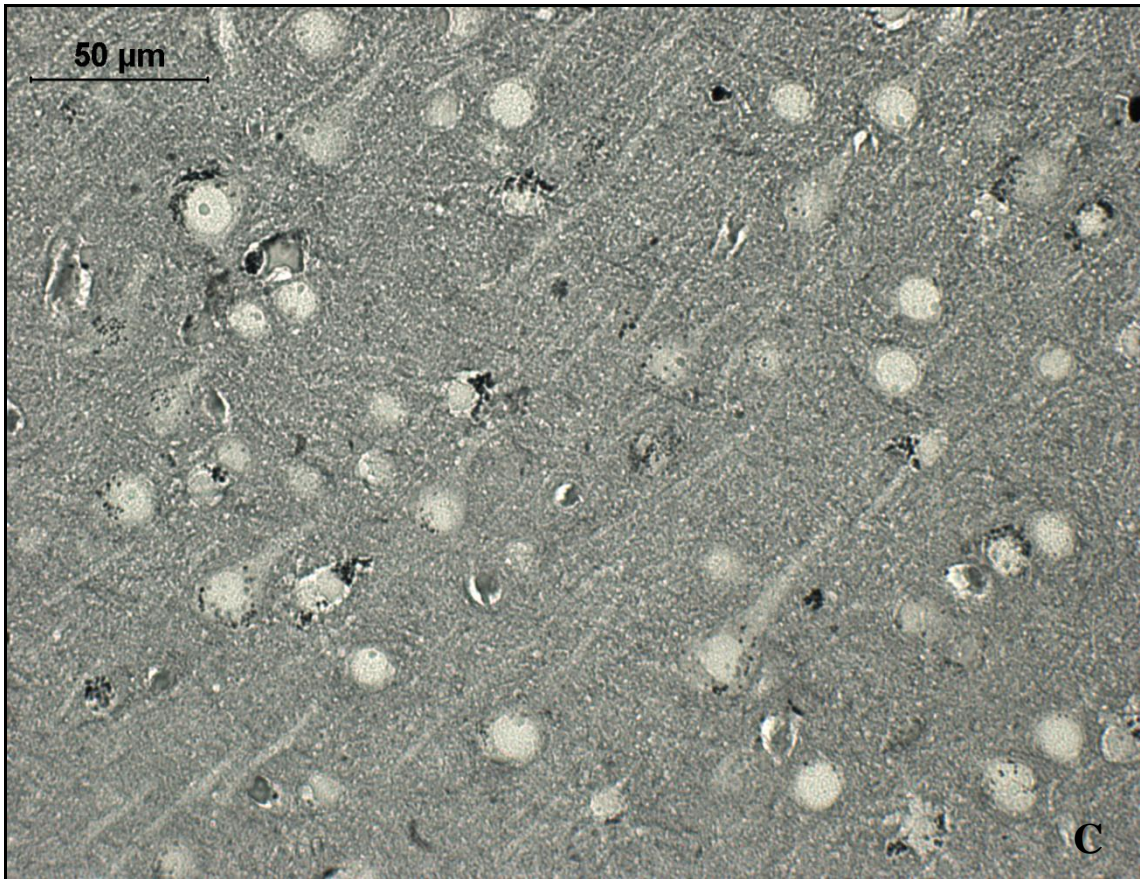


Figura 8. Amostras de córtex temporal humano dos diferentes grupos experimentais: **A.** Grupo 1 (20 a 28 anos). **B.** Grupo 2 (37 a 41 anos) e **C.** Grupo 3 (50 a 55 anos). Observa-se que os grânulos de lipofuscina (em preto) ocupam maior área no corpo neuronal de indivíduos de maior idade. A área analisada do corpo neuronal foi similar entre grupos. Coloração: *Sudan Black*.

5.1.2 Córtex temporal de ratos

A variável idade não influencia com a área dos grânulos de lipofuscina nos neurônios do córtex temporal [figura 9 A; H (3, n = 8) = 6,17, p = 0,10 : grupo 1 (0,03 ± 0,004), grupo 2 (0,05 ± 0,028), grupo 3 (0,60 ± 0,235) e grupo 4 (0,96 ± 0,006)]. Não foram evidenciadas diferenças na área do soma dos neurônios analisados [figura 9 B; H (3, n = 8) = 6,17, p > 0,05: grupo 1 (222,27 ± 9,64), grupo 2 (319,18 ± 14,13), grupo 3 (210,98 ± 15,05) e grupo 4 (261,61 ± 29,08)].

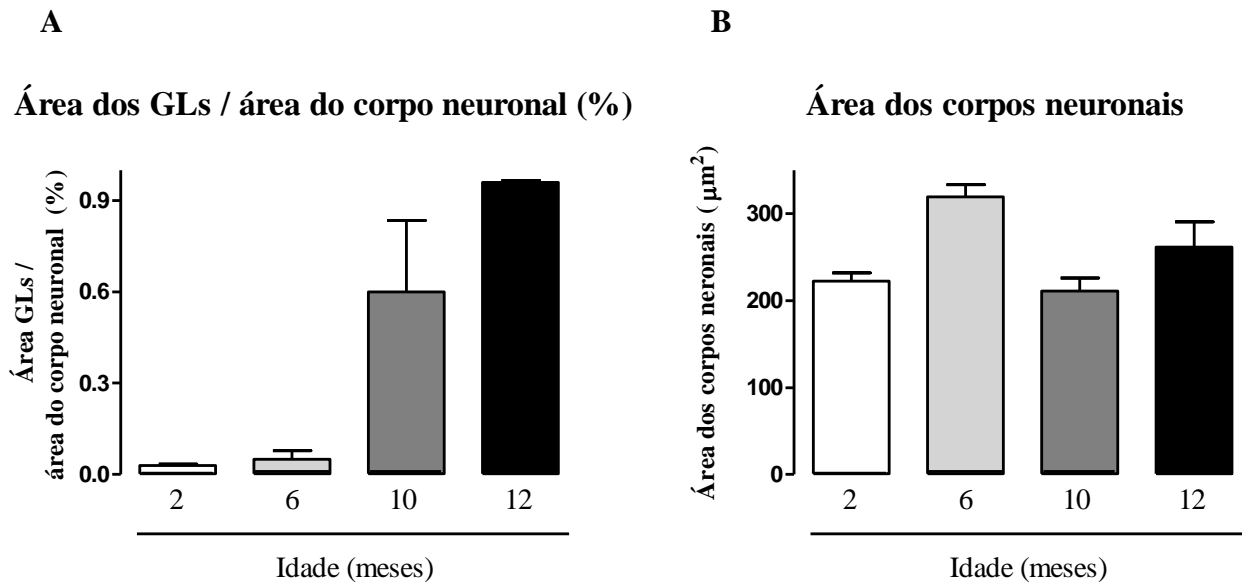


Figura 9. **A.** Porcentagem de grânulos de lipofuscina em relação à área do corpo neuronal. **B.** Área do corpo neuronal (μm^2) em indivíduos dos grupos 1, 2, 3 e 4.

5.2 Análise dos grânulos de lipofuscina por microscopia eletrônica

Analisando a estrutura dos grânulos de lipofuscina visualizam-se as porções elétrons lúcida e densa claramente delimitadas por uma membrana única (figura 10). Geralmente visualiza-se uma porção elétron densa mais central e uma ou mais porções elétrons lúcidas periféricas. Outro dado interessante é que neurônios com aspecto apoptótico apresentam numerosos grânulos de lipofuscina no seu interior (figura 11).

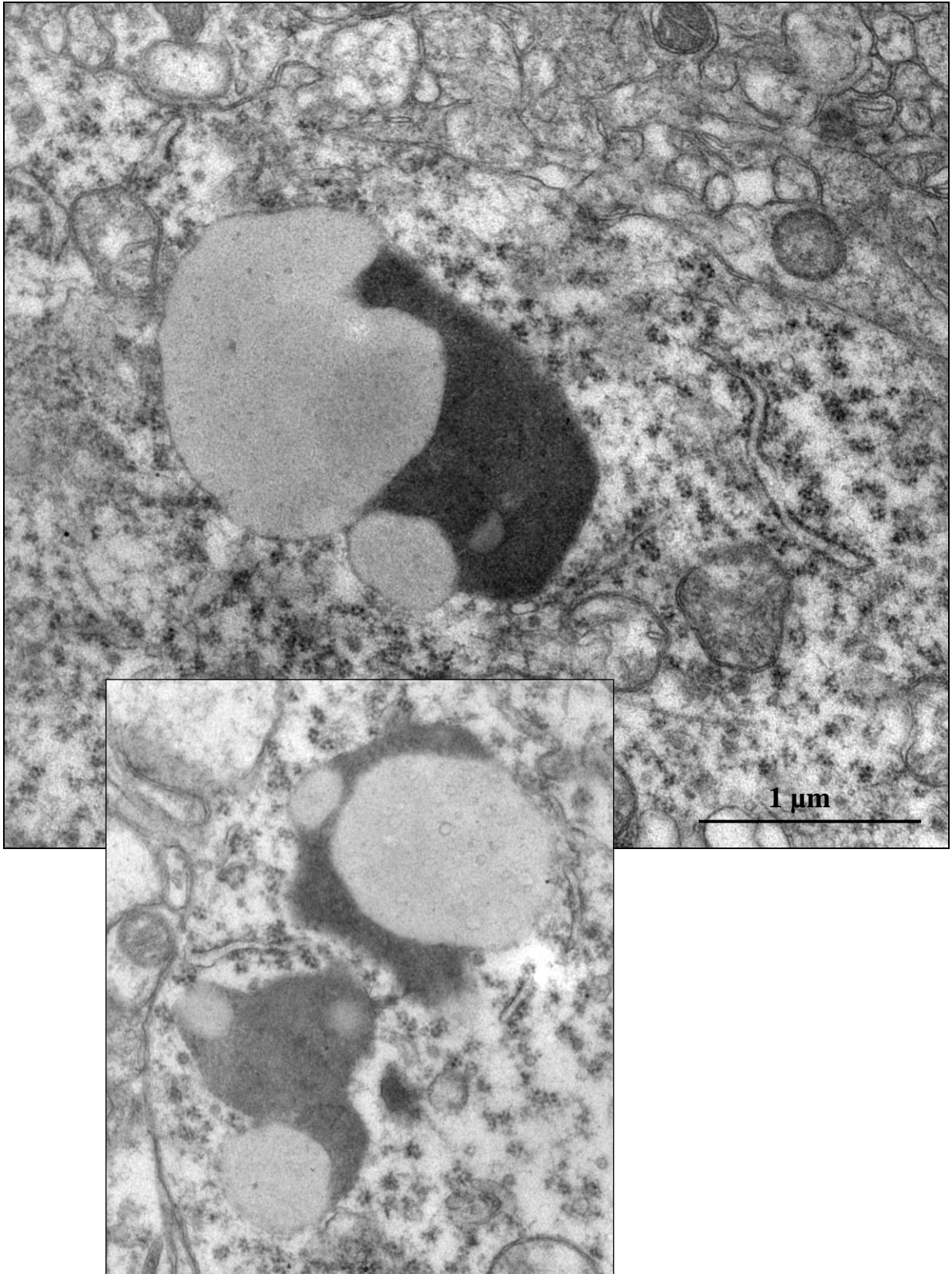


Figura 10. Observar membrana única das porções elétron lúcida e elétron densa de um grânulo de lipofuscina. Amostra de córtex temporal humano.

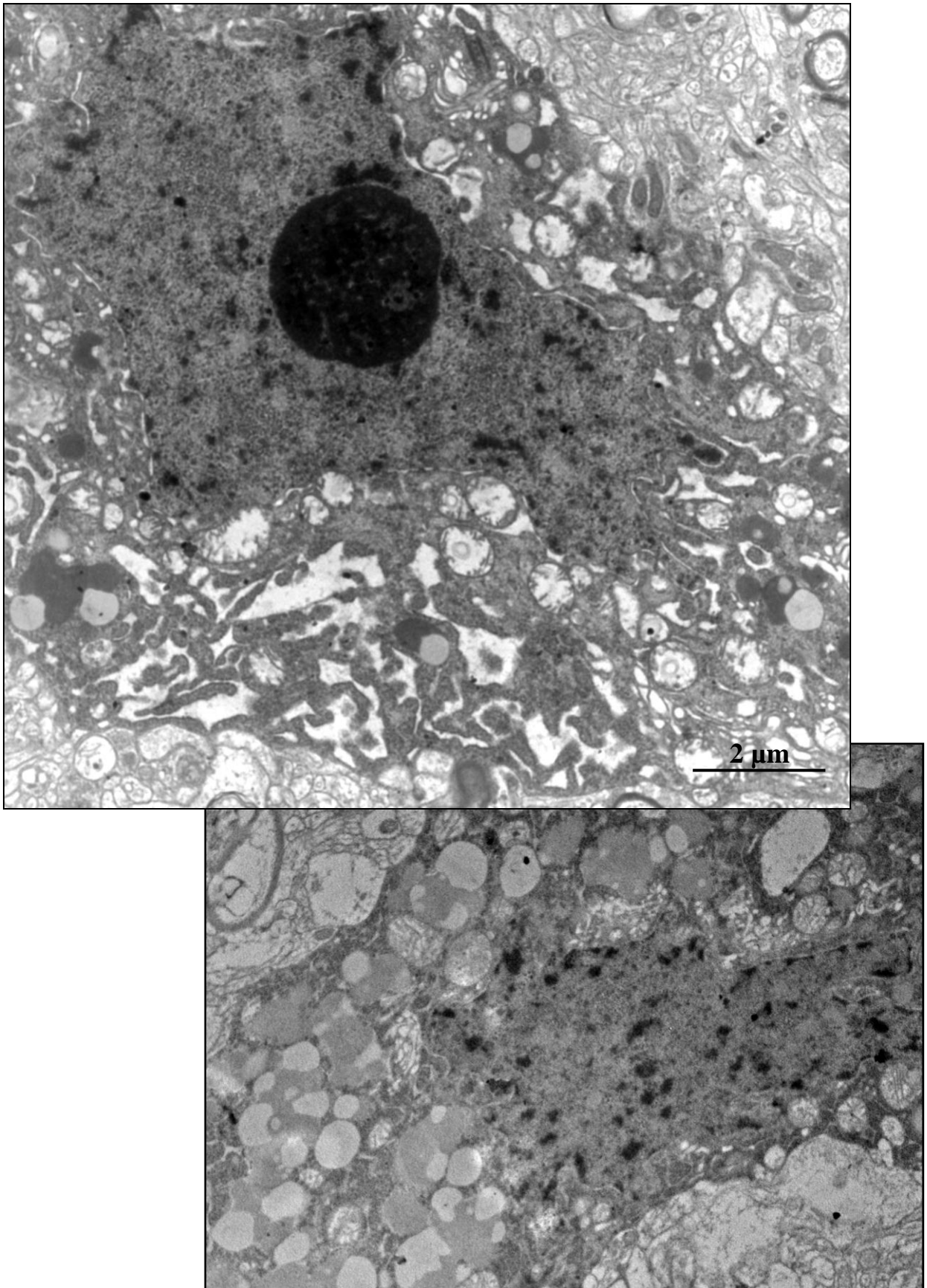


Figura 11. Grânulos de lipofuscina no interior de neurônio com aspecto apoptótico. Amostra de córtex temporal humano.

5.2.1 Córtex temporal humano

Conforme ilustrado no gráfico abaixo (figura 12), verificou-se que a variável idade influencia a área dos grânulos de lipofucsina nos neurônios do córtex temporal. A análise de múltiplas comparações mostrou que a razão entre a área dos grânulos e a área do citoplasma neuronal foi maior nas amostras do grupo 3 que nas amostras do grupo experimental 1 [figura 12A; $H(2, n = 14) = 8,54, p = 0,01$: grupo 1 ($3,13 \pm 0,68$), grupo 2 ($4,88 \pm 1,63$) e grupo 3 ($7,60 \pm 2,19$)]. A razão entre a área dos grânulos e a área do corpo neuronal foi maior nas amostras do grupo 3 que nas amostras do grupo experimental 1 [figura 12 B; $H(2, n = 14) = 10,05, p < 0,01$: grupo 1 ($1,80 \pm 0,53$), grupo 2 ($2,75 \pm 0,75$) e grupo 3 ($4,79 \pm 1,63$)].

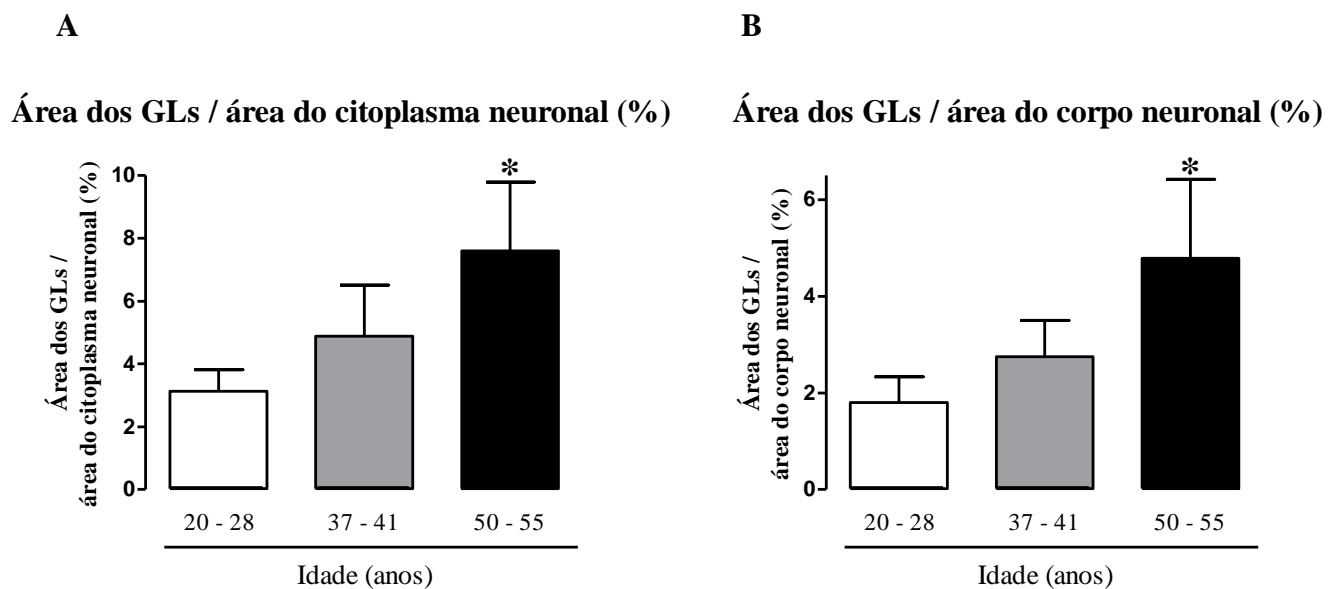


Figura 12. Porcentagem de grânulos de lipofucsina em relação à área do citoplasma neuronal (A) e em relação à área do corpo neuronal (B) em indivíduos dos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo 1 (20 a 28 anos).

Conforme ilustrado no gráfico abaixo, verificou-se que o número de grânulos de lipofucsina nos neurônios do córtex temporal foi idêntico nos diversos grupos experimentais [figura 13 A; H (2, n = 14) = 3,26, $p > 0,05$: grupo 1 ($7,81 \pm 2,32$), grupo 2 ($7,89 \pm 1,57$) e grupo 3 ($9,91 \pm 1,74$)]. Por outro lado, o número de porções lipídicas por neurônio foi maior nas amostras do grupo 3 que nas amostras do grupo experimental 1 [figura 13 B; H (2, n = 14) = 8,09, $p < 0,05$: grupo 1 ($4,33 \pm 0,91$), grupo 2 ($5,82 \pm 2,48$) e grupo 3 ($11,25 \pm 5,25$)].

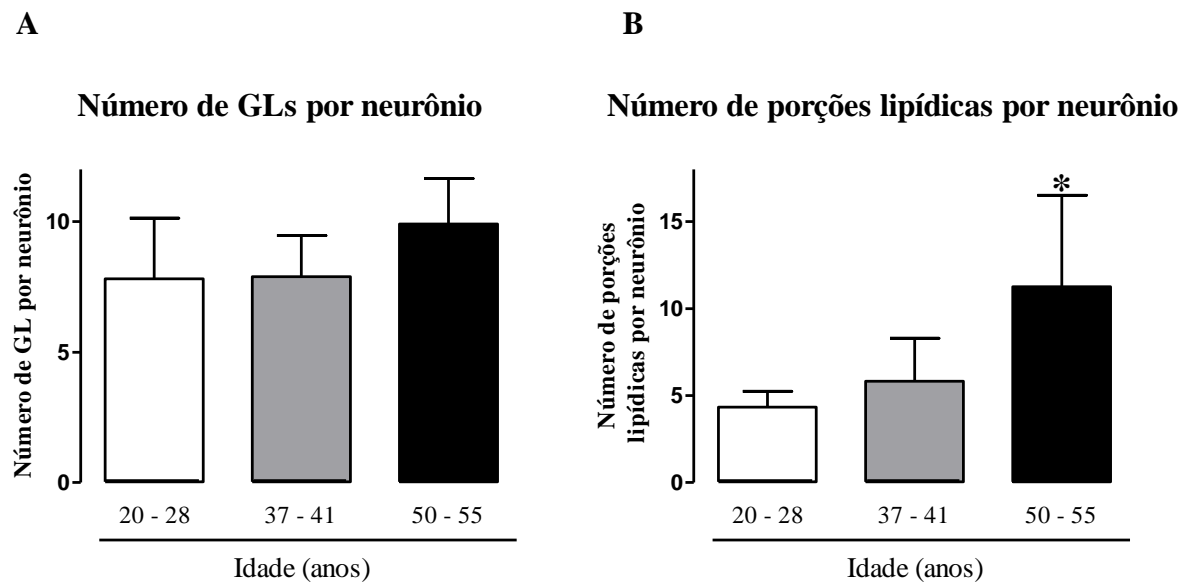


Figura 13. **A.** Número de grânulos de lipofucsina por neurônio. **B.** Número de porções lipídicas por neurônio em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3. * $p < 0,05$ em relação ao grupo 1 (20 a 28 anos).

A área analisada dos neurônios não diferiu entre os grupos experimentais [figura 14; H (2, n = 14) = 1,65, $p > 0,05$: grupo 1 ($109,44 \pm 20,75$), grupo 2 ($110,07 \pm 21,83$) e grupo 3 ($128,24 \pm 24,60$)].

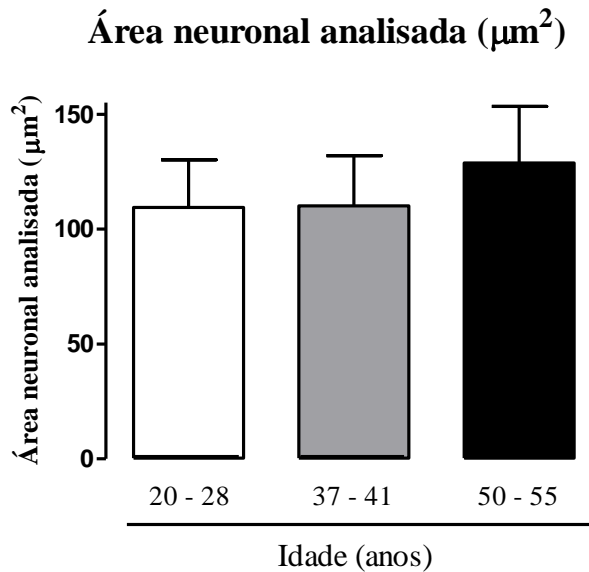


Figura 14. Área neuronal analisada em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3.

Analisando os grânulos de lipofucsina em microscopia eletrônica (figuras 16 e 17), observou-se que a porcentagem das frações elétron densa (protéica) e elétron lúcida (lipídica) em relação à área total dos grânulos foi diferente apenas entre os grupos experimentais 1 e 3 (figura 15). A porção protéica foi menor no grupo de indivíduos de maior idade [H (2, n = 14) = 6,35, $p < 0,05$: grupo 1 ($81,10 \pm 5,85$), grupo 2 ($75,36 \pm 4,32$) e grupo 3 ($64,65 \pm 10,15$)]. De maneira oposta, observa-se no gráfico abaixo, que a porcentagem de fração lipídica foi menor nos indivíduos de menor idade [H (2, n = 14) = 6,35, $p < 0,05$: grupo 1 ($18,90 \pm 5,85$), grupo 2 ($24,64 \pm 4,32$) e grupo 3 ($35,35 \pm 10,15$)].

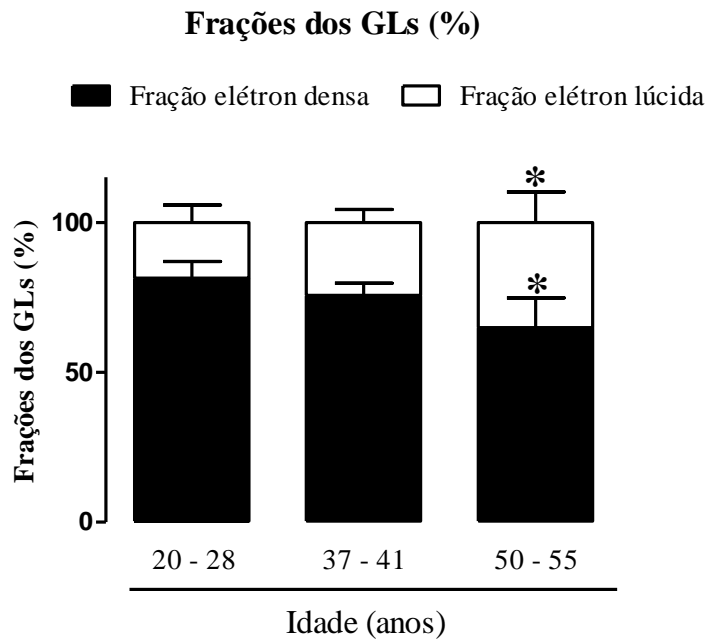


Figura 15. Porcentagem da área da porção elétron densa (protéica) e porcentagem da área da porção elétron lúcida (lipídica) dos grânulos de lipofuscina nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo 1 (20 a 28 anos).

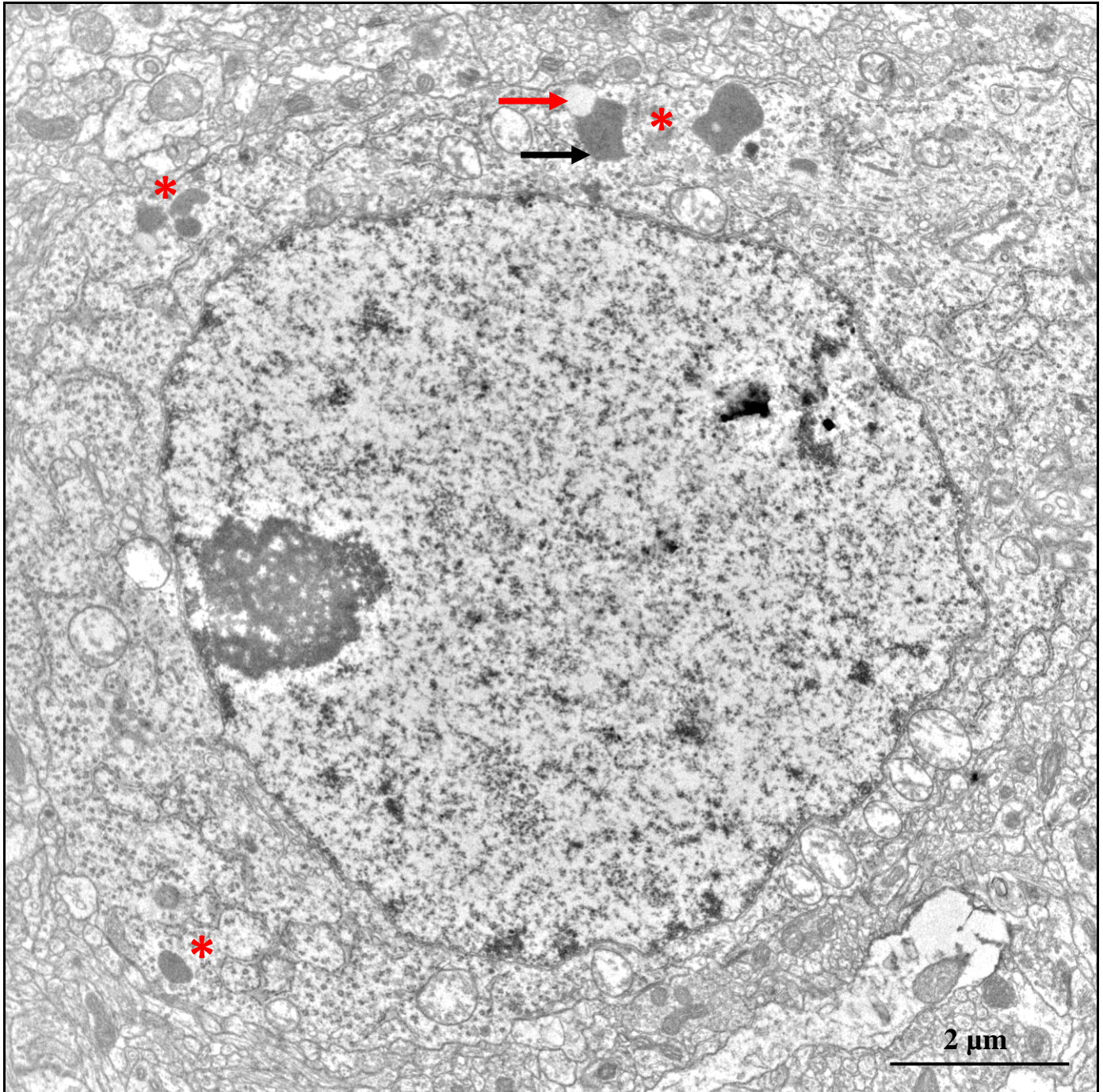


Figura 16. Grânulos de lipofuscina (próximos aos asteriscos). Porção elétron lúcida (seta vermelha) e porção elétron densa (seta preta) de um grânulo de lipofuscina. Córtex cerebral humano do grupo 1 (20 a 28 anos).

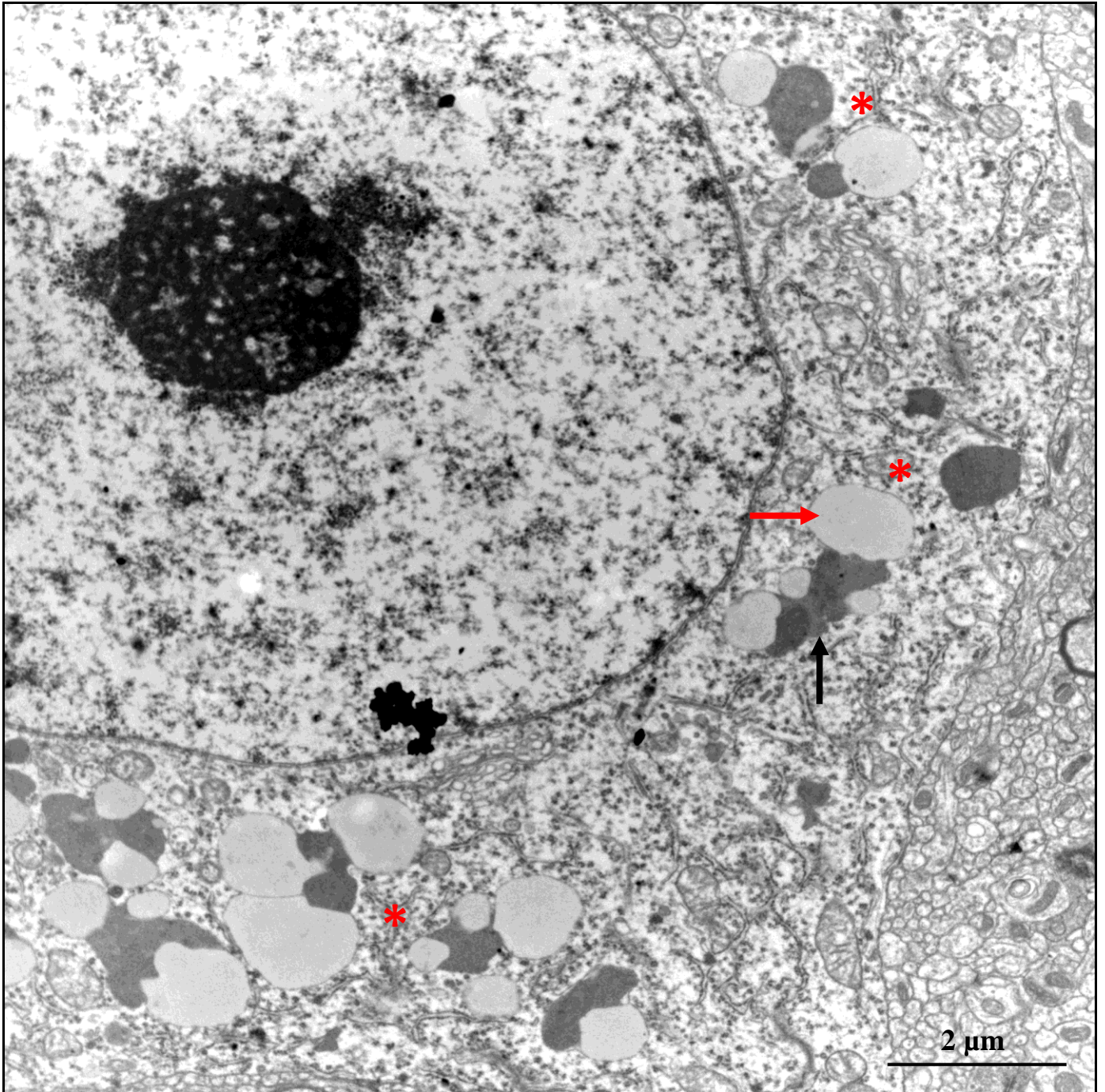


Figura 17. Grânulos de lipofuscina (próximos aos asteriscos). Porção elétron lúcida (seta vermelha) e porção elétron densa (seta preta) de um grânulo de lipofuscina. Amostra de córtex cerebral humano do grupo 3 (50 a 55 anos). Pode-se observar que a porção elétron lúcida dos grânulos de lipofuscina nesta amostra é maior que na amostra da figura 15. Por outro lado, não há diferenças em relação ao número de grânulos entre as duas amostras.

5.2.2. Córtex temporal de ratos

Não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos experimentais nas variáveis listadas a seguir: razão entre a área dos grânulos de lipofucsina e a área do citoplasma [figura 18 A; $H(3, n = 8) = 4,00, p > 0,05$: grupo 1 ($0,75 \pm 0,35$), grupo 2 ($1,52 \pm 0,22$), grupo 3 ($1,84 \pm 1,00$) e grupo 4 ($1,51 \pm 0,16$)]; razão entre a área dos grânulos e a área do soma [figura 18 B; $H(3, n = 8) = 4,00, p > 0,05$: grupo 1 ($0,41 \pm 0,17$), grupo 2 ($0,83 \pm 0,03$), grupo 3 ($0,94 \pm 0,47$) e grupo 4 ($0,85 \pm 0,09$)]; número de grânulos por neurônio [figura 19 A; $H(3, n = 8) = 4,22, p > 0,05$: grupo 1 ($4,00 \pm 1,84$), grupo 2 ($4,97 \pm 0,32$), grupo 3 ($4,20 \pm 0,92$) e grupo 4 ($5,40 \pm 0,00$)]; número de porções lipídicas por neurônio [figura 19 B; $H(3, n = 8) = 5,67, p = 0,10$: grupo 1 ($0,77 \pm 0,46$), grupo 2 ($1,22 \pm 0,32$), grupo 3 ($1,75 \pm 0,28$) e grupo 4 ($1,92 \pm 0,39$)]; e área dos neurônios analisados [figura 20; $H(3, n = 8) = 2,00, p > 0,05$: grupo 1 ($95,19 \pm 8,80$), grupo 2 ($90,65 \pm 7,43$), grupo 3 ($96,65 \pm 9,54$) e grupo 4 ($97,15 \pm 1,67$)]. Também não foram observadas diferenças estatísticas em relação à porção protéica [figura 20; $H(3, n = 8) = 6,00, p = 0,10$: grupo 1 ($96,86 \pm 0,56$), grupo 2 ($95,99 \pm 0,09$), grupo 3 ($92,45 \pm 1,59$) e grupo 4 ($93,18 \pm 0,18$)] e lipídica [figura 20; $H(3, n = 8) = 6,00, p = 0,10$: grupo 1 ($3,14 \pm 0,56$), grupo 2 ($4,01 \pm 0,09$), grupo 3 ($7,55 \pm 1,59$) e grupo 4 ($6,82 \pm 0,18$)].

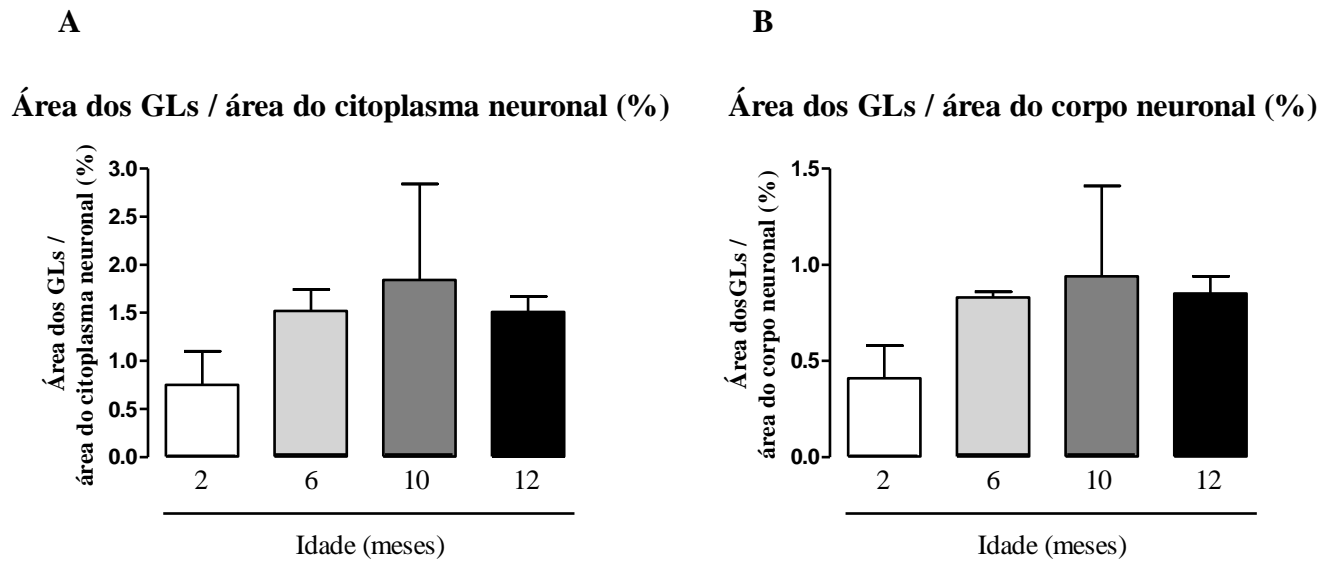


Figura 18. Porcentagem de grânulos de lipofuscina em relação à área do citoplasma (**A**) e em relação à área do corpo neuronal (**B**) em ratos de 2, 6, 10 e 12 meses.

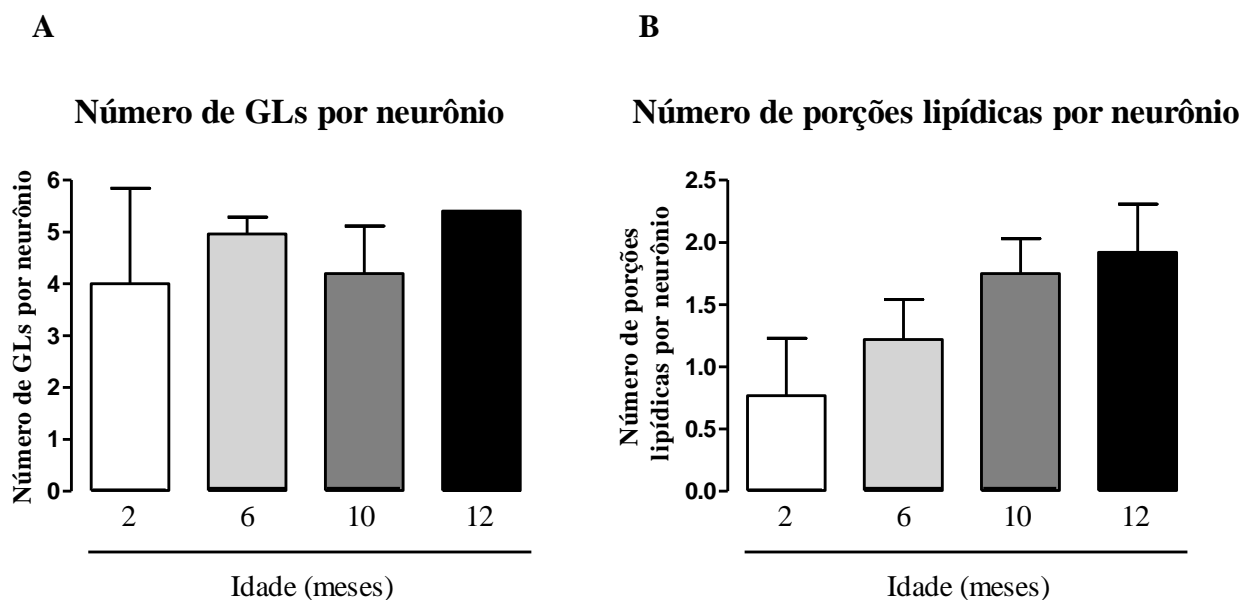


Figura 19. Número de grânulos de lipofuscina por neurônio (**A**) e número de porções lipídicas por neurônio (**B**) em ratos de 2, 6, 10 e 12 meses.

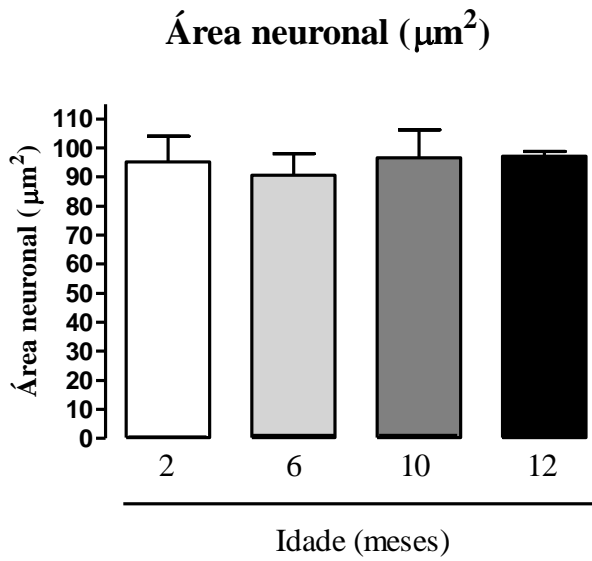


Figura 20. Área neuronal (μm^2) em amostras de ratos de 2, 6, 10 e 12 meses.

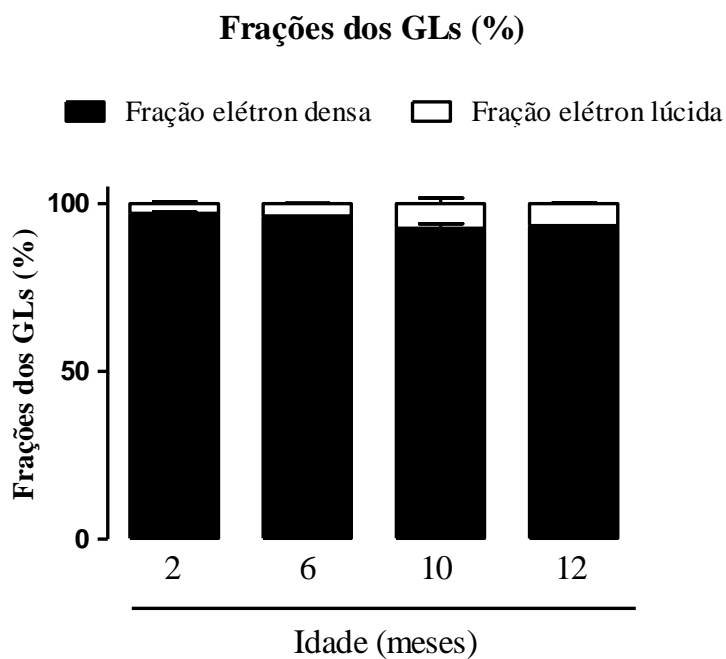


Figura 21. Porcentagem da área da porção elétron densa e da porção elétron lúcida do grânulo de lipofuscina em ratos de diferentes idades.

5.2.3 Reconstrução tridimensional dos grânulos de lipofucsina por microscopia eletrônica

Os grânulos de lipofucsina foram reconstruídos tridimensionalmente com microscopia eletrônica (figura 22) para conferir o volume dos grânulos de lipofucsina na estrutura neuronal. Observa-se uma porção central elétron densa e duas porções, nas extremidades, elétron lúcidas. Podem-se visualizar algumas reentrâncias nos grânulos de lipofucsina. O grânulo reconstituído possui, aproximadamente, 15,20 micrômetros de comprimento (19 secções de 0,80 micrômetros).

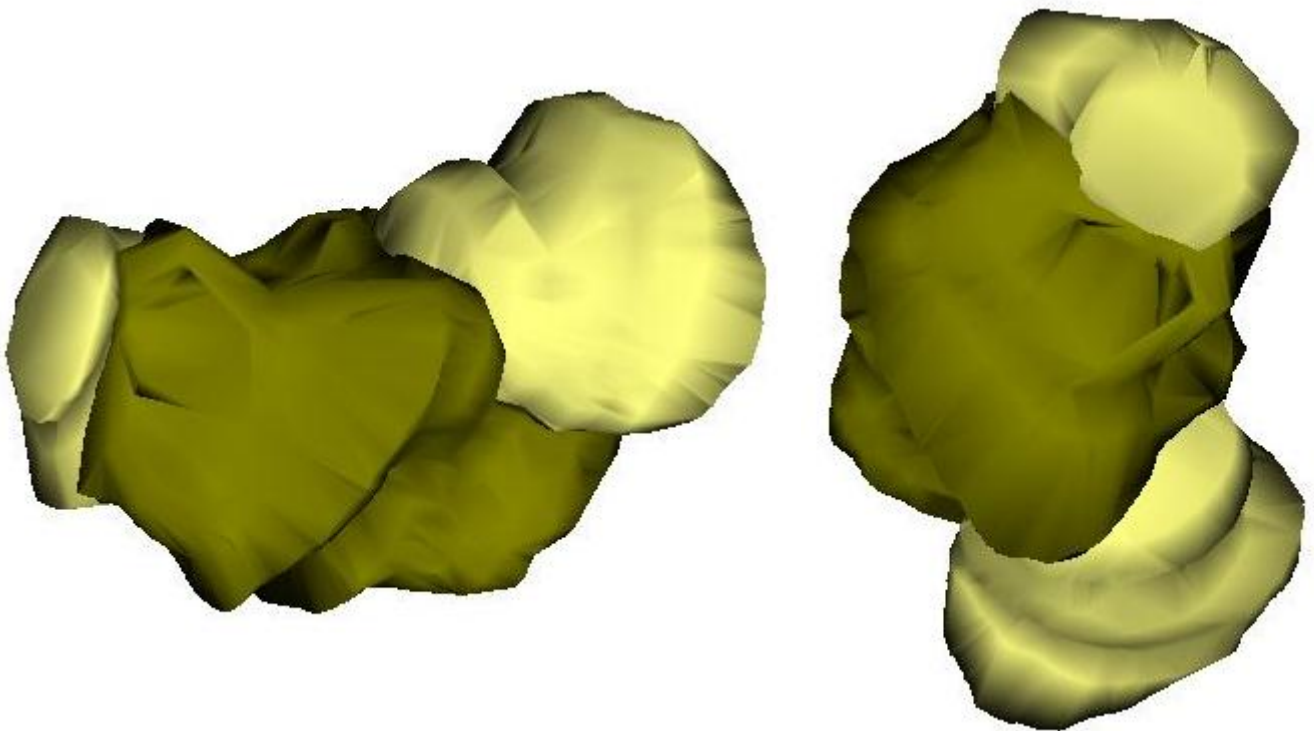


Figura 22. Reconstrução tridimensional de um grânulo de lipofucsina de córtex temporal humano do grupo 3 (reconstrução de 19 cortes seriados de 80 nm). Observar a porção elétron densa em verde e as porções elétron lúcidas em amarelo.

5.3 Análise dos grânulos de lipofucsina por microscopia confocal

Os grânulos de lipofucsina foram facilmente visualizados com microscopia confocal (laser de argônio: 488 – 620 nm) devido à autofluorescência dos mesmos (grânulos em vermelho), conforme ilustrado abaixo (figura 23). O núcleo das células foi marcado com DAPI (em azul, laser de argônio: 405 – 490 nm).

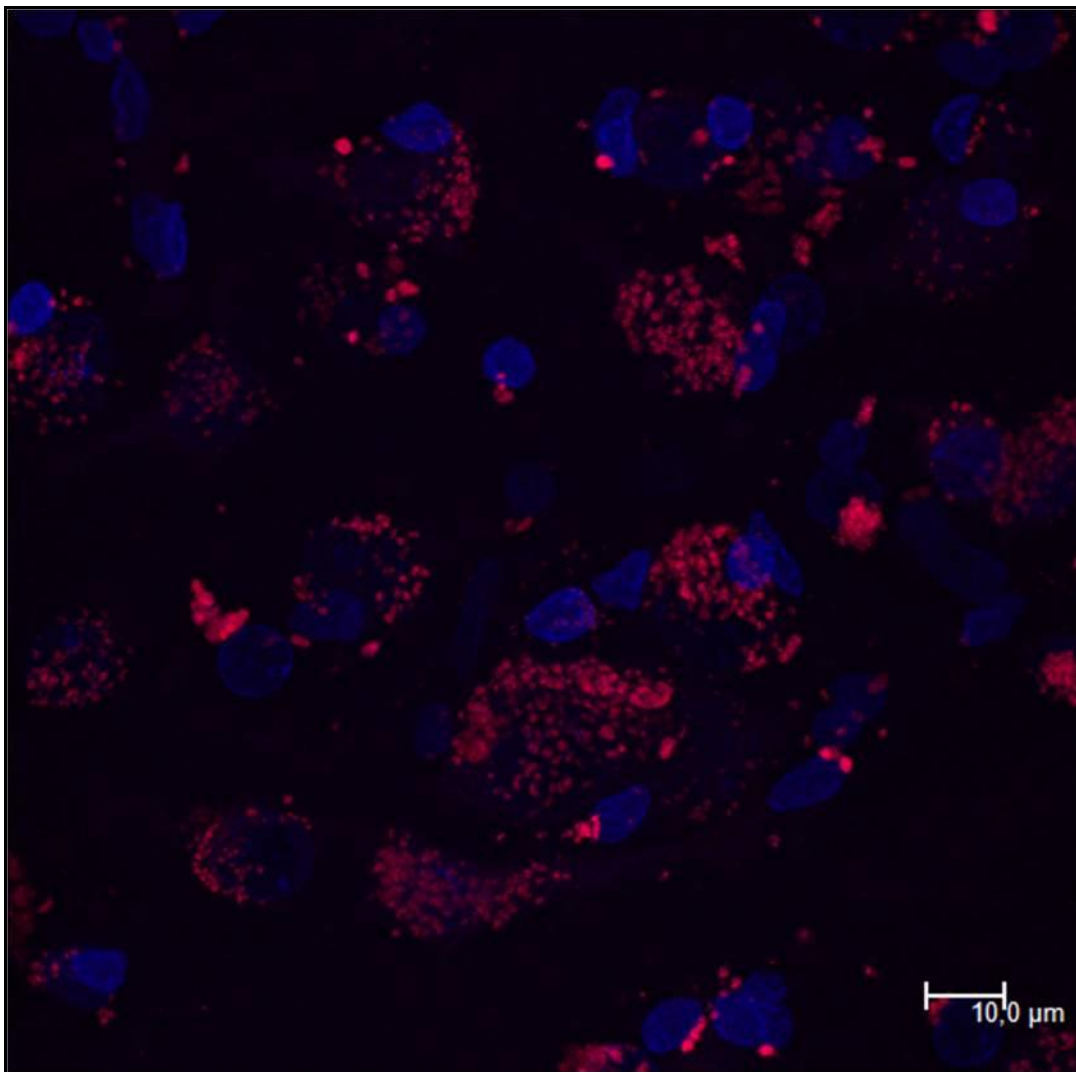


Figura 23. Grânulos autofluorescentes de lipofucsina (em vermelho) vistos através de microscopia confocal (laser de argônio: 488 – 620 nm). Núcleos corados com DAPI (em azul, laser de argônio: 405 – 490 nm). Reconstrução de 32 secções de 0,6 µm. Amostra de córtex cerebral humano do grupo 2 (37 a 41 anos).

5.4 Expressão de proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina

As figuras abaixo (figuras 24 e 26) ilustram que não foram evidenciadas diferenças estatísticas na expressão das proteínas **alfa-sinucleína** [H (2, n = 11) = 2,89, $p > 0,05$: grupo 1 ($1,63 \pm 0,24$), grupo 2 ($1,30 \pm 0,29$) e grupo 3 ($1,63 \pm 0,30$)] e **ubiquitina** [H (2, n = 10) = 4,38, $p = 0,10$: grupo 1 ($1,44 \pm 0,32$), grupo 2 ($1,81 \pm 0,37$) e grupo 3 ($2,46 \pm 0,85$)], técnica de “*western blot*”(figuras 25 e 27).

Intensidade da expressão de alfa-sinucleína

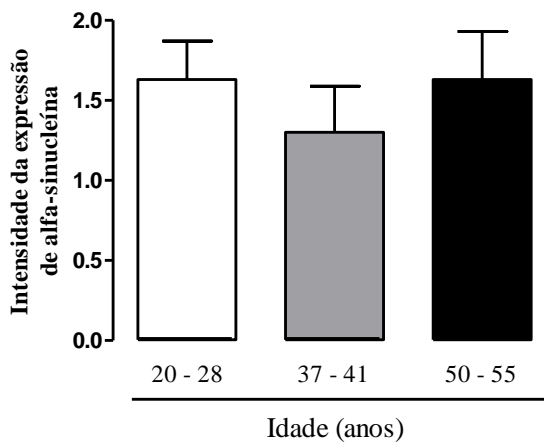


Figura 24. Intensidade da expressão de alfa-sinucleína nos diversos grupos experimentais.

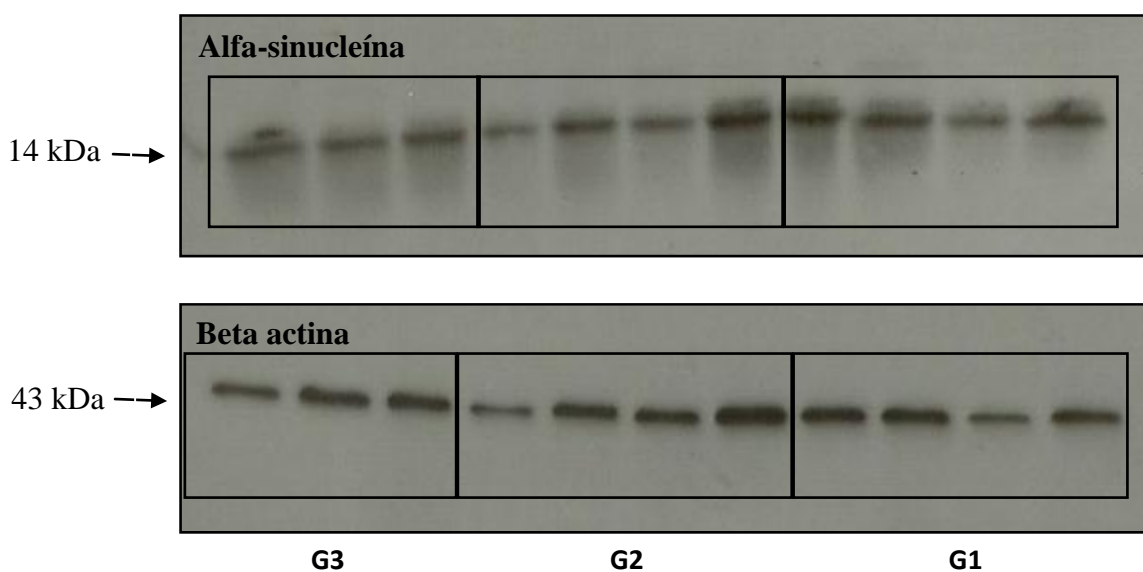


Figura 25. *Western blots* de alfa-sinucleína e beta actina (utilizada para equalizar a quantidade de proteínas das amostras) nos grupos experimentais 1, 2 e 3.

Intensidade da expressão de ubiquitina

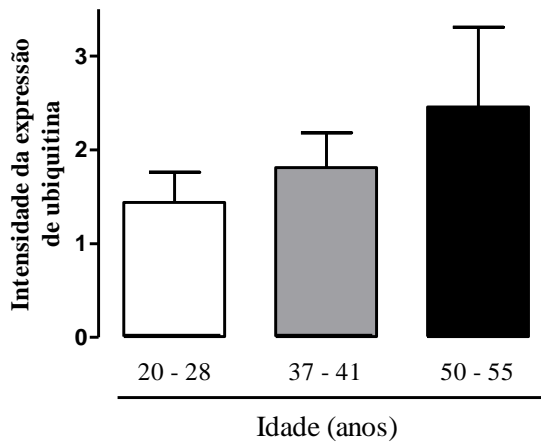


Figura 26. Intensidade da expressão de ubiquitina nos diversos grupos experimentais.

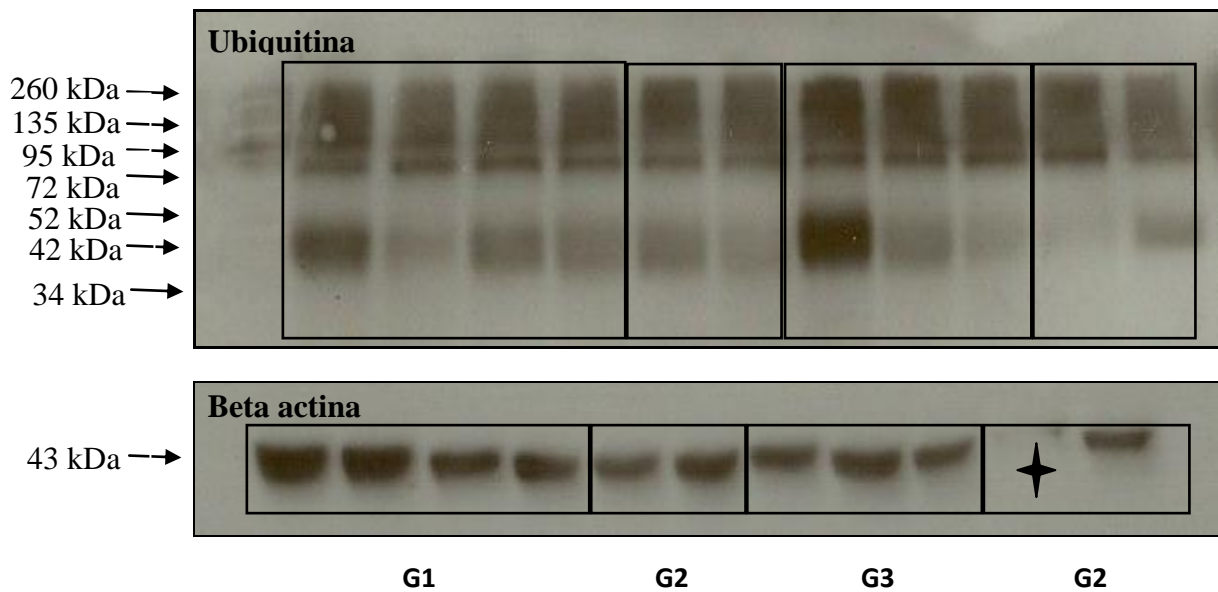


Figura 27. *Western blots* de ubiquitina e beta actina (utilizada para equalizar a quantidade de proteínas das amostras) nos grupos experimentais 1, 2 e 3.

5.5 Análise das sinapses

5.5.1 Córtex temporal humano

5.5.1.1 Sinapses excitatórias, inibitórias e elétricas

A análise das sinapses do córtex temporal humano, realizada com microscopia eletrônica, evidenciou que não houve diferenças estatísticas na razão entre o número de sinapses e a área total analisada [figura 28 A; H (2, n = 10) = 3,03, p > 0,05: grupo 1 (0,13 ± 0,01), grupo 2 (0,20 ± 0,08) e grupo 3 (0,15 ± 0,02)]; bem como na razão entre a área do terminal pré-sináptico e a área total analisada [figura 28 B; H (2, n = 10) = 1,18, p > 0,05: grupo 1 (0,03 ± 0,008), grupo 2 (0,02 ± 0,006) e grupo 3 (0,03 ± 0,005)]. Em relação à porcentagem de sinapses excitatórias, observou-se que as amostras do grupo 2 (meia idade) apresentaram menor porcentagem deste tipo de sinapse que o grupo 1 [figura 29 A; H (2, n = 10) = 8,02, p < 0,05: grupo 1 (92,42 ± 1,24), grupo 2 (79,38 ± 4,77) e grupo 3 (88,10 ± 1,47)]. As sinapses inibitórias não mostraram diferenças estatísticas entre os indivíduos dos diversos grupos experimentais [figura 29 B; H (2, n = 10) = 1,18, p > 0,05: grupo 1 (6,26 ± 0,65), grupo 2 (10,88 ± 1,70) e grupo 3 (8,56 ± 2,87)], assim como as sinapses elétricas [figura 30; H (2, n = 10) = 5,25, p = 0,07: grupo 1 (1,32 ± 1,53), grupo 2 (9,77 ± 4,77) e grupo 3 (3,34 ± 1,55)].

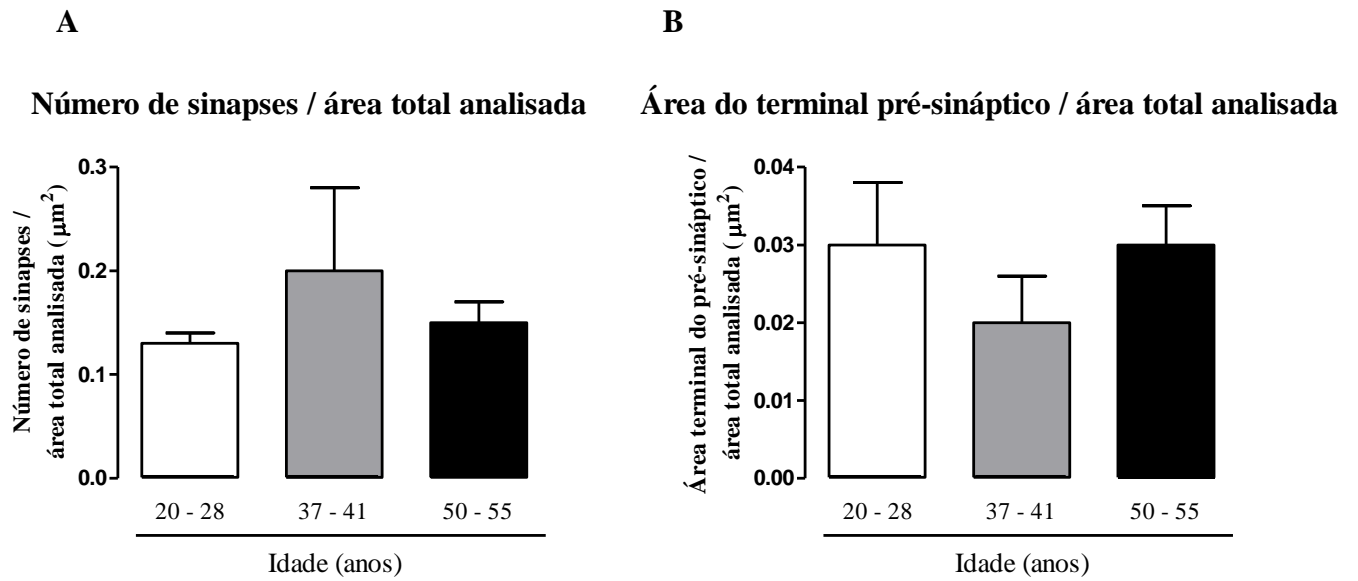


Figura 28. Número de sinapses (A) e área do terminal pré-sináptico (B) em relação à área total analisada (μm^2) em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3.

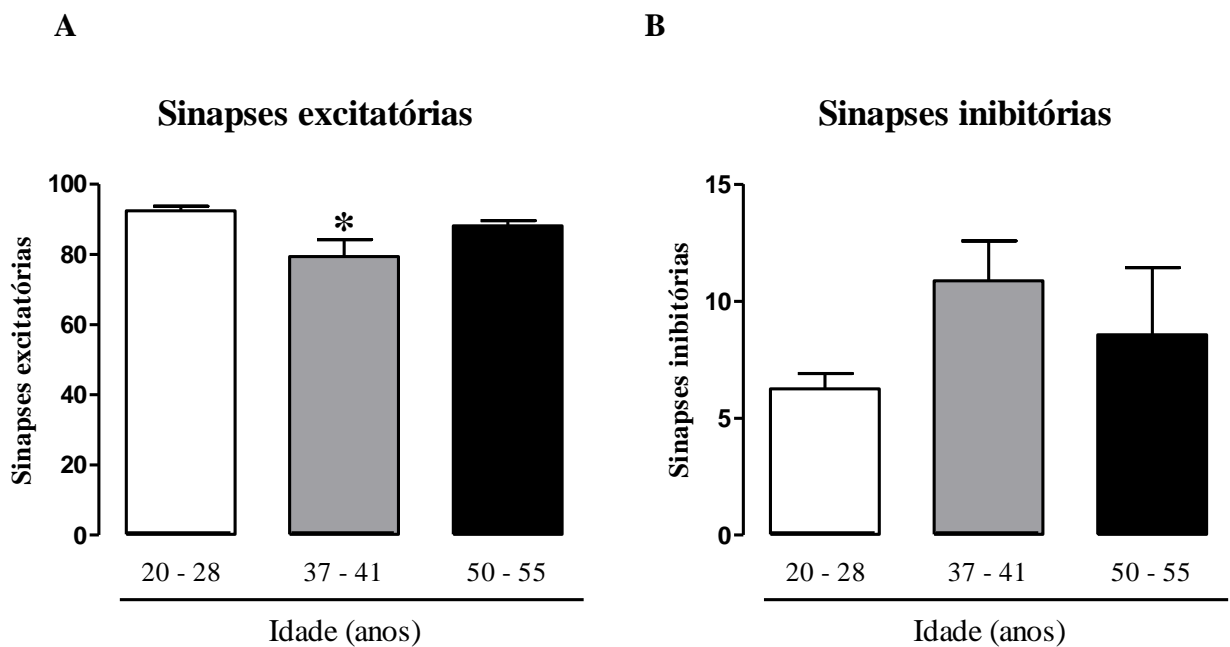


Figura 29. Porcentagem de sinapses excitatórias (A) e inibitórias (B) em indivíduos dos diversos grupos experimentais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo 1.

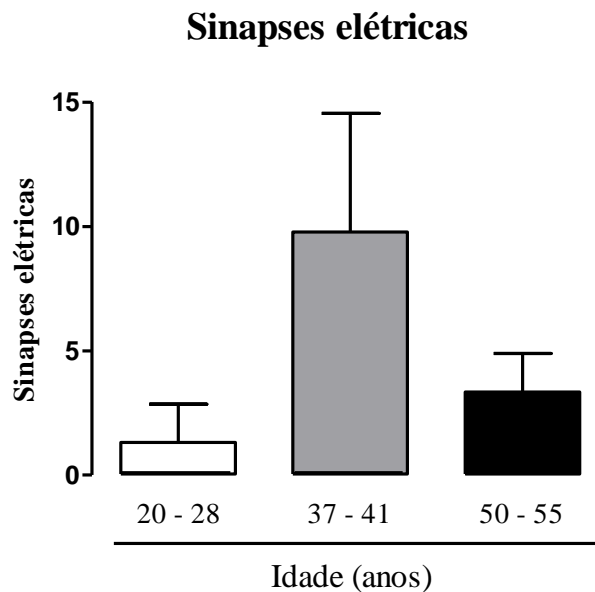


Figura 30. Porcentagem de sinapses elétricas em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3.

5.5.1.2 Local de contato pós-sináptico

Não foi observada diferença estatística na porcentagem de **sinapses excitatórias** ocorrendo em dendritos [figura 31 A; $H(2, n = 10) = 0,64, p > 0,05$: grupo 1 ($47,44 \pm 11,21$), grupo 2 ($42,43 \pm 12,94$) e grupo 3 ($43,16 \pm 9,54$)], espinhos dendríticos [figura 31 B; $H(2, n = 10) = 0,16, p > 0,05$: grupo 1 ($50,83 \pm 13,60$), grupo 2 ($54,64 \pm 14,17$) e grupo 3 ($51,00 \pm 8,47$)], axônio [figura 32 A; $H(2, n = 10) = 2,36, p > 0,05$: grupo 1 ($1,73 \pm 3,00$), grupo 2 ($2,44 \pm 2,25$) e grupo 3 ($5,19 \pm 3,13$)] e corpo celular [figura 32 B; $H(2, n = 10) = 0,96, p > 0,05$: grupo 1 ($0,00 \pm 0,00$), grupo 2 ($0,49 \pm 0,85$) e grupo 3 ($0,65 \pm 1,30$)]. De maneira similar, também não foram encontradas diferenças estatísticas na porcentagem de ocorrência de **sinapses inibitórias** em dendritos [figura 33 A; $H(2, n = 10) = 3,16, p > 0,05$: grupo 1 ($83,33 \pm 16,67$), grupo 2 ($57,58 \pm 18,12$) e grupo 3 ($73,13 \pm 10,10$)], espinhos dendríticos [figura 33 B; $H(2, n = 10) = 1,14, p > 0,05$: grupo 1 ($0,00 \pm 0,00$), grupo 2 ($4,17 \pm 7,22$) e grupo 3 ($2,08 \pm 4,16$)], axônio [figura 34 A; $H(2, n = 10) = 4,71, p = 0,10$: grupo 1 ($11,11 \pm$

9,62), grupo 2 ($38,26 \pm 11,38$) e grupo 3 ($19,24 \pm 13,15$)] e corpo celular [figura 34 B; $H(2, n = 10) = 0,03, p > 0,05$: grupo 1 ($5,56 \pm 9,62$), grupo 2 ($0,33 \pm 0,58$) e grupo 3 ($5,55 \pm 11,11$)].

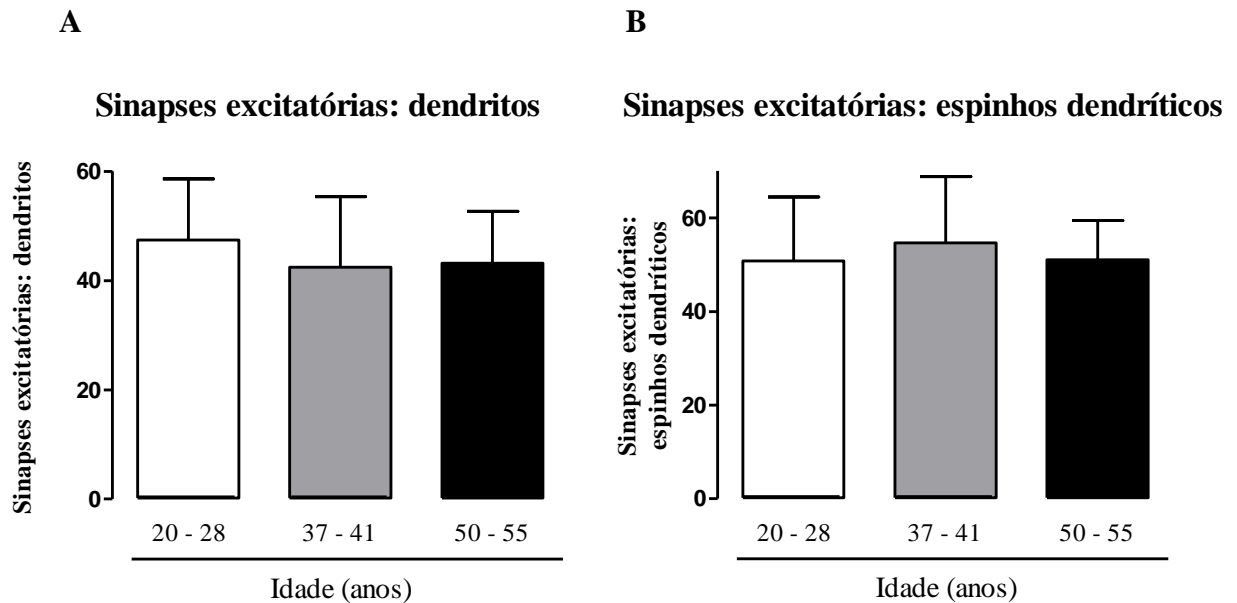


Figura 31. Porcentagem de sinapses excitatórias sobre dendritos (A) e espinhos dendríticos (B) em indivíduos dos diversos grupos experimentais.

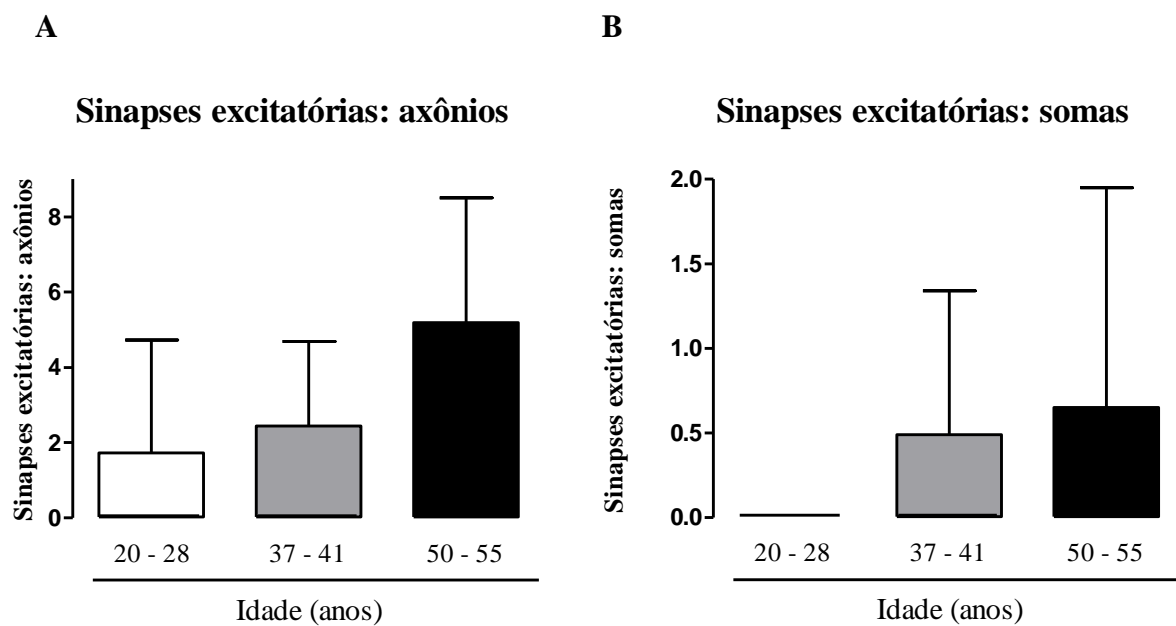


Figura 32. Porcentagem de sinapses excitatórias sobre axônios (A) e somas (B) em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3.

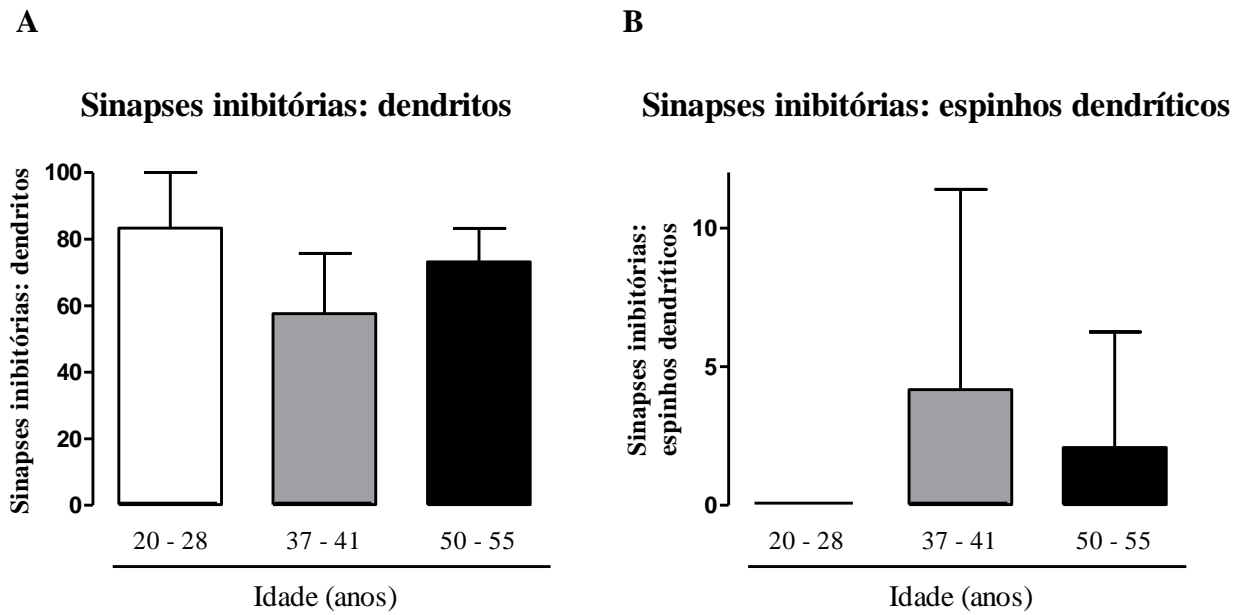


Figura 33. Porcentagem de sinapses inibitórias sobre dendritos (**A**) e espinhos dendríticos (**B**) dos diversos grupos experimentais.

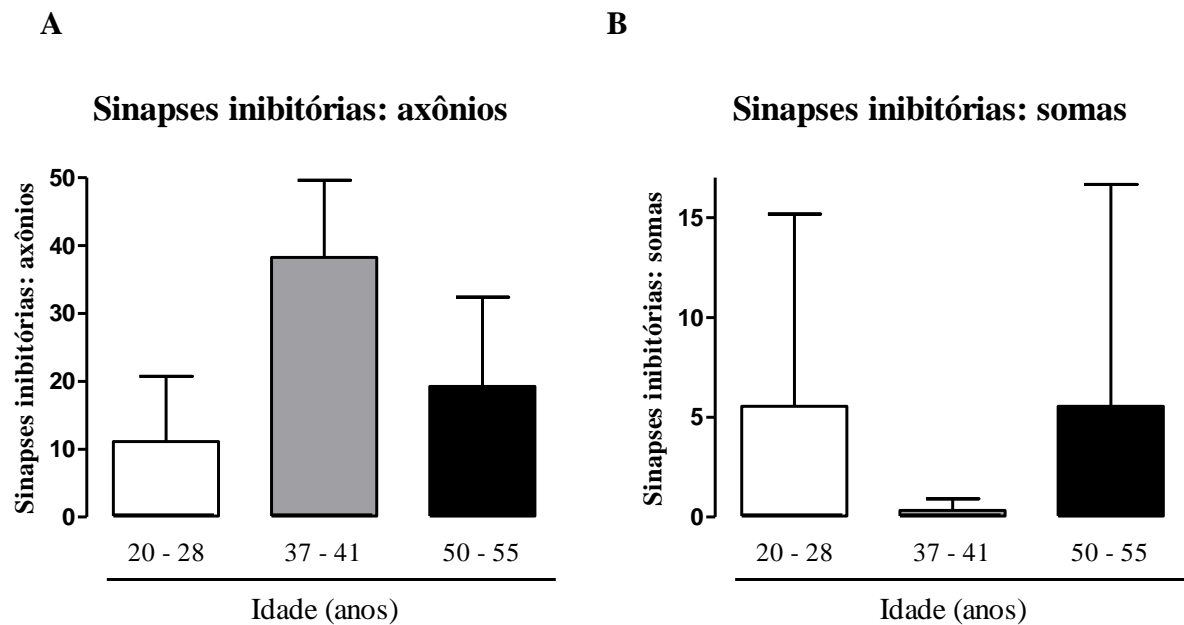


Figura 34. Porcentagem de sinapses inibitórias sobre axônios (**A**) e somas (**B**) em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3.

5.5.1.3 Morfologia das vesículas sinápticas

Não foi observada diferença estatística entre a porcentagem de vesículas elétron lúcidas redondas tanto de sinapses **excitatórias** [figura 35 A; $H(2, n = 10) = 5,79, p > 0,05$: grupo 1 ($97,67 \pm 1,15$), grupo 2 ($94,33 \pm 2,08$) e grupo 3 ($96,50 \pm 1,00$)] quanto de sinapses **inibitórias** [(figura 35 B; $H(2, n = 10) = 2,42, p > 0,05$: grupo 1 ($72,67 \pm 1,15$), grupo 2 ($73,67 \pm 3,51$) e grupo 3 ($68,75 \pm 4,99$)].

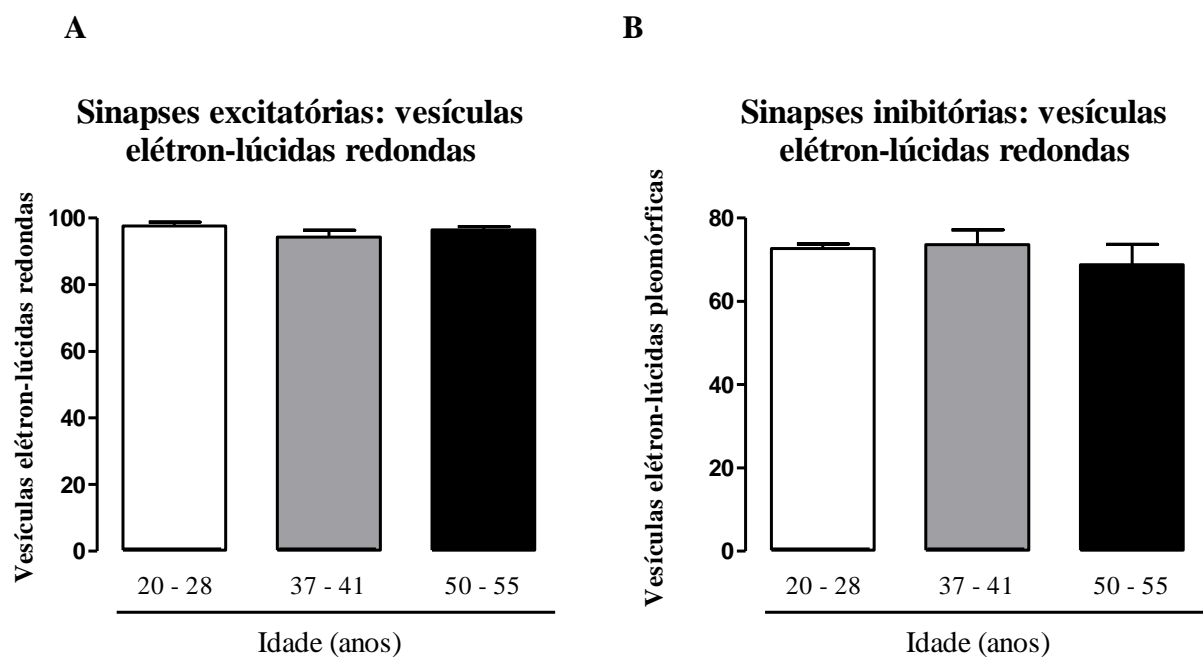


Figura 35. Porcentagem de vesículas elétron lúcidas redondas em sinapses excitatórias (**A**) e inibitórias (**B**) em indivíduos dos diversos grupos experimentais.

Conforme ilustrado nos gráficos a seguir (figuras 36 a 39), observou-se, nas sinapses **excitatórias**, que as seguintes variáveis não diferiram entre os grupos experimentais: razão entre o número de vesículas elétron lúcidas e a área do terminal pré-sináptico [figura 36 A; $H(2, n = 10) = 0,89, p > 0,05$: grupo 1 ($180,09 \pm 108,40$), grupo 2 ($256,34 \pm 12,42$) e grupo 3 ($215,44 \pm 61,13$)]; razão entre o número de vesículas elétron densas e a área do terminal pré-sináptico [figura 36 B; $H(2, n = 10) = 0,20, p > 0,05$: grupo 1 ($0,61 \pm 0,45$), grupo 2 ($0,38 \pm$

0,03) e grupo 3 ($0,75 \pm 0,53$); razão entre o número de vesículas elétron lúcidas redondas e a área do terminal pré-sináptico [figura 37 A; $H(2, n = 10) = 0,89, p > 0,05$: grupo 1 ($175,73 \pm 104,29$), grupo 2 ($242,26 \pm 16,45$) e grupo 3 ($208,77 \pm 58,72$)]; razão entre o número de vesículas elétron-lúcidas pleomórficas e a área do terminal pré-sináptico [figura 37 B; $H(2, n = 10) = 5,44, p > 0,05$: grupo 1 ($4,37 \pm 4,20$), grupo 2 ($14,08 \pm 4,14$) e grupo 3 ($6,67 \pm 3,25$)]; razão entre o número de vesículas elétron densas pequenas e a área do terminal pré-sináptico [figura 38 A; $H(2, n = 10) = 2,09, p > 0,05$: grupo 1 ($0,16 \pm 0,11$), grupo 2 ($0,12 \pm 0,08$) e grupo 3 ($0,28 \pm 0,29$)]; razão entre o número de vesículas elétron densas grandes e a área do terminal pré-sináptico [figura 38 B; $H(2, n = 10) = 0,12, p > 0,05$: grupo 1 ($0,45 \pm 0,46$), grupo 2 ($0,25 \pm 0,09$) e grupo 3 ($0,46 \pm 0,41$)]; razão entre o número de vesículas ancoradas e fusionadas e a área do terminal pré-sináptico [figura 39 A; $H(2, n = 10) = 1,80, p > 0,05$: grupo 1 ($11,65 \pm 6,65$), grupo 2 ($12,36 \pm 4,87$) e grupo 3 ($7,58 \pm 2,61$)]; razão entre o número de vesículas revestidas de clatrina e a área do terminal pré-sináptico [figura 39 B; $H(2, n = 10) = 1,65, p > 0,05$: grupo 1 ($1,88 \pm 1,52$), grupo 2 ($1,69 \pm 1,10$) e grupo 3 ($3,57 \pm 3,00$)].

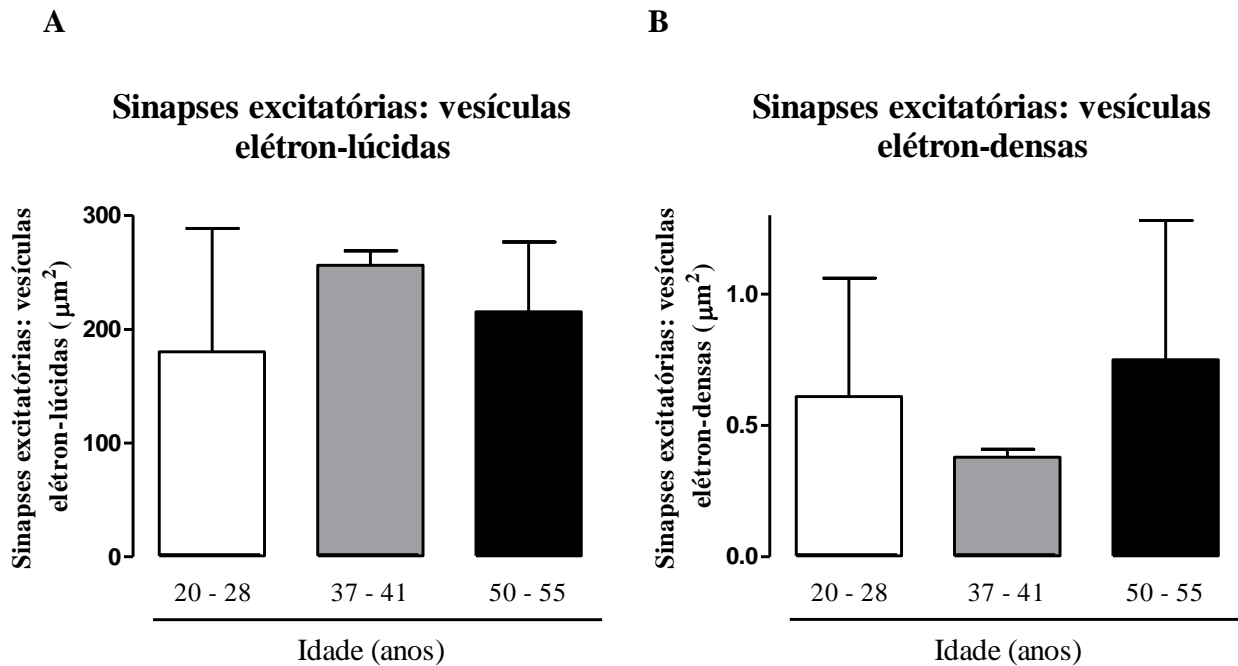


Figura 36. Número de vesículas elétron lúcidas (A) e elétron densas (B) em relação à área do terminal pré-sináptico (μm^2) em sinapses excitatórias em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3.

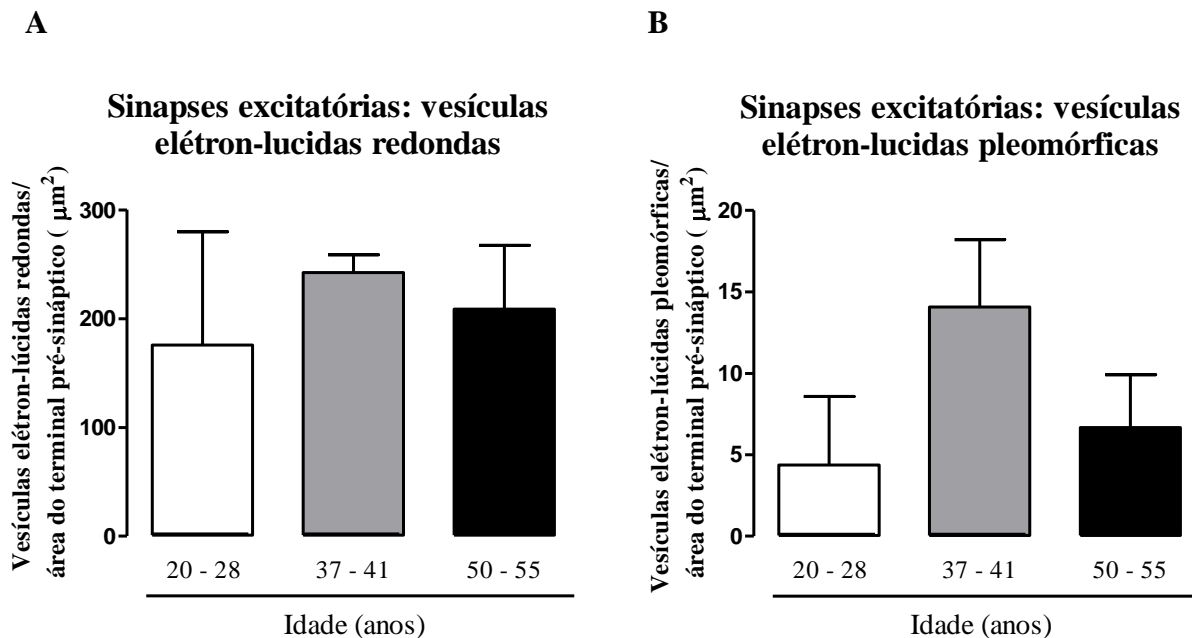


Figura 37. Número de vesículas elétron lúcidas redondas (A) e pleomórficas (B) em relação à área do terminal pré-sináptico (μm^2) em sinapses excitatórias dos diversos grupos experimentais.

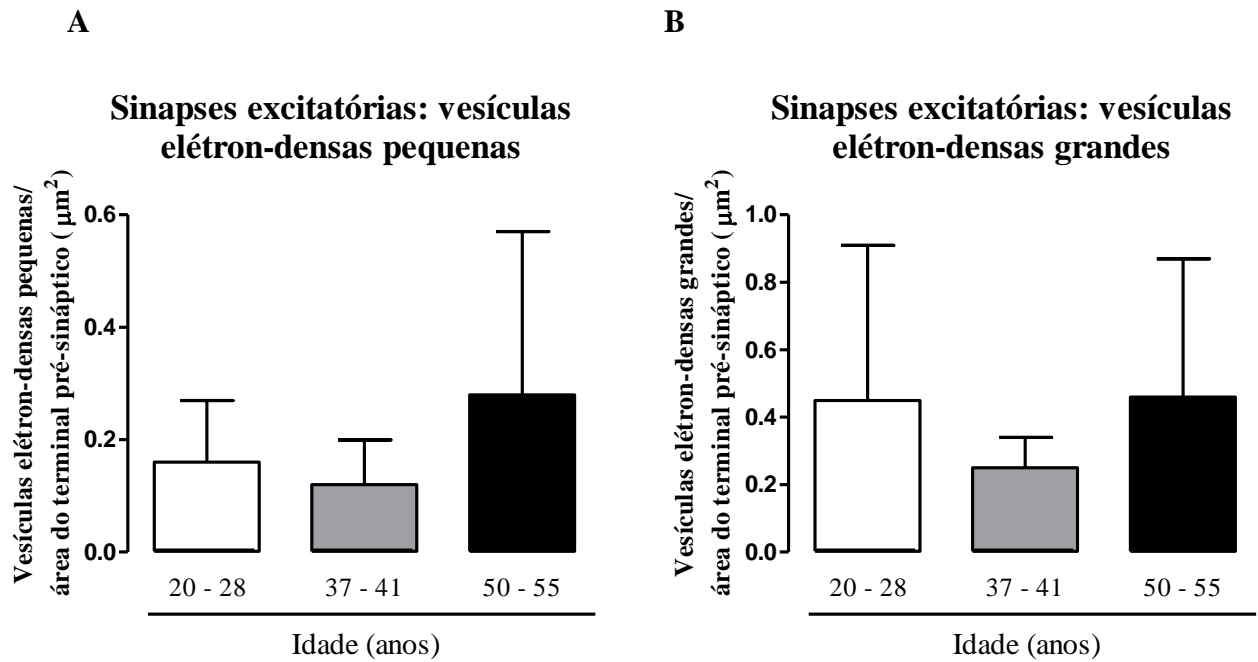


Figura 38. Número de vesículas elétron densas pequenas (**A**) e grandes (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico (μm^2) em sinapses excitatórias em indivíduos dos grupos 1, 2 e 3.

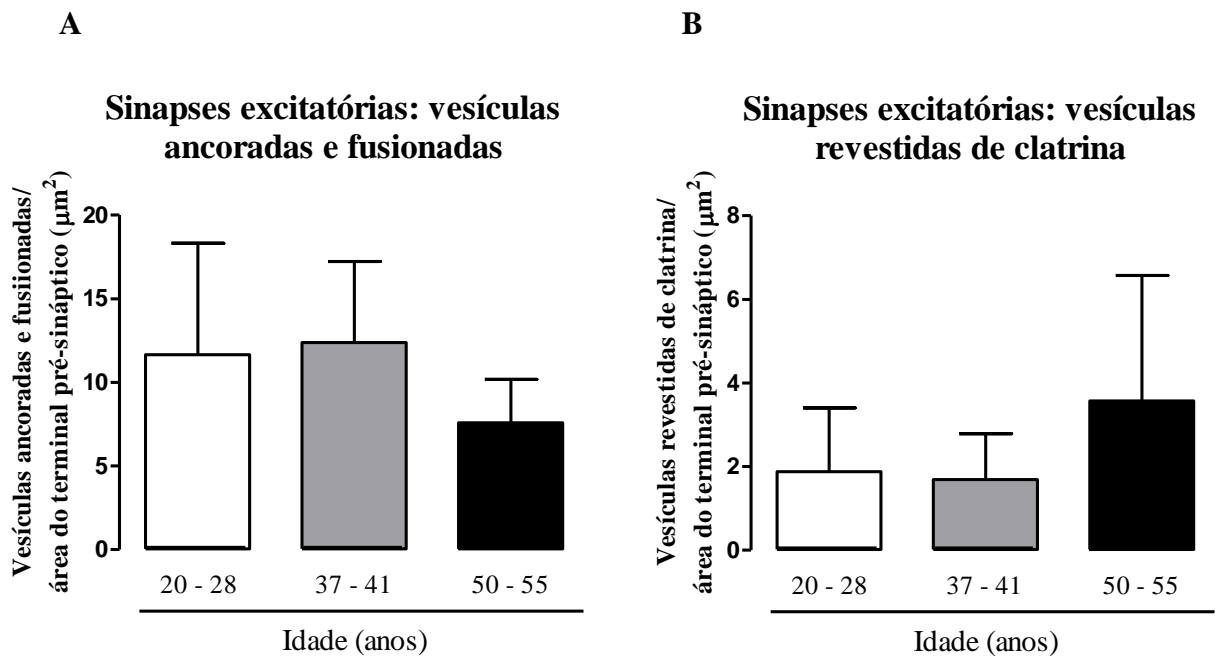


Figura 39. Número de vesículas ancoradas e fusionadas (**A**) e vesículas revestidas de clatrina (**B**) em relação à área do terminal pré-sináptico (μm^2) em sinapses excitatórias em indivíduos dos diversos grupos experimentais.

Conforme ilustrado nos gráficos a seguir (figuras 40 a 43), observou-se, nas sinapses **inibitórias**, que as seguintes variáveis não diferiram entre os grupos experimentais: razão entre o número de vesículas elétron lúcidas e a área do terminal pré-sináptico [figura 40 A; $H(2, n = 10) = 0,20, p > 0,05$: grupo 1 ($120,18 \pm 46,64$), grupo 2 ($199,81 \pm 49,68$) e grupo 3 ($165,04 \pm 67,34$)]; razão entre o número de vesículas elétron lúcidas redondas e a área do terminal pré-sináptico [figura 41 A; $H(2, n = 10) = 1,86, p > 0,05$: grupo 1 ($87,36 \pm 34,99$), grupo 2 ($148,13 \pm 42,16$) e grupo 3 ($117,44 \pm 56,84$)]; razão entre o número de vesículas elétron lúcidas pleomórficas e a área do terminal pré-sináptico [figura 41 B; $H(2, n = 10) = 3,03, p > 0,05$: grupo 1 ($32,82 \pm 11,84$), grupo 2 ($51,68 \pm 8,08$) e grupo 3 ($47,60 \pm 11,92$)]; a razão entre o número de vesículas elétron densas grandes e a área do terminal pré-sináptico [figura 42 B; $H(2, n = 10) = 5,93, p = 0,05$: grupo 1 ($0,16 \pm 0,28$), grupo 2 ($0,11 \pm 0,18$) e grupo 3 ($0,89 \pm 0,41$)]; razão entre o número de vesículas ancoradas e fusionadas e a área do terminal pré-sináptico [figura 43 A; $H(2, n = 10) = 4,84, p = 0,09$: grupo 1 ($3,51 \pm 2,57$), grupo 2 ($7,45 \pm 4,94$) e grupo 3 ($1,26 \pm 0,96$)]; razão entre o número de vesículas revestidas de clatrina e a área do terminal pré-sináptico [figura 43 B; $H(2, n = 10) = 0,23, p > 0,05$: grupo 1 ($1,55 \pm 2,34$), grupo 2 ($1,15 \pm 0,77$) e grupo 3 ($1,64 \pm 1,84$)]. Por outro lado, a razão entre o número de vesículas elétron densas e a área do terminal pré-sináptico foi maior no grupo 3 que no grupo 1 [figura 40 B; $H(2, n = 10) = 7,04, p < 0,05$: grupo 1 ($0,16 \pm 0,28$), grupo 2 ($0,44 \pm 0,13$) e grupo 3 ($1,59 \pm 0,57$)]; a razão entre o número de vesículas elétron densas pequenas e a área do terminal pré-sináptico [figura 42 A; $H(2, n = 10) = 6,46, p < 0,05$: grupo 1 ($0,00 \pm 0,00$), grupo 2 ($0,33 \pm 0,25$) e grupo 3 ($0,70 \pm 0,45$)].

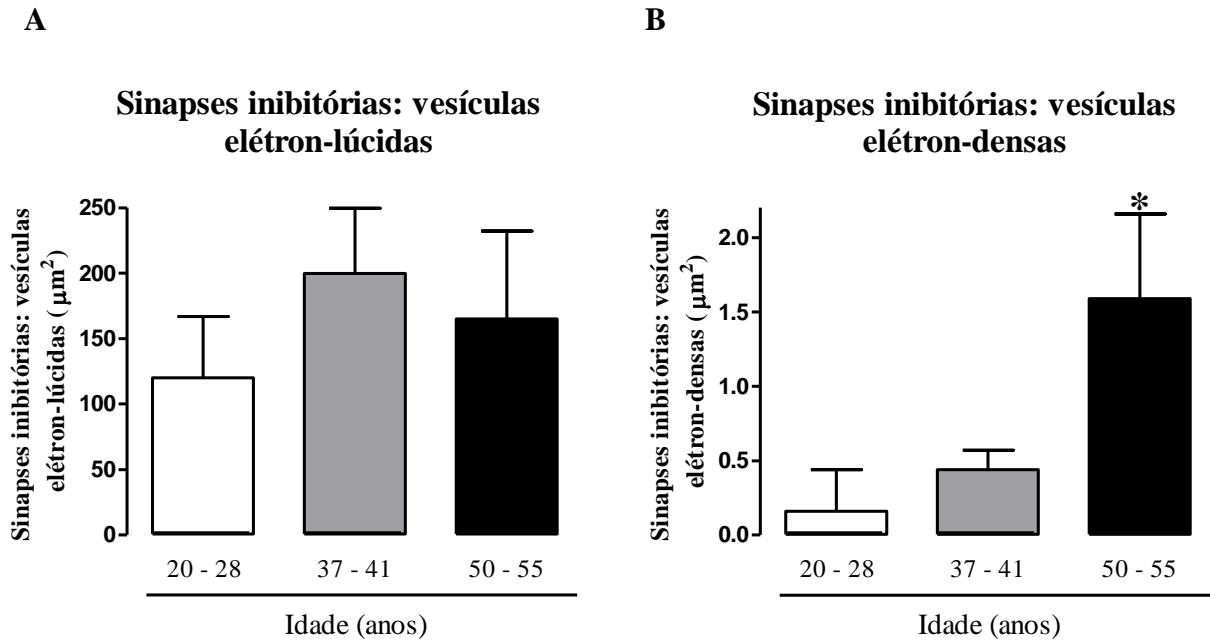


Figura 40. Número de vesículas elétron lúcidas (A) e elétron densas (B) em relação à área do terminal pré-sináptico (μm^2) em sinapses inibitórias de indivíduos dos grupos 1, 2 e 3. * $p < 0,05$ em relação ao grupo 1.

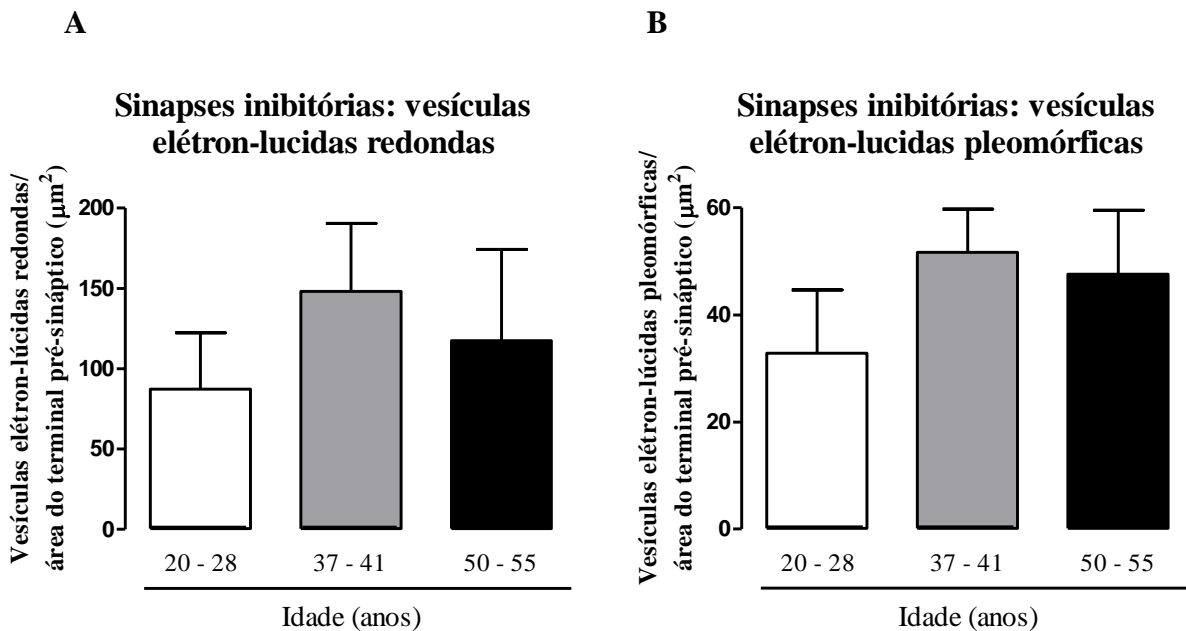


Figura 41. Número de vesículas elétron lúcidas redondas (A) e pleomórficas (B) em relação à área do terminal pré-sináptico (μm^2) em sinapses inibitórias de indivíduos dos grupos 1, 2 e 3.

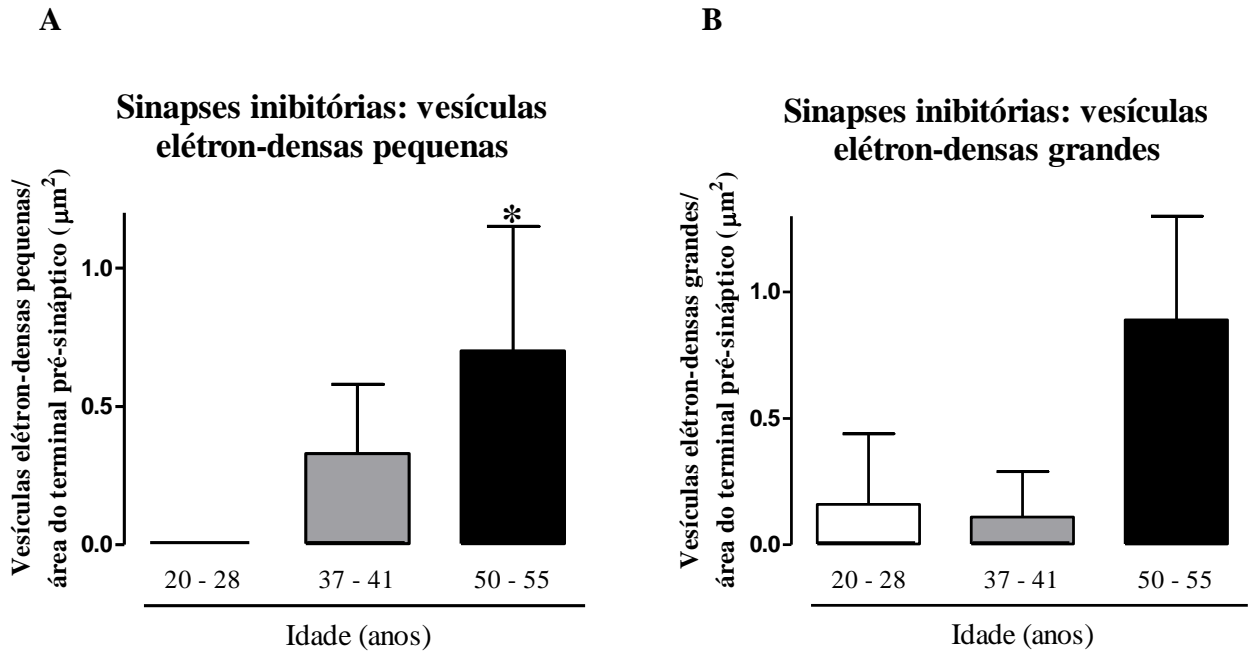


Figura 42. Número de vesículas elétron densas pequenas (A) e grandes (B) em relação á área do terminal pré-sináptico (μm^2) em sinapses inibitórias de indivíduos dos grupos 1, 2 e 3. * $p < 0,05$ em relação ao grupo 1.

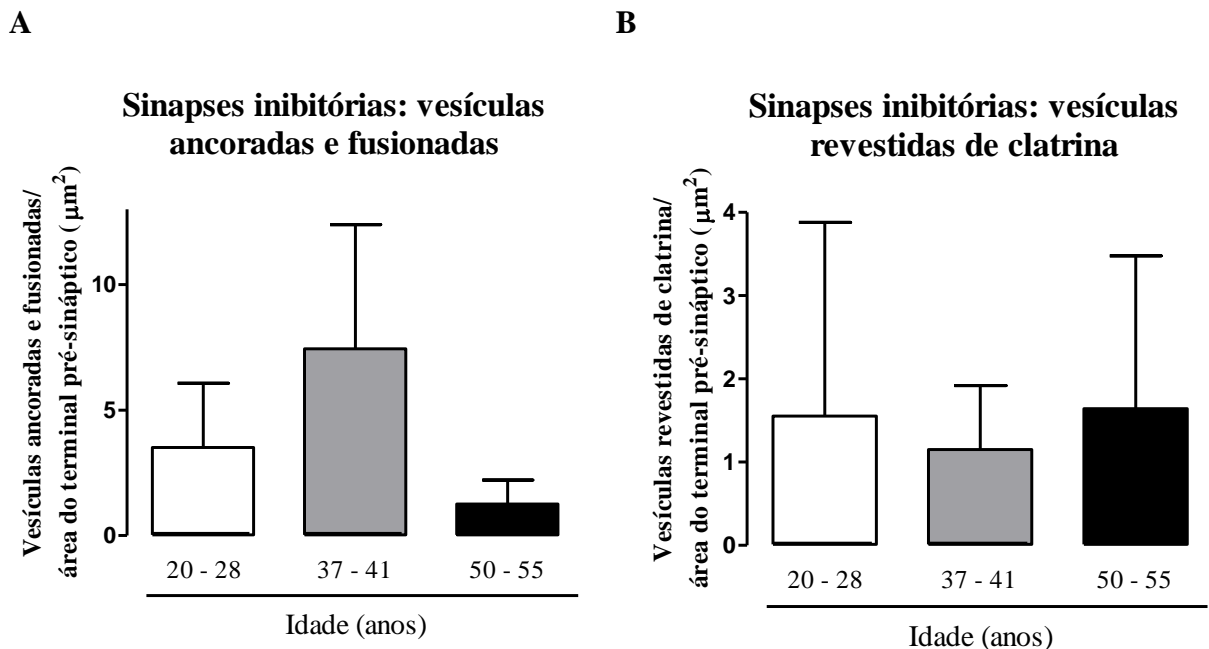


Figura 43. Porcentagem de vesículas ancoradas e fusionadas (A) e vesículas revestidas de clatrina (B) em relação à área do terminal pré-sináptico (μm^2) em sinapses inibitórias dos diversos grupos experimentais.

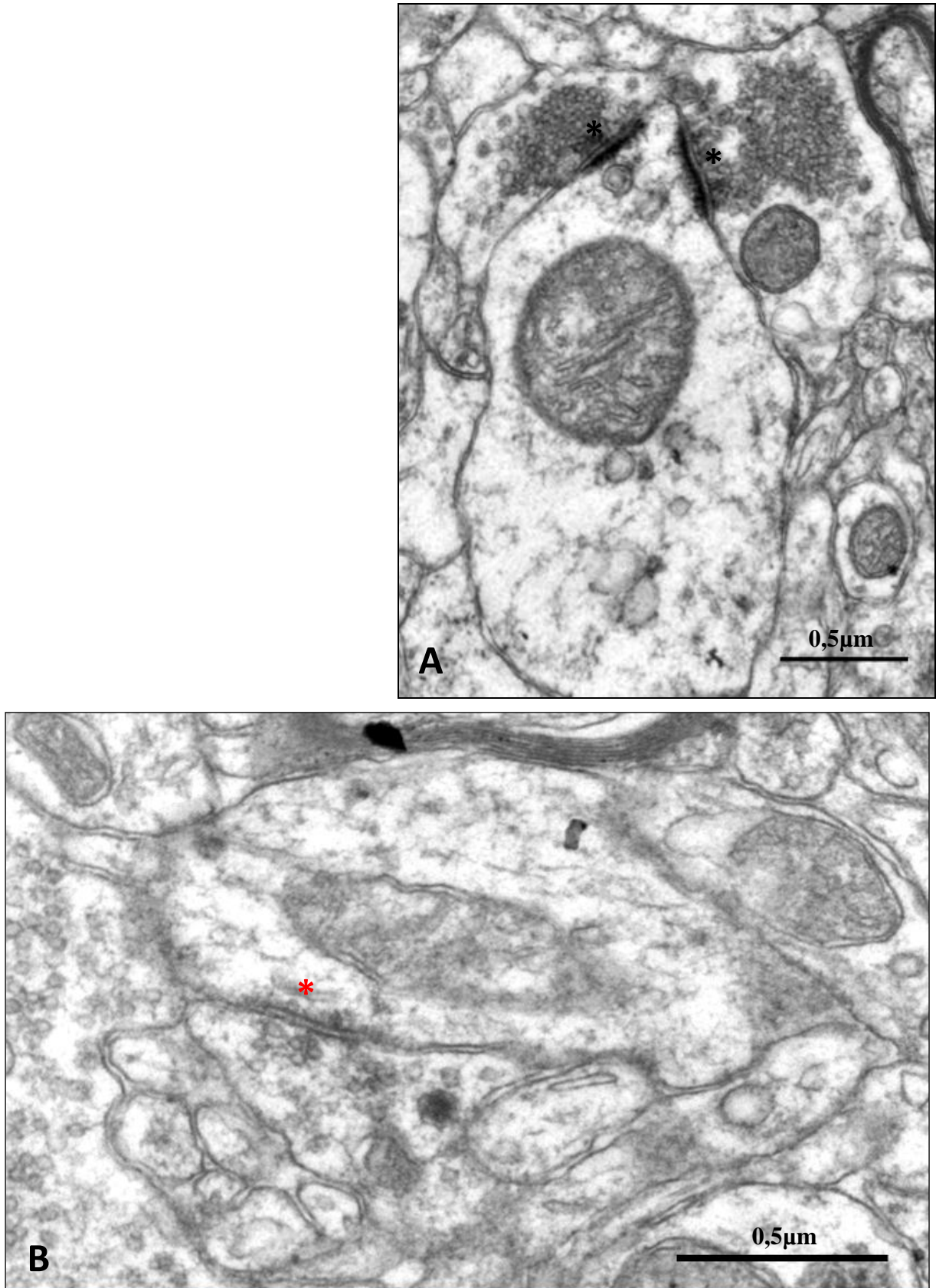
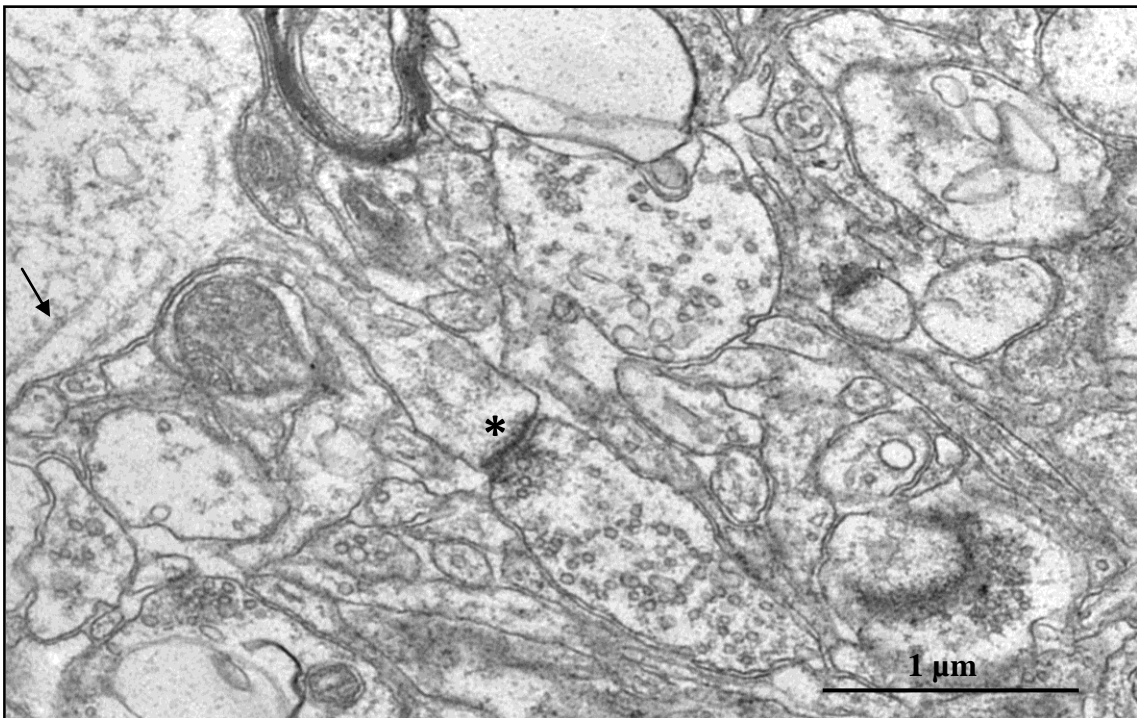
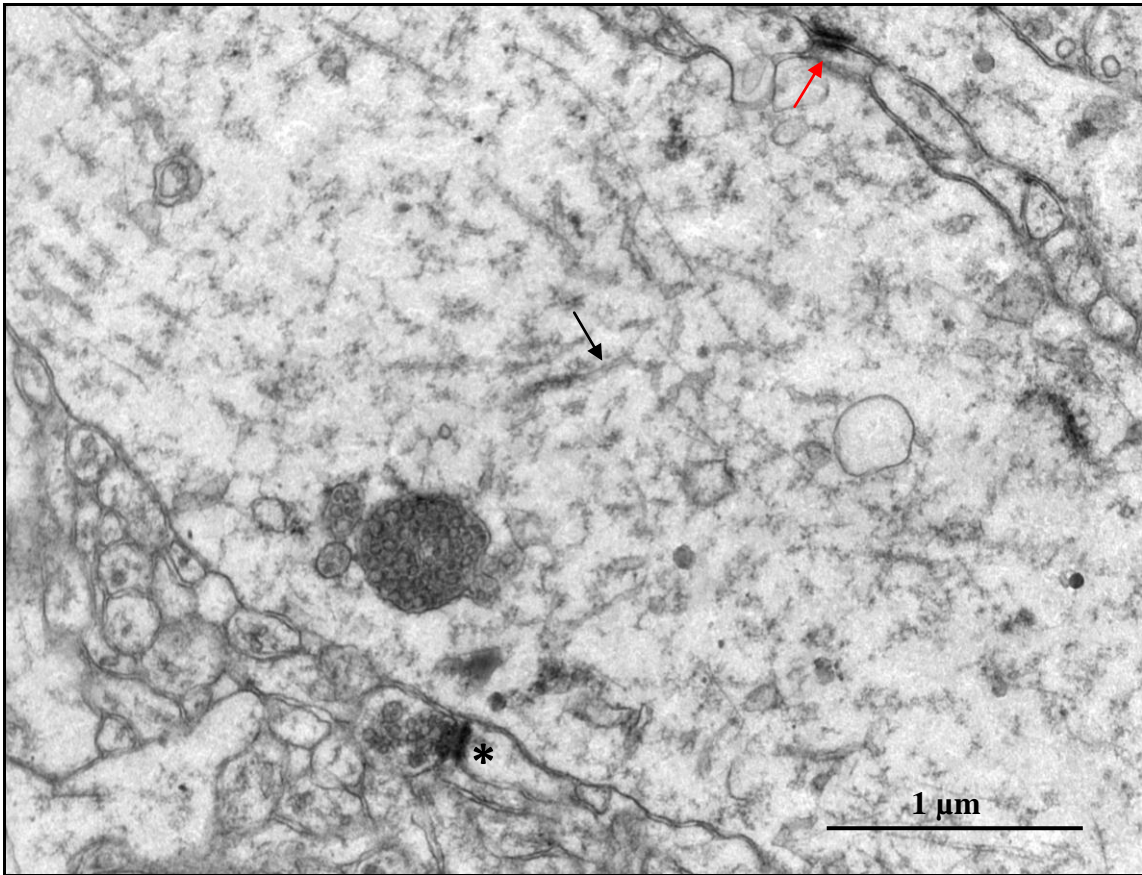


Figura 44. **A.** Sinapses excitatórias: vesículas redondas e densidade pós-sináptica assimétrica (asterisco preto). **B.** Sinapse inibitória: vesículas pleomórficas e densidade pós-sináptica simétrica (asterisco vermelho). As sinapses apontadas fazem contato sobre dendritos (observar a presença de microtúbulos).



Figuras 45 e 46. Sinapses excitatórias: vesículas redondas e densidade pós-sináptica assimétrica (asterisco preto) sobre espinho dendrítico. Observar microtúbulos no dendrito, antes da formação do espinho (setas pretas). Sinapse elétrica (seta vermelha).

5.5.2 Córtex temporal de ratos

5.5.2.1 Sinapses excitatórias, inibitórias e elétricas

A análise das sinapses do córtex temporal de ratos de 2 e 12 meses, realizada com microscopia eletrônica, evidenciou que não houve diferenças estatísticas, através do Mann-Whitney U Test, na razão entre o número de sinapses e a área total analisada [U (n1 = n2 = 2) = 0,00, p > 0,05: grupo 2 meses (0,29 ± 0,04) e grupo 12 meses (0,21 ± 0,06)]; bem como na razão entre a área do terminal pré-sináptico e a área total analisada [U (n1 = n2 = 2) = 2,00, p > 0,05: grupo 2 meses (0,06 ± 0,007) e grupo 12 meses (0,06 ± 0,017)]. Em relação à porcentagem de sinapses excitatórias não foram observadas diferenças estatísticas [U (n1 = n2 = 2) = 1,00, p > 0,05: grupo 2 meses (93,00 ± 6,08) e grupo 12 meses (94,59 ± 5,82)], bem como em relação as sinapses inibitórias [U (n1 = n2 = 2) = 1,00, p > 0,05: grupo 2 meses (2,05 ± 0,92) e grupo 12 meses (1,84 ± 0,77)] e elétricas [U (n1 = n2 = 2) = 1,50, p > 0,05: grupo 2 meses (4,95 ± 7,00) e grupo 12 meses (3,57 ± 5,05)].

5.5.2.2 Local de contato pós-sináptico

Não foi observada diferença estatística na porcentagem de **sinapses excitatórias** ocorrendo em dendritos [U (n1 = n2 = 2) = 1,00, p > 0,05: grupo 2 meses (60,78 ± 2,16) e grupo 12 meses (51,40 ± 12,59)], espinhos dendríticos [U (n1 = n2 = 2) = 0,00, p > 0,05: grupo 2 meses (37,57 ± 1,88) e grupo 12 meses (48,60 ± 12,59)] e axônios [U (n1 = n2 = 2) = 0,00, p > 0,05: grupo 2 meses (1,65 ± 0,28) e grupo 12 meses (0,00 ± 0,00)]. Não foram encontradas diferenças estatísticas na porcentagem de ocorrência de **sinapses inibitórias** em dendritos [U (n1 = n2 = 2) = 2,00, p > 0,05: grupo 2 meses (100,00 ± 0,00) e grupo 12 meses (100,00 ± 0,00)].

5.5.2.3 Morfologia das vesículas sinápticas

Não foi observada diferença estatística entre a porcentagem de vesículas elétron lúcidas redondas tanto de sinapses **excitatórias** [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 1,50, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($98,00 \pm 1,41$) e grupo 12 meses ($98,50 \pm 0,71$)] quanto de sinapses **inibitórias** [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 1,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($77,00 \pm 2,83$) e grupo 12 meses ($72,75 \pm 5,30$)]. As seguintes variáveis também não diferiram entre os grupos experimentais: razão entre o número total de vesículas e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 0,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($392,35 \pm 80,12$) e grupo 12 meses ($256,45 \pm 17,08$)]; razão entre o número de vesículas elétron lúcidas e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 0,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($392,30 \pm 80,13$) e grupo 12 meses ($256,25 \pm 17,29$)]; razão entre o número de vesículas elétron densas e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 1,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($0,06 \pm 0,02$) e grupo 12 meses ($0,21 \pm 0,21$)]; razão entre o número de vesículas elétron lúcidas redondas e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 0,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($384,15 \pm 83,31$) e grupo 12 meses ($252,28 \pm 16,15$)]; razão entre o número de vesículas elétron lúcidas pleomórficas e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 0,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($8,15 \pm 3,17$) e grupo 12 meses ($3,96 \pm 1,13$)]; razão entre o número de vesículas elétron densas pequenas e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 0,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($0,00 \pm 0,00$) e grupo 12 meses ($0,04 \pm 0,02$)]; razão entre o número de vesículas elétron densas grandes e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 2,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($0,06 \pm 0,02$) e grupo 12 meses ($0,17 \pm 0,19$)]; razão entre o número de vesículas ancoradas e fusionadas e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 0,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($29,13 \pm 4,60$) e grupo 12 meses ($20,55 \pm 1,74$)]; e razão entre o número de vesículas revestidas de clatrina e a área do terminal pré-sináptico [U ($n_1 = n_2 = 2$) = 1,00, $p > 0,05$: grupo 2 meses ($0,89 \pm 1,02$) e grupo 12 meses ($0,14 \pm 0,19$)].

6. Discussão

O presente estudo investigou, mediante histologia com microscopias de luz e eletrônica, o acúmulo de grânulos de lipofucsina em amostras de córtex temporal humano ou de ratos de diferentes idades. Ainda utilizando microscopia eletrônica foram estudados dados sobre a morfologia das sinapses dessa área cerebral, como o número e morfologia das vesículas sinápticas de sinapses excitatórias e/ou inibitórias. Mediante *Western blot*, investigou-se a expressão de alfa-sinucleína e ubiquitina nas amostras de córtex temporal humano dos diversos grupos experimentais.

Diversos estudos descreveram, em várias espécies animais, maior acúmulo de lipofucsina em neurônios de indivíduos idosos (Brody, 1960; Brizzee *et al.*, 1969; Nanda e Getty, 1973; El-Ghazzawi e Malaty, 1975; Benavides *et al.*, 2002; Boellaard *et al.*, 2004). A maioria dos trabalhos sobre lipofucsina investiga a área total ocupada pelos grânulos por neurônio utilizando técnicas colorimétricas e microscopia de luz ou observando a autofluorescência desses grânulos (Brody, 1960; Nandy e Bourne, 1966; Brizzee *et al.* 1969; Nanda e Getty, 1973; Ivy *et al.*; 1984.). Outros autores estudaram aspectos ultra-estruturais dos grânulos, utilizando técnicas de microscopia eletrônica (Samorajski *et al.*, 1965; Benavides *et al.*, 2002; Boellaard *et al.*, 2004). Neste trabalho, foi feita uma análise ampla dos grânulos de lipofucsina para analisar tanto o acúmulo e área dos grânulos como aspectos ultra-estruturais dos mesmos.

Diversas colorações histológicas foram utilizadas para análise dos grânulos de lipofucsina com microscopia de luz, como PAS, Sudan Black, AFIP e Alcian Blue (Brody, 1960; Nandy e Bourne, 1966; Brizzee *et al.*, 1969; Nanda e Getty, 1973; Ivy *et al.*; 1984). As colorações por PAS e Alcian Blue são utilizadas para evidenciar carboidratos, que constituem

parcialmente a estrutura dos grânulos de lipofucsina. A autofluorescência, mediante microscopia de luz ou confocal produz belas imagens cujas limitações principais são a dificuldade de diferenciar neurônios de células gliais e a difícil visualização dos limites do corpo neuronal (Reichel *et al.*, 1968; Brizzee *et al.*, 1969; Riga e Riga, 1974; Gray e Woulfe, 2005). Para nosso trabalho, o Sudan Black ofereceu as melhores possibilidades para a análise integral dos grânulos de lipofucsina com microscopia de luz.

A razão entre a área dos grânulos de lipofucsina e a área do corpo neuronal foi determinada mediante Sudan Black. Como esperado observou-se que a área ocupada pelos grânulos de lipofucsina nos neurônios do córtex temporal humano foi superior no grupo de maior idade que nos demais grupos experimentais. Essa maior área de grânulos de lipofucsina em células de mamíferos mais idosos foi relatada por vários autores na literatura investigando não apenas o córtex, como outras estruturas encefálicas (Brody, 1960; Nandy e Bourne, 1966; Brizzee *et al.*, 1969; Nanda e Getty, 1973; El-Ghazzawi e Malaty, 1975; Benavides *et al.*, 2002; Boellaard *et al.*, 2004). A área neuronal analisada foi equivalente nas diversas camadas entre os grupos experimentais humanos.

O *Sudan Black* também foi utilizado para analisar os grânulos de lipofucsina em neurônios do córtex temporal de ratos de diferentes idades (2, 6, 10 e 12 meses). Apesar das médias observadas em relação à razão entre a área dos grânulos e a área neuronal crescerem com o aumento da idade dos animais não foram observadas diferenças na razão entre a área dos grânulos e a área neuronal, assim como na área dos neurônios analisados. Brizzee e colaboradores (1969) observaram maior acúmulo de grânulos de lipofucsina em ratos de aproximadamente 24 meses quando comparados a ratos de aproximadamente 3 meses. Não conseguimos analisar maior número de animais por grupo e adicionar um grupo de idade superior a 12 meses devido à alta mortalidade acima de 7 meses.

A análise por microscopia eletrônica permite a visualização de grânulos de lipofucsina individualmente, permitindo determinar a área dos grânulos, e as variações morfológicas dos mesmos.

Os dados analisados com microscopia eletrônica foram: a razão entre a área dos grânulos de lipofucsina e o citoplasma ou corpo neuronal, o número de grânulos por neurônio, o número de porções lipídicas por neurônio, a porcentagem das frações lipídicas (elétron lúcidas) e protéicas (elétron densas) dos grânulos e a área neuronal analisada.

A análise dos grânulos com microscopia eletrônica, de maneira similar ao verificado com microscopia de luz, revelou que os neurônios do córtex temporal humano de indivíduos de maior idade apresentaram maior área ocupada pelos grânulos de lipofucsina que os de indivíduos mais jovens. Esses resultados confirmam outros estudos, conforme mencionado anteriormente (Thal e Schlote, 1994; Benavides *et al.*, 2002).

Apesar do aumento da área dos grânulos de lipofucsina em relação à área do corpo neuronal ser maior nos indivíduos de maior idade, não foram observadas modificações quanto ao número de grânulos de lipofucsina por neurônio no presente estudo. Thal e Schlote (1994) sugeriram que possa ocorrer fusão dos mesmos. Altos níveis de estresse oxidativo estão relacionados ao acúmulo dos grânulos de lipofucsina (Szweda, 2003; Jung *et al.*, 2007; Kurz, 2008), sendo que observa-se aumento de espécies reativas ao oxigênio com o envelhecimento (Yankner *et al.*, 2008).

Outro resultado bastante interessante é o aumento da porção elétron lúcida e redução da elétron densa em relação à área total do grânulo. Thal e Schlote (1994) obtiveram resultados similares estudando neurônios das camadas do Corno de Amon (CA1, CA2, CA3 e CA4) de indivíduos nas idades de 20, 40, 60 e 80 anos. No presente estudo, analisados três grupos de indivíduos entre 20 e 55 anos, verificou-se nos neurônios do córtex temporal

medial, que a porção elétron densa, apesar de menor em indivíduos de maior idade, sempre foi superior a 60% da área do grânulo. Thal e Schlote (1994) observaram, ao contrário do visto neste estudo, que a porção elétron densa foi menor em indivíduos de maior idade, contudo esta porção sempre foi inferior a 50% da área do grânulo de lipofucsina em CA2, CA3 e CA4. Em CA1 foi similar ao observado em nosso estudo. Esses dados estão de acordo com Boellaard e colaboradores (2004) que observaram, em neurônios piramidais do hipocampo de diferentes espécies animais, dois padrões ultraestruturais distintos: CA1 com gotículas lipídicas pequenas e grande porção pigmentada e CA3/CA4 com gotículas lipídicas amplas e pequena porção pigmentada.

Thal e Schlote (1994) sugeriram que a condensação de lipídeos neutros do componente elétron lúcido a partir da matriz granular com o avanço da idade, poderia estar associada ao crescimento desproporcional das frações, com aumento da porção lipídica, uma vez que radicais livres e peroxidação lipídica são responsáveis pela formação de lipofucsina. Outro dado interessante é que é bastante clara a natureza lisossomal da porção elétron densa. Masliska e colaboradores (1984) observaram, através de microscopia eletrônica, que somente a porção elétron densa é positiva para hidrolases ácidas.

Samorajski e colaboradores (1965) descreveram grânulos com diâmetro entre 1 a 3 μm . No presente estudo visualizamos grânulos entre 0,5 a 3 μm de diâmetro (como observado por Ivy *et al.*, 1984) tanto no córtex de humanos como de ratos. No entanto, a reconstrução tridimensional de cortes seriados de 80 nm de um grânulo com cerca de 1 μm de diâmetro revelou um comprimento de aproximadamente 15 μm . Portanto, considerando que no citoplasma neuronal há grânulos ainda maiores e em grande número, os mesmos podem ocupar uma porção significativa do citoplasma.

Pode-se questionar a visualização da porção elétron lúcida de Samorajski e colaboradores (1965) inserida na introdução do presente trabalho. Mitocôndrias e grânulos de lipofucsina são frequentemente vistos em proximidade, inclusive estudos procuraram diferenciar a origem lisossomal ou mitocondrial dos mesmos (Hirsch, 1970). Na fotomicrografia de Samorajski e colaboradores (1965) podem-se visualizar membranas internas na periferia do que o autor descreve como porção elétron lúcida do grânulo de lipofucsina (setas pretas), devido a isso podemos sugerir que o que o autor visualizou como porção elétron lúcida nessa imagem é na realidade uma mitocôndria edemaciada devido, provavelmente, a problemas osmóticos na fixação. Podemos comparar a imagem de Samorajski e colaboradores (1965) com a de Boellaard e Schlote (1986) (figura 46), onde fica mais clara a natureza lipídica e a membrana única da porção elétron lúcida dos grânulos de lipofucsina. Nossas imagens (figura 10) estão de acordo com Boellaard e colaboradores (1986).

Visualizaram-se, tanto em amostras de indivíduos mais jovens como de maior idade, numerosos grânulos de lipofucsina no interior de células com aspecto apóptótico. Células pós-mitóticas, principalmente senescentes, podem apresentar redução no processo de degradação autofágico-lisossomal, com conseqüente danos mitocondriais, levando ao aumento do estresse oxidativo e resultando em apoptose celular (Kurz *et al.*, 2008). Portanto, o acúmulo de grânulos de lipofucsina em neurônios pode significar envelhecimento celular devido as causas descritas acima.

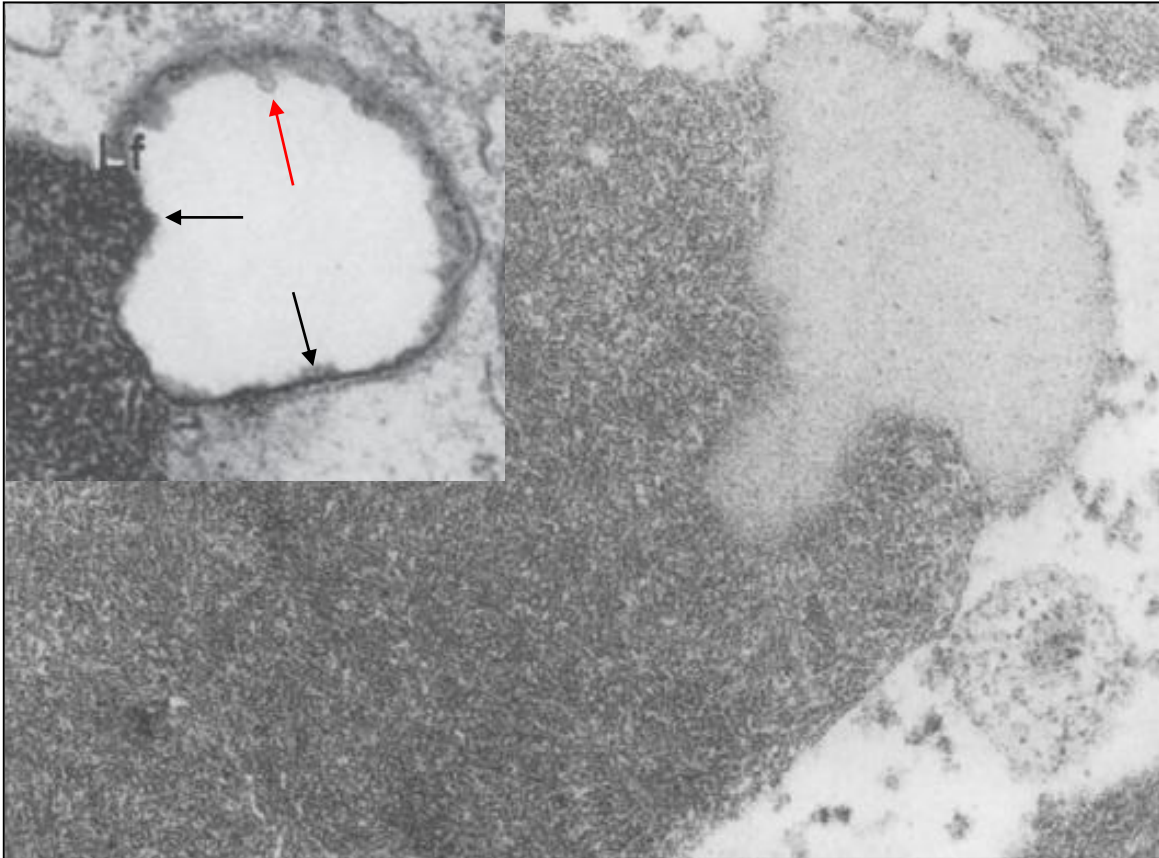


Figura 47. Em destaque, podem-se visualizar membranas internas (setas pretas) e cristas (seta vermelha) na periferia do que Samorajski e colaboradores (1965) descrevem como porção elétron lúcida do grânulo de lipofuscina, e que por isso parece ser uma mitocôndria. Na fotomicrografia, modificada de Boellaard e Schlote (1986) observa-se mais claramente a natureza lipídica e a membrana única da porção elétron lúcida dos grânulos de lipofuscina.

Em amostras de córtex temporal de ratos, não foram encontradas diferenças significativas em relação à razão entre a área dos grânulos de lipofuscina e o citoplasma ou corpo neuronal, o número de grânulos por neurônio, o número de porções lipídicas por neurônio e a área neuronal analisada. No entanto, pode-se sugerir que um aumento do número amostral seria interessante, uma vez que, embora sem significância estatística, aumentaram as médias observadas em relação à razão entre a área dos grânulos e a área neuronal, número de razões lipídicas por neurônio e porcentagem da fração lipídica, e reduziram as médias em relação à porcentagem da fração protéica em indivíduos de maior idade. Estes dados são condizentes aos observados no córtex temporal humano.

Observou-se que a razão entre a área dos grânulos de lipofucsina e área do corpo celular de neurônios do córtex temporal humano tiveram valores muito similares seja analisados por coloração de Sudan Black e microscopia de luz (grupo 1 = 3,18%, grupo 2 = 4,31% e grupo 3 = 7,47%) ou por microscopia eletrônica (grupo 1 = 3,13%, grupo 2 = 4,88% e grupo 3 = 7,60%).

A autofluorescência dos grânulos de lipofucsina das amostras de córtex temporal humano foi facilmente visualizada com microscopia confocal, através do laser de argônio (488 – 620 nm). Para a lipofucsina, estudos com microscópio de luz apontam espectro de excitação entre 320 e 480 nm e de emissão entre 460 e 630 nm e para o ceróide, espectro de excitação de 360 nm e de emissão de 539 nm (Seehafer e Pearce, 2006).

Não foram observadas diferenças significativas na expressão das proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina no extrato total de córtex humano. Alguns autores sugerem que os níveis de alfa-sinucleína podem não aumentar, entretanto alterações conformacionais da proteína levariam à formação de agregados de Lewy (Rajagopalan e Andersen, 2001; Cookson, 2008; Cookson, 2009). A alfa-sinucleína de alto peso molecular apresenta diferente solubilidade e agregação e pode ser detectada em certas doenças neurodegenerativas (Dalfó *et al.*, 2006). Alguns estudos demonstraram ainda que defeitos na proteína adaptadora 4, pode estar associada a rotas amiloidogênicas com maior risco de desenvolvimento de doenças como a de Alzheimer (Burgos *et al.*, 2010).

Ao contrário do observado por alguns autores em outras estruturas encefálicas (tronco encefálico e cerebelo, por exemplo), os níveis de expressão de ubiquitina não foram diferentes em indivíduos humanos das faixas etárias selecionadas para o presente estudo (Kruskal Wallis apresentou $p = 0,10$). Entretanto, outros estudos verificaram maior nível de ubiquitina conjugada de alto peso molecular (como a utilizada no presente estudo) em indivíduos de

maior idade (Gray *et al.*, 2003), portanto é possível que também ocorra no córtex aumento da expressão de ubiquitina em indivíduos mais idosos. É importante comentar que o presente estudo utilizou apenas um n de 3 a 4 amostras de cada grupo experimental (amostras de córtex temporal humano não são facilmente obtidas), sendo que trabalhos com essa técnica utilizam um número amostral maior, o que poderia auxiliar na visualização de diferenças significativas entre os grupos.

As sinapses foram visualizadas por microscopia eletrônica, salienta-se que os dados analisados foram descritos anteriormente. Diversos estudos em mamíferos apontam diminuição do número de sinapses em indivíduos de maior idade (Adams e Jones, 1982; Geinisman *et al.*, 1977; Levine *et al.*, 1988; Matsumoto *et al.*, 1982; Uemura, 1980). No presente estudo, foram analisados encéfalos de indivíduos de 20 a 55 anos de idade e não foram verificadas alterações nas razões entre o número total de sinapses e a área total analisada e entre a área do terminal pré-sináptico e a área total analisada.

Huttenlocher (1979) analisou a densidade sináptica na camada 3 do giro frontal médio, de recém nascidos a indivíduos de 90 anos de idade. O autor observou que a densidade sináptica atingia o máximo na idade entre 1 a 2 anos, com redução entre 2 a 16 anos. Além disso, observou que a densidade sináptica foi constante nessa região entre as idades de 16 a 72 anos, correspondendo ao valor observado no início da vida, ocorrendo declínio acentuado em indivíduos de 74 a 90 anos de idade. Os dados de Huttenlocher (1979) estão de acordo com os dados observados no presente estudo. Podemos sugerir que a redução na densidade sináptica possa estar relacionada a declínio cognitivo, o qual parece ocorrer em indivíduos com idade superior a 60 anos, assim como as doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer são prevalentes a partir dessa faixa etária (Yankner *et al.*, 2008). Na continuação do presente estudo, incluiremos um grupo com idade mais avançada, porém de outros tipos de cirurgia, pois a lobectomia temporal é pouco frequente em indivíduos maiores de 55 anos de

idade. Outro dado interessante observado por Huttenlocher (1979) foi maior densidade sináptica no córtex frontal de recém nascidos com crises com reduzida resposta a anticonvulsivos quando comparado a controles de idade semelhante.

Hinds e McNelly (1979) observaram maior número de sinapses somato-dendríticas no bulbo olfatório de ratos de 24 meses de idade que nos animais de 3 meses de idade. Além disso, verificaram maior número de sinapses em ratos de 24 meses que em animais de 30 meses de idade. Os autores explicaram tais resultados sugerindo que em indivíduos adultos pode ocorrer a formação de novas sinapses, algo menos provável que em indivíduos idosos. Esta observação coincidiria com a opinião geral de neurocientistas sobre um contínuo amadurecimento da atividade cerebral humana na idade adulta, embora com variáveis dependentes de vários fatores inclusive culturais e sociais. Hinds e McNelly (1979) observaram ainda maior quantidade de grânulos de lipofucsina em animais idosos que animais jovens, sendo que não foram encontradas diferenças significativas em outras organelas celulares, como mitocôndrias ou retículo endoplasmático.

Os resultados de Huttenlocher (1979) e Hinds e McNelly (1979), no cérebro de humano e ratos, respectivamente, sugerem que no cérebro adulto pode ocorrer a formação de novas sinapses, a qual pode inclusive ser superior a alguns períodos da infância, mas que tende a diminuir nos indivíduos idosos. No entanto, devemos salientar que a determinação de uma idade cronológica para distinguir o início do envelhecimento entre as diferentes espécies é bastante questionável, sendo que fatores ambientais e genéticos podem sugerir diferentes idades biológicas. Assim, nossos dados estão de acordo com esses autores, uma vez que não observamos diferenças na densidade sináptica ou local de contato pós-sináptico entre os diversos grupos experimentais humanos e de ratos, entre 20 e 55 anos e 2 e 12 meses de idade. No presente estudo, os grânulos de lipofucsina do córtex temporal humano serviram, em parte, como marcadores do envelhecimento celular, uma vez que foram observados

ocupando maior área do soma neuronal em indivíduos de maior idade. No entanto, apesar dessa diferença morfológica não foram comparáveis para demonstrar possíveis diferenças funcionais, como em relação à densidade sináptica.

Embora não tenham sido observadas alterações no número de sinapses, observou-se menor porcentagem de sinapses excitatórias no grupo mediano de amostras corticais humanas que nos indivíduos mais jovens. Adams e Jones (1982) observaram, em ratos, que somente as sinapses assimétricas diminuem com o envelhecimento. Nas sinapses inibitórias e elétricas não foram evidenciadas diferenças significativas. No entanto, em relação às sinapses elétricas, a correta determinação do número dessas sinapses deveria ser determinada mediante um anticorpo específico para neurônios, como é conexina para as junções *gap* de células gliais, e microscopia de luz, para obter uma visão mais ampla da sua distribuição (Wiencken-Barger *et al.*, 2007). Em relação à morfologia das vesículas sinápticas em sinapses excitatórias não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados.

Em relação à morfologia das vesículas de sinapses inibitórias, verificou-se maior o número de vesículas elétrons densas em relação à área do terminal pré-sináptico no grupo de maior idade quando comparado ao de menor idade. Ao se analisarem a razão entre as vesículas elétrons densas pequenas e grandes em relação à área do terminal pré-sináptico só foram observadas diferenças em relação às vesículas elétrons densas pequenas ($p < 0,05$), no entanto observou-se forte tendência em relação às vesículas elétrons densas grandes ($p = 0,05$). Portanto, o aumento de vesículas elétrons densas parece ser devido a alterações no número de vesículas catecolaminérgicas (vesículas elétrons densas pequenas), e possivelmente, neuropeptidérgicas (vesículas elétrons densas grandes).

Harik e McCracken (1986) observaram, no córtex cerebral de ratos, maiores níveis de noradrenalina e maior atividade da tirosina hidroxilase em animais idosos (28 a 29 meses)

comparados a jovens (3 a 4 meses). Os autores afirmam que esses resultados contradizem diversos estudos, os quais descrevem declínio noradrenérgico em modelos experimentais em roedores. Os pesquisadores sugerem que essa discrepância é devido às diferentes regiões analisadas, outros autores analisaram regiões com maior concentração de catecolaminas, como hipotálamo e regiões sucorticais, enquanto o estudo de Harik e McCracken (1986) estudou o córtex cerebral de ratos. Wang e colaboradores (2010) observaram melhora motora em pacientes com acidente vascular cerebral que receberam dose oral única de 6mg de reboxetina, inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina. Podemos sugerir que o aumento de neurotransmissores catecolaminérgicos, como noradrenalina, pode ser devido a mecanismos compensatórios a prejuízos da função motora observados com o envelhecimento.

Não foram observadas diferenças significativas em relação à porcentagem de sinapses sobre dendritos, espinhos dendríticos, axônio e corpo celular em sinapses excitatórias e inibitórias entre os 3 grupos estudados. Geinisman (1979) observou menor número de sinapses axo-somáticas e maior número de grânulos de lipofucsina no giro denteado do hipocampo de ratos de 25 meses de idade, quando comparados a ratos de 3 meses de idade.

Além do fato que as idades máximas estudadas, entre 50 a 55 anos em humanos e 12 meses em ratos ainda representarem indivíduos “jovens”, outros dois fatores importantes devem ser ressaltados no presente estudo: primeiro, as amostras utilizadas de córtex temporal humano de pacientes com epilepsia submetidos à lobectomia temporal e, em segundo, as medicações usadas para o tratamento das crises epiléticas. A reorganização sináptica tem sido bastante estudada como potencial mecanismo para o aumento de excitabilidade nas vias hipocampais na epilepsia mesial temporal (Cavazos e Cross, 2006). Marco e colaboradores (1997) analisaram regiões neocorticais peritumorais removidas de pacientes com epilepsia e quantificaram, através de microscopia eletrônica, a densidade de sinapses excitatórias e inibitórias. Os autores observaram nessas regiões perda de sinapses inibitórias no soma e

segmento dendrítico inicial de células piramidais, e numerosas sinapses excitatórias em dendritos, o que, para os pesquisadores, poderia levar a hiperexcitabilidade desses neurônios.

Marco e DeFelipe (1997) subdividiram neocórtex de pacientes com epilepsia do lobo temporal não responsiva a medicamentos em regiões normais e anormais, identificadas pela citoarquitetura na coloração de Nissl e padrão imunoistoquímico para a proteína parvalbumina, que se liga ao cálcio nos interneurônios. Nas regiões consideradas anormais pelo autor a densidade sináptica foi aproximadamente 30% superior que nas regiões consideradas normais, o qual corresponderia a um aumento de aproximadamente 300 milhões de sinapses por mm^3 . Os autores sugerem que essas alterações resultam do brotamento de terminais axonais excitatórios e perda de terminais inibitórios que leva a hiperexcitação de circuitos sinápticos, os quais seriam substrato para a propagação de crises epiléticas no neocórtex humano não epileptogênico. Zsófia Maglóczy (2010) também sugeriu que intensa reorganização sináptica ocorre no hipocampo de pacientes com epilepsia, incluindo brotamento axonal de interneurônios.

Outros autores sugerem que o prejuízo da inibição mediada pelo GABA pode ser resultado da perda de alguns tipos de interneurônios suscetíveis, podendo ser uma das causas primárias da atividade epilética. No entanto, a atividade dos interneurônios também está associada à eficácia e plasticidade de recebimento de vias excitatórias em dendritos. Brotamento compensatório de axônios contendo o neuropeptídeo Y são observados em tecidos de pacientes com epilepsia (Maglóczy e Freund, 2005). Como descrito anteriormente, observamos no presente estudo forte tendência em relação ao maior número de vesículas elétrons densas grandes em relação à área do terminal pré-sináptico no grupo de maior idade quando comparado ao grupo mais jovem. Esse aumento pode ser relacionado à remodelação do córtex temporal em indivíduos com epilepsia. No entanto, como em todos os

grupos as amostras foram similares, podemos sugerir que o envelhecimento também têm um papel no aumento de vesículas neuropeptídicas.

Carmelo Sgobio e colaboradores (2010) analisaram o efeito terapêutico do tratamento crônico com ácido valpróico na região CA1 do hipocampo em camundongos mutantes como modelo de epilepsia. Os autores observaram que o tratamento com ácido valpróico reduziu crises epiléticas e mortalidade, assim como restabeleceu a potenciação de longa duração. No entanto o tratamento não reverteu alterações na morfologia dendrítica e na memória não espacial. Além disso, em camundongos normais, o tratamento crônico com ácido valpróico induziu modificações dendríticas e levou ao comprometimento da memória não espacial. Os autores sugeriram que o tratamento com essa substância possui tantos efeitos terapêuticos como prejudiciais nos circuitos hipocampais e nos processos relacionados à memória. Sobaniec-Lotowska (2005) observou que a administração crônica de ácido valpróico em ratos está associada ao aumento de células da microglia e da atividade fagocitária dessas células. Com microscopia eletrônica este autor observou que as células da microglia se apresentavam hipertrofiadas e com amplos processos, com numerosas estruturas semelhantes a grânulos de lipofucsina e gotículas lipídicas. Assim, tanto o fator envelhecimento, como o uso de medicações, como o ácido valpróico, podem influenciar o acúmulo de grânulos de lipofucsina em indivíduos de maior idade.

Apesar das limitações, que são equivalentes entre os grupos experimentais, ou seja, a análise de córtex temporal de pacientes com epilepsia submetidos à lobectomia temporal e a utilização de diversos medicamentos por esses indivíduos com o objetivo de redução das crises, a análise de diversos fatores envolvidos com o envelhecimento, assim como o estudo da interação desses fatores, como análise dos grânulos de lipofucsina, expressão de proteínas como ubiquitina e alfa-sinucleína e análise de sinapses é de fundamental importância para o entendimento do envelhecimento celular e doenças associadas a esse fator.

A tentativa de utilizar os grânulos de lipofucsina como marcador do envelhecimento celular no córtex temporal foi em parte alcançada. A associação morfológica entre os grânulos de lipofucsina e modificações sinápticas com o envelhecimento demonstrou alterações em vesículas catecolaminérgicas em uma densidade sináptica constante. Análises comparativas entre diversas espécies animais, assim como a reconstrução tridimensional de estruturas neuronais podem trazer novas informações sobre a interação entre diferentes estruturas celulares. Salientamos ainda que o estudo das sinapses é complicado uma vez que um neurônio do cérebro humano forma, em média, 5.000 contatos sinápticos com outros neurônios. Portanto, se supostamente há 10¹⁰ neurônios num cérebro humano, pelo menos 5 X 10¹³ sinapses químicas participam da comunicação específica entre neurônios. Se uma pessoa perdesse 1.000 sinapses por segundo durante 100 anos, o número total perdido representaria aproximadamente 15% do número original. E se a perda fosse distribuída em todo o cérebro, funcionalmente a pessoa quase nem notaria a diferença. Talvez o fundamental seja considerar que as sinapses são estabelecidas e destruídas em nosso cérebro todos os dias, a cada segundo (Llinás, 1999).

7. Conclusões

- Observou-se, com microscopia de luz e eletrônica, que os grânulos de lipofucsina ocuparam maior área nos neurônios do córtex temporal humano do grupo de maior idade quando comparado com o grupo mais jovem;
- Nos neurônios do córtex temporal humano não foram observadas diferenças em relação ao número de grânulos entre os grupos experimentais, mas se observou maior número de porções lipídicas no grupo de maior idade quando comparado com o grupo mais jovem;
- Nos neurônios do córtex temporal humano observou-se menor porcentagem da fração elétron densa (protéica) e maior da fração elétron lúcida (lipídica) no grupo de maior idade quando comparado com o grupo mais jovem;
- Não foram observadas diferenças na densidade sináptica do córtex temporal humano de diferentes idades nem alterações quanto ao local de contato pós-sináptico (dendrito, espinho dendrítico, axônio e corpo celular) em sinapses excitatórias ou inibitórias;
- No córtex humano a porcentagem de vesículas sinápticas elétron lúcidas (redondas e pleomórficas) e elétron densas (pequenas e grandes) foi similar entre os grupos experimentais nas sinapses excitatórias. Nas sinapses inibitórias observou-se maior número de vesículas elétron densas no grupo de maior idade quando comparado ao mais jovem, com diferenças significativas em relação às vesículas elétron densas pequenas e forte tendência às grandes.
- A expressão das proteínas alfa-sinucleína e ubiquitina, em amostras de extrato total de córtex humano, foram similares entre os diversos grupos experimentais.
- Nos neurônios do córtex temporal de ratos não foram observadas diferenças significativas quanto aos parâmetros analisados tanto para os grânulos de lipofucsina como para as sinapses.

8. Bibliografia

- Adams I, Jones DG. Quantitative ultrastructural changes in rat cortical synapses during early, mid and, late adulthood. **Brain Research**, 239: 349 – 363, 1982.
- Al-Wandi A, Ninkina N, Millership S, Williamson SJ, Jones PA, Buchman VL. Absence of alpha-synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice. **Neurobiol Aging.**, 31 (5): 796 - 804, 2010.
- Benavides SH, Monserrat AJ, Farina S, Porta EA. Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, 34: 219 - 231, 2002.
- Boellaard JW, Schlote W, Hofer W. Species-specific ultrastructure of neuronal lipofuscin in hippocampus and neocortex of subhuman mammals and humans. **Ultrastruct Pathol.**, 28 (5-6): 341 - 351, 2004.
- Brizze KR, Cancilla PA, Sherwood N, Timiras PS. The amount and distribution of pigments in neurons and glia of the cerebral cortex. **J Gerontol.**, 24(2): 127 – 135, 1969.
- Brady S, Morfini G, Sugimori M, Moreira JE, Llinás RR. Synuclein, a synaptic protein related to neurodegenerative disorders. A grant proposal. Em preparação.
- Brody H. The deposition of aging pigment in the human cerebral cortex. **J. Gerontol.**, 15: 258-261, 1960.
- Brunk U, Ericsson JLE. Electron microscopical studies on rat brain neurons. Localization of acid phosphatase and mode of formation of lipofuscin bodies. **J. Ultrastructure Research**, 38: 1 – 15, 1972.
- Burgos PV, Mardones GA, Rojas AL, da Silva LL, Prabhu Y, Hurley JH, Bonifacino JS. Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. **Dev Cell.**, 18 (3): 425 – 436, 2010.
- Burke RE. Recent advances in research on Parkinson Disease: synuclein and parkin. **The Neurologist**, 10: 75 – 81, 2004.
- Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain (review). **Nature Reviews Neuroscience**, 7: 30 – 39, 2006.
- Cavazos JE, Cross DJ. The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy (review). **Epilepsy Behav.**, 8 (3): 483-93, 2006.
- Colcolough HL, Hack MH, Helmy Fm, Vaughn GE, Veith DC. Some histochemical, biochemical and morphological observations relating to lipofuscin and mitochondria. **Acta Histochem.**, 43 : 98 – 109, 1972.
- Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation (review). **Science**, 296: 1254 – 1258, 2002

Cookson MR, van der Brug M. Cell systems and the toxic mechanism(s) of α -synuclein (review). **Experimental Neurology**, 209: 5 – 11, 2008.

Cookson MR. Alpha-synuclein and neuronal cell death. **Mol Neurodegener.**, 4: 4 – 9, 2009.

Dalfó E, Martínez A, Muntané G, Ferrer I. Abnormal alpha-synuclein solubility, aggregation and nitration in the frontal cortex in Pick's disease. **Neurosci Lett.**, 400 (1-2): 125-129, 2006.

Daly C, Sugimori M, Moreira JE, Ziff EB, Llinás RR. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. **PNAS**, 6120 – 6125, 2000.

Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease (review). **Science**, 302: 819 – 822, 2003.

Double KL, Dedov VN, Fedorow H, Kettle E, Halliday GM, Garner B, Brunk UT. The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain (review). **Cell. Mol. Life. Sci.**, 65: 1669 – 1682, 2008.

El-Ghazzawi EF, Malaty HÁ. Electron microscopic observations on extraneuronal lipofuscin in the monkey brain. **Cell Tiss. Res.**, 161: 555 – 565, 1975.

Fifková E, Eason H, Schaner P. Inhibitory contacts on dendritic spines of the dentate fascia. **Brain Res.**, 577 (2): 331 – 336, 1992.

Geinisman Y, Bondareff W, Dodge JT. Partial deafferentation of neurons in the dentate gyrus of the senescent rat. **Brain Research**, 134: 541 – 545, 1977.

Geinisman Y. Loss of axosomatic synapses in the dentate gyrus of aged rats. **Brain Research**, 168: 485 – 492, 1979.

Geinisman Y, Toledo-Morrell L, Morell F. Loss of perforad synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. **PNAS**, 83: 3027 – 3031, 1986.

Goldberg AL. Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel (review). **Science**, 268: 522-523, 1995.

Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. **J. Cell. Mol. Med.**, 12: 2263 - 2280, 2008.

Gotow T, Miyaguchi K, Hashimoto PH. Cytoplasmic architecture of the axon terminal: filamentous strands specifically associated with synaptic vesicles. **Neuroscience**, 40 (2): 587 – 598, 1991.

Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopy study. **Journal of Anatomy**, 93: 420 – 433, 1959a.

Gray EG. Electron microscopy of synaptic contacts on dendritic spines of the cerebral cortex. **Nature**, 183: 1592 – 1593, 1959b.

- Gray DA, Tsirigotis M, Woulfe J. Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain (review). **Sci Aging Knowledge Environ.**, 2003 (34). 1 - 6, 2003.
- Gray DA, Woulfe J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. (review). **Sci Aging Knowledge Environ.**, 2005 (5): re1.
- Haltia M. The neuronal ceroid-lipofuscinoses (review). **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 62 (1): 1 – 13, 2003.
- Haltia M. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present (review). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1762: 850 – 856, 2006.
- Hamberger MJ, Seidel WT, Goodman RR, Williams A, Perrine K, Devinsky O, McKhann GM. Evidence for cortical reorganization of language in patients with hippocampal sclerosis. **Brain**, 130: 2942-2950, 2007.
- Harik SI, McCracken KA. Age-related increase in presynaptic noradrenergic markers of the rat cerebral cortex. **Brain Research**, 381: 125 – 130, 1986.
- Hinds JW, McNelly NA. Aging in the rat olfactory bulb: quantitative changes in mitral cell organelles and somato-dendritic synapses. **J. Comp. Neur.**, 184: 811 – 820, 1979.
- Hirsch HE. Enzyme levels of individual neurons in relation to lipofuscin content. **J. Histochem. Cytochem.**, 18(4): 268 – 270, 1970.
- Huttenlocher PR. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. **Brain Res.**, 163 (2): 195 – 205, 1979.
- Ivy GO, Schottler F, Wenzel J, Baudry M, Lynch G. Inhibitors of lysosomal enzymes: accumulation of lipofuscin-like dense bodies in the brain. **Science**, 226: 985 – 987, 1984.
- Jung T, Bader N, Grune T. Formation, distribution, and metabolic consequences (review). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1119: 97 – 111, 2007.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **J Neurosci.**, 18 (9): 3206 – 3012, 1998.
- Koenig H. Neuronal lipofuscin in disease: its relation to lysosomes (review). **Trans. Am. Neurol. Assoc.**, 89: 212 – 133, 1964.
- Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y. Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. **J Neurosci.**, 27 (5): 1139 – 1150, 2007.
- Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis (review). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1780: 1291 – 1303, 2008.
- Landis DMD, Reese TS. Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory synapses in the cerebellar cortex. **J. Comp. Neur.**, 155: 93 – 126, 1974.
- Levine MS, Adinolfi AM, Fisher RS, Hull CD, Guthrie D, Buchwald. Ultrastructural alterations in caudate nucleus in aged cats. **Brain Research**, 440: 267 – 279, 1988.

- Llinás RR. The squid giant synapse. Oxford University Press, New York, USA, 10 – 11, 1999.
- Lopes ACP, Rosa LC, Belebony RO, Pereira RNR, Vasconcelos CAC, Moreira JE. Aspectos moleculares da transmissão sináptica. **Medicina**, 32: 167 – 188, 1999.
- Marco P, DeFelipe J. Altered synaptic circuitry in the human temporal neocortex removed from epileptic patients. **Exp. Brain. Res.**, 14: 1–10, 1997.
- Marco P, Santiago Ramón y Cajal S, DeFelipe J. Loss of Inhibitory Synapses on the soma and axon initial segment of pyramidal cells in human epileptic peritumoural neocortex: implications for epilepsy. **Brain Research Bulletin**, 44 (1): 47 – 66, 1997.
- Maglóczy Z. Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. **Epilepsy Research**, 89: 52—59, 2010.
- Maglóczy Z, Freund TF. Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus., **TRENDS in Neuroscience**, 28: 334 – 340, 2005.
- Maslinska D, Boellaard JW, Schlote W. Acid phosphatase activity in human neural and glial lipofuscin. **Acta Neuropathol.**, 64: 222 – 228, 1984.
- Matsumoto A, Okada R, Arai Y. Synaptic changes in the hypothalamic arcuate nucleus of old male rats. **Experimental Neurology**, 78: 583 – 590, 1982.
- Meredith GE, Totterdell S, Petroske E, Cruz KS, Callison Jr. RC, Lau Y-S. Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. **Brain Research**, 956: 156 – 165, 2002.
- Moor H, Pfenninger K, Akert K. Synaptic vesicles in electron micrographs of freeze-etched nerve terminals. **Science**, 164: 1405 – 1407, 1969.
- Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. **Neurobiol Aging.**, 27 (4): 645-654, 2006.
- Moreira JE, Reese TS, Kachar B: Freeze-substitution as a preparative technique for immunoelectronmicroscopy: Evaluation by atomic force microscopy. **Microscopy Research and Technique**, 33: 251 - 261, 1996.
- Moreira JE, Dodane V, Reese TS: Immunoelectronmicroscopy of soluble proteins and membrane proteins with a sensitive post embedding method. **J Histochem Cytochem.**, 46: 847 - 854, 1998.
- Moreno H, Yu E, Pigino G, Hernandez AI, Kim N, Moreira JE, Sugimori M, Llinás RR. Synaptic transmission block by presynaptic injection of oligomeric amyloid beta. **PNAS**, 106: 5901 – 5906, 2009.
- Morfini G, Pigino G, Opalach K, Serulle Y, Moreira JE, Sugimori M, Llinás RR, Brady T. 1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C. **PNAS**, 104 (7): 2442 – 2447, 2007.

- Nagy IZ. Pharmacological interventions against aging through the cell plasma membrane: a review of the experimental results obtained in animal and humans. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 959: 308 – 320, 2002.
- Nanda BS, Getty R. Lipofuscin pigment in the nervous system of aging pig. **Exp. Gerontol.**, 6: 447 - 452, 1971.
- Nanda BS, Getty R. Occurrence of aging pigment (lipofuscin) in the nucle and cortices of the canine brain. **Exp. Gerontol.**, 8: 1 – 7, 1973.
- Nandy K, Bourne GH. Effect of centrophenoxine on the lipofuscin pigments in the neurons of senile guinea-pigs. **Nature**, 5033: 313 – 314, 1966.
- Ojemann GA. Cortical organization of language. **The Journal of Neuroscience**, 11 (8): 2281 – 2287, 1991.
- Ong WY, Garey LJ. Ultrastructural characteristics of human adult and infant cerebral cortex cortical neurons. **J. Anat.**, 175: 79 – 104, 1991.
- Peters A. Golgi, Cajal, and the fine structure of nervous system (review). **Brain Research Reviews**, 55: 26 – 263, 2007.
- Porta EA. Pigments in aging: an overview (review). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 959: 57 – 65, 2002.
- Rajagopalan S, Andersen JK. Alpha synuclein aggregation: is it the toxic gain of function responsible for neurodegeneration in Parkinson's disease? **Mech Ageing Dev.**, 122 (14): 1499-510, 2001.
- Reichel W, Hollander J, Clark JH, Strehler BL. Lipofuscin pigment accumulation as a function of age and distribution in rodent brain. **J Gerontol.**, 23 (1): 71 – 8, 1968.
- Riga S, Riga D. Effects of centrophenoxine on the lipofuscin pigments in the nervous system of old rats. **Brain Research**, 72: 265 – 275, 1974.
- Rizzoli SO, Jahn R. Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. **Traffic**, 8: 1137 – 1144, 2007.
- Samorajski T, Ordy JM, Keefe JR. The fine structure of lipofuscin age pigments in the nervous system of aged mice. **J Cell Biol.**, 26(3): 779 – 795, 1965.
- Savica R, Rocca WA, Ahlskog JE. When does Parkinson disease start? **Arch Neurol.**, 67 (7): 798-801, 2010.
- Seehafer SS, Pearce DA. You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material. **Neurobiol. Aging**, 27(4): 576 – 588, 2006.

Serulle Y, Morfini G, Pigino G, Moreira JE, Sugimori M, Brady ST, Llinás RR. 1-Methyl-4-phenylpyridinium induces synaptic dysfunction through a pathway involving caspase and PKCdelta enzymatic activities. **PNAS**, 104(7): 2437-2444, 2007.

Sgobio C, Ghiglieri V, Costa C, Bagetta V, Siliquini S, Barone I, Di Filippo M, Gardoni F, Gundelfinger ED, Di Luca M, Picconi B, Calabresi P. Hippocampal synaptic plasticity, memory, and epilepsy: effects of long-term valproic acid treatment. **Biol. Psychiatry**, 67: 567 – 574, 2010.

Sobaniec-Lotowska ME. A transmission electron microscopic study of microglia/macrophages in the hippocampal cortex and neocortex following chronic exposure to valproate **Int. J. Exp. Path.**, 86; 91 – 96, 2005.

Sudhok TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. **Nature**, 375: 645 – 653, 1995.

Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle revisited. **Neuron**, 28: 317 – 320, 2000.

Szweda PA, Camouse M, Lundberg KC, Oberley TD, Szweda LI. Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems (review). **Ageing Research Reviews**, 2: 383 – 405, 2003

Thal DR, Schlote W. Ultrastructural morphometric analysis of lipofuscin in pyramidal cells of the human Ammon's horn. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, 18: 59 -77, 1994.

Toth SE. The origin of lipofuscin age pigments. **Exp Gerontol.**, 3 (1): 19 – 30, 1968.

Tripathi S, Mahdi AA, Nawab A, Chander R, Hasan M, Siddiqui MS, Mahdi F, Mitra K, Bajpai VK. Influence of age on aluminum induced lipid peroxidation and neurolipofuscin in frontal cortex of rat brain: a behavioral, biochemical and ultrastructural study. **Brain Research**, 1253: 107 – 116, 2009.

Uchizono K. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. **Nature**, 207: 642 – 643, 1965.

Uemura E. Age-related changes in prefrontal cortex of *Macaca mulatta*: synapse density. **Experimental Neurology**, 69: 164 – 172, 1980.

Yankner BA, Lu T, Loerch P. The aging brain (review). **Annu. Rev. Pathol. Mech.**, 3: 41-66, 2008.

Wang LE, Fink GR, Diekhoff S, Rehme AK, Eickhoff SB, Grefkes C. Noradrenergic Enhancement Improves Motor Network Connectivity in Stroke Patients. **Ann Neurol.**, 69 (2): 379 -388, 2011.

Wiencken-Barger A, Djukic B, Casper KB, McCarthy KD. A role for connexin 43 during neurodevelopment. **Glia**, 55: 675 – 686, 2007.

9. Anexos

1) Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP USP.....	113
2) Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	114
3) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	115



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FARMÁCIA
FMRP - RIBEIRÃO PRETO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 13 de maio de 2009

Ofício nº 1418/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“ESTUDO DAS INCLUSÕES NEURONAIS LIPOPROTÉICAS DO CÓRTEX CEREBRAL”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 286ª Reunião Ordinária realizada em 11/05/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 1990/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.


DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

SUÉLEN MERLO

PROF. DR. JORGE EDUARDO MOREIRA (Orientador)

Depto. de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos
Laboratório de Estrutura Sináptica – FMRP-USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº **059/2009**, sobre o projeto intitulado “*Estudo das inclusões neuronais lipoprotéicas do córtex cerebral*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Jorge Eduardo Moreira** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **27 de abril de 2009**.

(We certify that the protocol nº *059/2009*, about “*Study of neural lipoprotein inclusions in the cerebral cortex*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in *04/27/2009* meeting.

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2009.


Prof. Dr. Márcio Dantas
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - cirurgia de epilepsia (lobectomia temporal)

Prezado(a) Sr(a):

Estamos desenvolvendo a pesquisa: “Estudo das Inclusões Neuronais Lipoprotéicas do Córtex Cerebral”.

O córtex cerebral, é a camada mais superficial do cérebro, em torno de 2 a 4 milímetros de espessura, que contém células nervosas e gliais. Nos neurônios do córtex cerebral são encontradas inclusões constituídas de lipídios e proteínas, denominadas grânulos de lipofucsina. Os grânulos de lipofucsina são conhecidos como pigmento da idade, uma vez que seu acúmulo ocorre progressivamente durante o envelhecimento. Atualmente, tem-se estudado a associação dos grânulos de lipofucsina com doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Pretendemos coletar fragmentos corticais de pacientes de diversas idades, com o objetivo de estudarmos quais proteínas são expressas nos grânulos de lipofucsina, a fim de que possamos compreender a associação dos mesmos com o envelhecimento e com as doenças neurodegenerativas.

Durante a lobectomia, cirurgia utilizada para tratamento da epilepsia aonde é retirada uma porção do lobo temporal do cérebro, é necessário retirar pequenos fragmentos do córtex cerebral, uma vez que, como descrito anteriormente, o córtex cerebral é a região mais superficial do encéfalo, para acesso as áreas atingidas pela doença.

Assim, como nos pacientes com epilepsia, essa área cortical pode ser considerada saudável e a utilização desse fragmento não interfere com a cirurgia, gostaríamos de contar com sua autorização para, no momento de sua cirurgia para epilepsia, podermos coletar esse fragmento, que se constituirá nas amostras dos grupos desta pesquisa. O fragmento coletado será identificado com um código formado por número e letras a fim de garantir sua privacidade e identidade.

Eu, _____, _____ anos, RG nº _____ estou ciente das informações sobre a pesquisa na qual será utilizado um fragmento do meu córtex cerebral durante a minha cirurgia para tratamento de epilepsia.

Estou ciente de que a minha concordância em permitir a retirada desse material, durante a minha cirurgia para tratamento de epilepsia, não me causará nenhum dano, risco ou ônus. As minhas informações serão mantidas em sigilo e anonimato. A qualquer momento da realização da pesquisa, caso não seja mais do meu interesse, poderei recusar a participação na mesma, sem prejuízo a minha pessoa.

Concordei, portanto, voluntariamente em autorizar a remoção, durante minha cirurgia para tratamento de epilepsia, do material necessário a esse estudo, cujos resultados poderão ser publicados e/ou apresentados com objetivo científico.

Assinatura: _____

Data: _____

Pesquisador responsável: _____

Suélen Merlo

Biomédica formada pela UFCSPA

Mestranda do Programa de Neurologia/Neurociências da FMRP/USP

Telefone para contato: (16) 36023284 ou (16) 88032900 Email: suelenm@gmail.com

Artigo científico
(primeira versão)

Title Page

Aging temporal cortex: study of synapses and lipofuscin granules.

Suélen Merlo¹, Ana B. S. Nakayama², Janaína Brusco¹, Marcos A. Rossi³, Carlos G. Carlotti
Júnior⁴, and Jorge E. Moreira^{1,2}

Department of Neuroscience and Behavioral Sciences¹

Department of Cell, and Molecular Biology, and Pathogenic Bio-Agents²

Department of Pathology³, Department of Surgery and Anatomy⁴

Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo

Campus USP, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Corresponding author: Dr. Jorge Eduardo Moreira

Av. Bandeirantes 3900. Postal code: 14049-900 - Monte Alegre.

Ribeirão Preto - SP, Brazil. Phone: +55-16-36023284, E-mail: cello@fmrp.usp.br

Aging temporal cortex: study of synapses and lipofuscin granules

Abstract

Morphological and functional changes occur along aging, when increased incidence of neurodegenerative diseases are more likely possible. Following the evolution of the lipofuscin granules (LGs) in three periods of life in humans, the present work investigated synaptic changes in individuals of the different ages as: the number of excitatory, inhibitory and, electric synapses, the site of postsynaptic contacts, and the number of synaptic vesicles per active zone, following the size and features of the LGs. Some proteins representative of neurodegenerative disorders, as alfa synuclein, beta amyloid, TAU and ubuquitin, were proved by immunoblot on samples representative of the periods studied. Samples of temporal cortex of human subjects with different ages (20-28, 37-41, and 50-55 years) were collected from patients with epilepsy who underwent temporal lobectomy. Light, confocal, and electron microscopy were used as procedures. The data obtained on LGs were coincident with other studies that observed a higher area occupied by this structure in older mammals. However, the LGs seem to grow in volume, but not in number, with considerable increase of the electron lucid fraction (lipidic). Synaptic densities were similar between the groups, as well as the postsynaptic contacts. Increase of the electron dense vesicles in inhibitory synapses, are supposed to be associated with the demand for catecholamines. These results do not express the whole aging process; the age range obtained, 20 to 55 years old belongs to a young period of human life, but the progressing of the age in these samples shows already significant differences. Samples from older ages were difficult to obtain because of the general age range of patients submitted to lobectomy for epilepsy.

Keywords: human temporal cortex, lipofuscin granules, synapses, synaptic contacts, synaptic vesicles, light, confocal, and electron microscopy.

Introduction

Magnetic resonance imaging and functional studies of positron emission tomography suggest that changes associated with aging may be associated with changes in functional activation of prefrontal cortex and hippocampus. However, the pathological loss of memory, which undermines the development of routine activities, as well as marked cognitive decline would be related to changes in the medial temporal lobes (Yankner *et al.*, 2008).

For many years studies showed neuronal loss as a major factor in cognitive decline with aging, but recent studies indicate that several brain regions seem to have no significant neuronal loss (Burke, and Barnes, 2006). Neural plastic changes, such as reduction in neurogenesis and synaptic densities in some brain regions appear to be associated with the cognitive impairment of aging (Kempermann *et al.*, 1998; Montaron *et al.*, 2006). Furthermore, the LGs, seen in the cytoplasm of neurons and other cell types, are considered markers of chronological age of the cells (Seehafer and Pearce, 2006).

Studies in mammals describe reduction in synaptic density along aging (Uemura, 1980; Adams and Jones, 1982; Levine *et al.*, 1988). Other studies reported a reduction of dendritic branches and dendritic spines (Geinisman, 1979; Uemura, 1980), and others a decrease in the axo-somatic and axo-dendritic densities (Geinisman *et al.*, 1977; Matsumoto *et al.*, 1982).

The chemical synapses can be classified into excitatory, and inhibitory. Under electron microscopy, the excitatory synapses were classified by the presence of electron lucid round vesicles and asymmetric post synaptic densities, and the inhibitory synapses by the presence of electron dense pleomorphic vesicles and symmetrical post synaptic densities (Gray, 1959a; Uchizono, 1965a). The electron lucid vesicles are carriers of amino acids. The electron dense vesicles, small and large, carry out respectively neuropeptides and catecholamines (Lopes *et*

al., 1999). The post synaptic contacts can be dendrites, dendritic spines, cell bodies or axons. Unlike dendritic spines, dendrites show organelles and microtubules (Gray, 1959b).

Several studies have shown accumulation of LGs in neurons along aging, as well as the different rates of accumulation in different brain regions (Brody, 1960; Nanda and Getty, 1971; Brizzee *et al.*, 1969; Nanda and Getty, 1973; Ivy *et al.*, 1984). However, other factors such as drugs and oxidative stress alter the accumulation of this substance (Nanda and Getty, 1971; Kurz *et al.*, 2008). Although studies examining the rates of accumulation of LGs by special staining or autofluorescence (Brody, 1960; Nandy and Bourne, 1966; Reichel *et al.*, 1968; Brizzee *et al.*, 1969; Nanda and Getty, 1973; Riga and Riga, 1974; Ivy *et al.*; 1984; Gray and Woulfe, 2005) or analyze the morphology of LGs by electron microscopy (Samorajski *et al.*, 1965; Benavides *et al.*, 2002; Boellaard *et al.*, 2004), there is no comparison between these techniques.

The LGs appear to be remnants of the cellular metabolism, having lysosomal origin (Hirsch, 1970; Ivy *et al.*, 1984; Maslinska *et al.*, 1984). However, recent studies associate the LGs with cell death (Kurz *et al.*, 2008). It is important to note that there are some neurodegenerative diseases where there is accumulation of lipoprotein pigments very similar to lipofuscin. Ultrastructurally, the LGs have electron dense and lucid portions (Samorajski *et al.*, 1965; Boellaard *et al.*, 2004).

In this study, we examined the synapses in the human temporal cortex in areas around groups of neurons with different levels of cytoplasmic accumulation of LGs in three different ages.

Material and Methods

Samples of temporal cortex: samples of the cortical middle temporal gyrus were collected during lobectomies to treat patients with epilepsy that do not respond to drug therapy in the Epilepsy Center of the University Hospital of Ribeirão Preto *Campus*, University of São Paulo, between May 2009 to June 2010. The project was approved by the local Ethical Committee.

Groups: The samples were divided into three groups: 1 (20 to 28 years, n=4), 2 (37 to 41 years, n=5), and 3 (50 to 55 years, n=5). The inclusion criteria of samples were: persons with epilepsy with indication for surgical treatment of temporal lobectomy, regardless of gender or ethnicity. The exclusion criteria were: patients with presence of tumor or lesion occupying the cortical area to be harvested, patients with extra-temporal epilepsy and, patients with other diseases affecting the central nervous system.

Morphological Procedures:

Light microscopy: the samples were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH = 7.4) overnight. The fixed samples were dehydrated in alcohol, cleared in benzol and embedded in paraffin. Serial sections of 6 μm were obtained with a microtome, with an interval between sections of about 60 μm . The sections were hydrated up to 70% alcohol, and placed overnight in a saturated solution of 70% Sudan Black overnight. The next day, the sections were differentiated in 70% alcohol, rinsed in distilled water and mounted in glycerol.

Electron microscopy: the samples were fixed in 2% paraformaldehyde plus 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH = 7.4) overnight. Post fixation was done for 24 hours in a solution of 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, in glass

scintillation vials on ice protected from light, washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer followed by rinses in 0.1 M sodium acetate buffer (pH = 5.0), and transferred to a 2% uranyl acetate solution in sodium acetate buffer overnight, shaking in cold. The next day, the samples were washed in 0.1M sodium acetate buffer, dehydrated in alcohol and placed in propylene oxide. The samples were progressively infiltrated in Embed 812 resin (Electron Microscopy Sciences, USA) with propylene oxide: resin, in concentrations 1:1 for 6 hours, 2:1 overnight, 3:1 for 6 hours and 100 % resin overnight. The infiltrated blocks of tissue were placed on EM molds with fresh resin and baked at 60°C for to polymerize for 36 hours, and sectioned with an ultramicrotome (UCT, Leica, Germany). Semi-thin sections (500 nm), stained with toluidine blue, were used to choose, under light microscopy, the cortical areas with neurons representative of the problem in focus. The chosen areas were retrimmed and ultrathin sections (60 nm) were done, and mounted on single hole copper grids (SynapTek™-NOTCH IN Grids, 1 x 2 mm slot, Beryllium-Copper, Ted Pella, CA) coated with Pyoloform (Ted Pella, CA). The sections were contrasted with uranyl acetate, and lead citrate, and photographed in the electron microscope (Zeiss EM-108, Germany).

Three-dimensional reconstruction by electron microscopy: one representative LG of human the human temporal cortex of group 3 (50 to 55 years) processed as previously described was reconstructed by the superposition of 19 ultrathin serial sections of 80 nm. The digital images of each section were three-dimensionally reconstructed with the help of the Software Reconstruct™ (Witcher *et al.*, 2010) of Dr. Kristen Harris (University of Texas, USA).

Confocal microscopy: samples were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH = 7.4) overnight. Sections 150 µm-thick were cut in a vibratome (VT1000S, Leica, Germany), and incubated for 5 minutes with DAPI (Sigma, USA - 0.13 ml DAPI in 6.25 ml PBS, nuclear stain). The sections on the slides were mounted with

Fluoromount (Fluoromount EMS, USA), and viewed in a Leica SP5 confocal microscope (Germany) with an argon laser.

Data analysis:

Sudan Black in Light microscopy: the ratio between the area of LGs and, the area of the neuronal body were analyzed. With the Leica QWin Software V 3.2.0 were counted 150 pyramidal and/or granular neurons with 400x magnification by section, and 3 sections by sample in the I to VI cortical layers. For the measurements, the cell body from pyramidal neurons to be considered had to be in full section across the nuclei and showing the apical dendrite; for the granular neurons the nucleus had to be seen at large. The size of the groups consisted of 4 to 5 samples (n=4/5).

Electron microscopy:

Lipofuscin granules: were analyzed: 1) the ratio between the area of LGs and the neuronal cytoplasm; 2) the ratio between the area of LGs and the area of the neuronal body; 3) the number of LGs per neuron; 4) the number of electron lucid portions per neuron, because was the most variable along the aging, and 5) the percentage of electron lucid and electron dense portions of the LGs. Were analyzed 20 pyramidal and/or granular neurons by sample on the cortical layers II to IV (n=4/5).

Synapses: the density of synapses (approximately 100 synapses per sample), the percentage of excitatory and, inhibitory synapses, the site of contact post-synaptic, the number and morphology of synaptic vesicles, the vesicles docked or fused to membrane and, the number of clathrin coated vesicles in relation to axonal terminal were analyzed (n=3/4). Were analyzed with the *software Image J* (NIH, EUA).

Three-dimensional reconstruction by electron microscopy: the structure, and the volume of LGs in neuronal structure were analyzed (one sample of group 3).

Confocal microscopy: was analyzed the autofluorescence of LGs (n=1).

The results were examined by the Kruskal Wallis test, followed by Dunn post hoc (software Statistica® for Windows 10.0). The significant level used was $p > 0.05$. In the tables the results were expressed as average and standard deviation in order to facilitate the comparison of the data with other studies.

Results

Lipofuscin granules:

Sudan Black: the age variable influences the area of LGs in neurons of the temporal cortex. The ratio between the area of the LGs, and neuronal area of the body was higher in samples from group 3 compared to group 1 ($H(2, n = 14) = 9.50, p < 0.01$). There was no significant difference between the surface of neuronal bodies of the neurons analyzed in the different experimental groups ($H(2, n = 14) = 0.27, p > 0.05$).

Electron microscopy: the age variable influenced the area of LGs in neurons of temporal cortex. The ratio between the area of the LGs and the area of the neuronal cytoplasm was higher in samples from group 3 compared with group 1 ($H(2, n = 14) = 8.54, p = 0.01$). The ratio between the area of the LGs and the neuronal area of the cell bodies was also higher in the samples from group 3 compared to group 1 ($H(2, n = 14) = 10.05, p < 0.01$). The number of LGs in neurons of the temporal cortex was identical in the different experimental groups ($H(2, n = 14) = 3.26, p > 0.05$). Moreover, the number of lipid portions per neuron was higher in samples from group 3 than from group 1 ($H(2, n = 14) = 8.09, p < 0.05$). The percentage of the electron dense portions (protein) and electron lucid (lipid) portions compared to the total area of the LGs differed between the experimental groups. The electron dense portion was lower in the group of older samples ($H(2, n = 14) = 6.35, p < 0.05$). Conversely, the percentage of the electron lucid fraction was lower in younger subjects ($H(2,$

$n = 14$) = 6.35, $p < 0.05$). The neuronal section area was the same between groups. (H (2, $n = 14$) = 1.65, $p > 0.05$).

Three-dimensional reconstruction of LGs by electron microscopy: The 3D reconstruction shows an electron dense central area and two electron lucid peripheral portions. Also there are indentations in the LGs. The reconstructed granule has approximately 15.2 micrometers long.

Confocal microscopy: The autofluorescence of the LGs was visualized with an argon laser: 488 - 620 nm. The nuclei were labeled with DAPI and revealed by illumination with an argon laser: 405 - 490 nm.

Synapses:

Electron microscopy: There were no differences in the ratio between the number of synapses, and the total area examined (H (2, $n = 10$) = 3.03, $p > 0.05$); neither in the ratio between the area of the presynaptic terminal, and the total area analyzed (H (2, $n = 10$) = 1.18, $p > 0.05$). Regarding excitatory synapses, the group 2 had a lower percentage than group 1 (H (2, $n = 10$) = 8.02, $p < 0.05$). The inhibitory synapses showed no statistical differences between individuals or experimental groups (H (2, $n = 10$) = 1.18, $p > 0.05$); as well as electrical synapses (H (2, $n = 10$) = 5.25, $p = 0.07$). There were no statistical difference in the percentage of excitatory synapses occurring on dendrites (H (2, $n = 10$) = 0.64, $p > 0.05$); dendritic spines (H (2, $n = 10$) = 0.16, $p > 0.05$); axon (H (2, $n = 10$) = 2.36, $p > 0.05$); and cell body (H (2, $n = 10$) = 0.96, $p > 0.05$). Similarly, the percentage of inhibitory synapses on dendrites (H (2, $n = 10$) = 3.16, $p > 0.05$); dendritic spines (H (2, $n = 10$) = 1.14, $p > 0.05$); axon (H (2, $n = 10$) = 4.71, $p = 0.10$), and cell body (H (2, $n = 10$) = 0.03, $p > 0.05$) showed not statistical differences. The excitatory synapses did not differ between experimental groups on the following aspects: ratio between the number of vesicles electron lucid, and area of the

presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 0.89, p > 0.05$); ratio between the number of electron dense vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 0.20, p > 0.05$); ratio between the number of round vesicles electron lucid, and the area of presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 0.89, p > 0.05$); the ratio between the number of electron-lucid pleomorphic vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 5.44, p > 0.05$); ratio between the number of electron dense small vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 2.09, p > 0.05$); ratio between the number of large electron dense vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 0.12, p > 0.05$); the ratio between the number of docked, and fused vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 1.80, p > 0.05$); the ratio between the number of clathrin coated vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 1.65, p > 0.05$). Inhibitory synapses on the following variables did not differ between experimental groups: the ratio between the number of electron lucid vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 0.20, p > 0.05$); the ratio between the number of round vesicles electron lucid, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 1.86, p > 0.05$); the ratio between the number of electron-lucid pleomorphic vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 3.03, p > 0.05$); the ratio of the number of large electron dense vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 5.93, p = 0.05$); the ratio between the number of docked and fused vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 0.23, p > 0.05$); the ratio between the number of clathrin coated vesicles and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 1.65, p > 0.05$). However, the ratio between the number of electron dense vesicles, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 7.04, p < 0.05$); and the ratio between the number of small vesicles electron dense, and the area of the presynaptic terminal ($H(2, n = 10) = 6.46, p < 0.05$) were higher in samples of the group 3 than group 1.

Discussion

Studies investigated the LGs using colorimetry and light microscopy or scanning the autofluorescence of LGs (Brody, 1960; Nandy and Bourne, 1966; Brizzee *et al.*, 1969; Nanda and Getty, 1973; Ivy *et al.*, 1984). Other authors studied ultrastructural aspects of the LGs (Samorajski *et al.*, 1965, Benavides *et al.*, 2002; Boellaard *et al.*, 2004). In this study, we performed a wider analysis of LGs.

The area occupied by LGs of neurons in the human temporal cortex was higher in the older group than in the younger. It was observed that the ratio between the area of the LGs and the cell body of neurons in the human temporal cortex had very similar values to be examined by Sudan Black staining and light microscopy (average: group 1 = 3.18%, group 2 = 4.31%, and group 3 = 7.47%) or by electron microscopy (average: group 1 = 3.13%, group 2 = 4.88%, and group 3 = 7.60%). The increase in the area of LGs in the elderly mammalian cells were reported by several authors in the literature investigating not only the cortex, but other brain structures (Brody, 1960; Nandy and Bourne, 1966; Brizzee *et al.*, 1969, Nanda and Getty, 1973; El-Ghazzawi and Malatya, 1975; Benavides *et al.*, 2002; Boellaard *et al.*, 2004). The analyzed neuronal area was equivalent between the groups.

Although the area of LGs is higher in older subjects, there were no changes in the number of LGs per neuron. Thal and Schlote (1994) suggested that it may be fusion of the LGs. High levels of oxidative stress are related to the accumulation of LGs (Szweda, 2003; Jung *et al.*, 2007; Kurz, 2008), and there is an increase of reactive oxygen species with aging (Yankner *et al.*, 2008).

Another result is the increase of the electron lucid portion and reduction of the electron dense portion with aging. Thal and Schlote (1994) obtained similar results studying neurons in the layers of the Ammon's Horn (CA1, CA2, CA3. and CA4) of individuals at ages 20, 40, 60, and 80 years.

The present study examined the LGs of three groups of subjects between 20 and 55 years old, in neurons of the middle temporal gyrus, the electron dense portion, although smaller in older participants, it was always over 60% of the LGs. Thal and Schlote (1994) observed, unlike seen in this study, that the electron dense portion was lower in older subjects, however this portion was always less than 50% of the area of LGs in CA2, CA3 and CA4. In CA1 was similar to that observed in our study.

These results are consistent with Boellaard and colleagues (2004) who observed in pyramidal neurons of the hippocampus in different species, two ultrastructural patterns: CA1 with small lipid droplets, and large portion pigmented, and CA3/CA4 with large lipid droplets and a small portion pigmented. Thal and Schlote (1994) suggested that the condensation of the neutral lipid component of the electron lucid part from the granular matrix could be associated with disproportionate growth of the fractions, with increased lipid portion with age, since free radicals, and lipid peroxidation are responsible for the formation of LGs. Another interesting fact is that it is quite clear the lysosomal nature of the electron dense portion. Masliska and colleagues (1984) observed that only the electron dense portion is positive for acid hydrolases.

In this study the LGs ranged from 0.5 to 3 microns in diameter (similar to observed by Samorajski *et al.*, 1965; and Ivy *et al.*, 1984 in mouse, and rats). However, the three-dimensional reconstruction of serial sections 80 nm-thick of a 1 μ m LG in diameter showed an elongated shape of about 15 micrometers long. This kind of reconstruction is going to be very helpful for the study of the volumes and significance of the LGs.

The autofluorescence of LGs was visualized by confocal microscopy with an argon laser: 488-620 nm. Light microscopy studies show the excitation spectrum between 320 and 480 nm and emission between 460 and 630 nm (Seehafer and Pearce, 2006).

Cells with apoptotic appearance showed the cytoplasm full of LGs. A graded darkness of neuronal somas can be noticed with a progressive filling of the LGs. Post-mitotic cells, mostly senescent, may exhibit reduced degradation of the autophagic-lysosomal process, resulting in mitochondrial damage leading to an increased oxidative stress and apoptosis (Kurz *et al.*, 2008). Therefore, the accumulation of LGs in neurons may mean cellular aging due to the reasons described above.

The original aim of this work, to establish an early relationship between proteins related to neurodegenerative disorders and the LGs, as alfa synuclein, beta amyloid, TAU, and ubiquitin, was not proven in the period studied. But it has to be considered the general young years of the three groups, being the oldest 55 years old.

Studies in mammals observed decrease in the number of synapses in older individuals (Geinisman *et al.*, 1977; Uemura, 1980; Adams and Jones, 1982; Matsumoto *et al.*, 1982; Levine *et al.*, 1988). In this study, we analyzed brains of individuals between 20 and 55 years old, and were no changes in the number of synapses and the presynaptic terminal areas analyzed. Huttenlocher (1979) examined the synaptic density in layer 3 of the middle frontal gyrus, from infants to individuals 90 years of age. The author observed that the synaptic density reached the maximum age from 1 to 2 years. Furthermore, the author observed that the synaptic density was constant in this region between the ages of 16 to 72 years, but declined markedly in individuals 74 to 90 years old. This data is consistent with the results in the period studied by us. The reduction in the number of synapses should be related to the cognitive decline, which seems to occur in individuals older than 60 years, as well as the age frequency for neurodegenerative diseases like Parkinson's and Alzheimer's (Yankner *et al.*, 2008).

Hinds and McNelly (1979) observed a greater number of somato-dendritic synapses in the olfactory bulb of rats with 24 months than in 3 months of age. Furthermore, a greater number of synapses found in rats of 24 months than in animals 30 months of age. The authors explain these results suggesting that in adults occurs the formation of new synapses, something less likely in the elderly. This observation coincides with the general opinion of neuroscientists on a continuous maturation of human brain activity in adulthood, although with variabilities dependent on several factors including cultural and social aspects. Hinds and McNelly (1979) observed even greater amount of LGs in aged than in younger animals.

The results of Huttenlocher (1979), and Hinds and McNelly (1979) suggest that the adult brain may form new synapses, but less in the older age. The determination of a chronological age to distinguish the onset of aging among different species is rather questionable; environmental and genetic factors may suggest different biological ages. Thus, our data confirms the results of these authors, since no differences in synaptic density or postsynaptic local contact were observed between the various experimental groups. In this study, LGs served as markers of cellular aging, since they were seen occupying the largest area of neuronal soma in older samples. There were no other comparable morphological differences besides the increasing shape of LGs with age.

In this work, although no significant difference in number of synapses, we observed a lower percentage of excitatory synapses in the group 2 of human cortical samples (37-42 y/o) than in the younger one. Adams and Jones (1982) observed in rats that only asymmetric synapses decline with age.

The morphology of synaptic vesicles in excitatory synapses was unchanged. Inhibitory synapses showed higher number of electron dense vesicles in the older when compared to the younger group. The differences were observed in relation to small electron

dense vesicles ($p < 0.05$), however there was a strong trend in relation to large electron dense vesicles ($p = 0.05$). The increase of electron dense vesicles would be explained by the changes in the number of catecholamine transporting vesicles (small electron dense vesicles), and possibly neuropeptidergic transporting vesicles (large electron dense vesicles).

Harik and McCracken (1986), found in the cerebral cortex of rats, higher levels of noradrenaline and, increased activity of tyrosine hydroxylase in older animals (28 to 29 months) than younger (3-4 months). The authors state that these results contradict several studies that describe noradrenergic decline in experimental models in rodents. The researchers suggest that these discrepancies are due to the different regions examined, others have looked at regions with higher concentrations of catecholamines, such as the hypothalamus and subcortical regions, while the study of Harik e McCracken (1986) studied the cerebral cortex of rats. Wang and colleagues (2010) found that single oral dose of 6mg of reboxetine, a selective inhibitor of norepinephrine reuptake, in patients with stroke, showed improvement in their motor function. We suggest that increased catecholamine neurotransmitters such as norepinephrine, may be due to compensatory mechanisms for loss of motor function observed with aging.

Besides the fact that the maximum ages studied, from 50 to 55 years, still represent individual youths, two other important factors should be highlighted in this study: first, the samples of human temporal cortex of patients with epilepsy who underwent temporal lobectomy and, secondly, the various medications used for treatment of seizures. The synaptic reorganization has been studied as a potential mechanism for increased excitability in hippocampal pathways in mesial temporal lobe epilepsy (Cavazos and Cross, 2006). Sprouting compensatory axons containing neuropeptide Y are observed in tissues of patients with epilepsy (Maglóckzy and Freund, 2005). In this study strong trend to higher number of large vesicles electron dense was observed in the older group compared to the younger group.

This increase may be related to remodeling of the temporal cortex in individuals with epilepsy. However, as in all groups, the samples were similar, suggesting that aging can also have a role in increasing of neuropeptide vesicles. Sgobio and colleagues (2010) observed in normal mice that chronic treatment with valproic acid induced dendritic changes, and led to non-spatial memory impairment. The authors observed numerous structures like LGs and lipid droplets in the cells. Therefore, both the aging factor, such as use of medications such as valproic acid, may influence the accumulation of LGs in older participants.

The attempt to use the LGs as a marker of cellular aging in the temporal cortex was partly achieved. The morphological association of LGs with synaptic modifications with aging showed changes in catecholaminergic vesicles without changing the synaptic number. Comparative analysis among different animal species, as well as three-dimensional reconstruction of neuronal structures can bring new information about the interaction between different cellular structures. Also is important to remember that synapses are established, and destroyed in our brain every day, every second (Llinás, 1999), and because of this, these studies are so important and complicated.

Acknowledgments: This research was supported by FAPESP, CNPq, and FAEPA

References

- Adams I, Jones DG. Quantitative ultrastructural changes in rat cortical synapses during early, mid and, late adulthood. **Brain Research**, 239: 349 – 363, 1982.
- Benavides SH, Monserrat AJ, Farina S, Porta EA. Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, 34: 219 - 231, 2002.
- Boellaard JW, Schlote W, Hofer W. Species-specific ultrastructure of neuronal lipofuscin in hippocampus and neocortex of subhuman mammals and humans. **Ultrastruct Pathol.**, 28 (5-6): 341 - 351, 2004.
- Brizzee KR, Cancilla PA, Sherwood N, Timiras PS. The amount and distribution of pigments in neurons and glia of the cerebral cortex. **J Gerontol.**, 24(2): 127 – 135, 1969.
- Brody H. The deposition of aging pigment in the human cerebral cortex. **J. Gerontol.**, 15: 258-261, 1960.
- Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain (review). **Nature Reviews Neuroscience**, 7: 30 – 39, 2006.
- Cavazos JE, Cross DJ. The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy (review). **Epilepsy Behav.**, 8 (3): 483-93, 2006.
- El-Ghazzawi EF, Malaty HÁ. Electron microscopic observations on extraneuronal lipofuscin in the monkey brain. **Cell Tiss. Res.**, 161: 555 – 565, 1975.
- Geinisman Y, Bondareff W, Dodge JT. Partial deafferentation of neurons in the dentate gyrus of the senescent rat. **Brain Research**, 134: 541 – 545, 1977.
- Geinisman Y. Loss of axosomatic synapses in the dentate gyrus of aged rats. **Brain Research**, 168: 485 – 492, 1979.
- Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopy study. **Journal of Anatomy**, 93: 420 – 433, 1959a.
- Gray EG. Electron microscopy of synaptic contacts on dendritic spines of the cerebral cortex. **Nature**, 183: 1592 – 1593, 1959b.
- Gray DA, Woulfe J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste (review). **Sci Aging Knowledge Environ.**, 2005 (5): re1.
- Harik SI, McCracken KA. Age-related increase in presynaptic noradrenergic markers of the rat cerebral cortex. **Brain Research**, 381: 125 – 130, 1986.
- Hinds JW, McNelly NA. Aging in the rat olfactory bulb: quantitative changes in mitral cell organelles and somato-dendritic synapses. **J. Comp. Neur.**, 184: 811 – 820, 1979.

- Hirsch HE. Enzyme levels of individual neurons in relation to lipofuscin content. **J. Histochem. Cytochem.**, 18(4): 268 – 270, 1970.
- Huttenlocher PR. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. **Brain Res.**, 163 (2): 195 – 205, 1979.
- Ivy GO, Schottler F, Wenzel J, Baudry M, Lynch G. Inhibitors of lysosomal enzymes: accumulation of lipofuscin-like dense bodies in the brain. **Science**, 226: 985 – 987, 1984.
- Jung T, Bader N, Grune T. Formation, distribution, and metabolic consequences (review). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1119: 97 – 111, 2007.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **J Neurosci.**, 18 (9): 3206 – 3012, 1998.
- Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis (review). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1780: 1291 – 1303, 2008.
- Levine MS, Adinolfi AM, Fisher RS, Hull CD, Guthrie D, Buchwald. Ultrastructural alterations in caudate nucleus in aged cats. **Brain Research**, 440: 267 – 279, 1988.
- Llinás RR. The squid giant synapse. Oxford University Press, New York, USA, 10 – 11, 1999.
- Lopes ACP, Rosa LC, Belebony RO, Pereira RNR, Vasconcelos CAC, Moreira JE. Aspectos moleculares da transmissão sináptica. **Medicina**, 32: 167 – 188, 1999.
- Maglóckzy Z, Freund TF. Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. **TRENDS in Neuroscience**, 28: 334 – 340, 2005.
- Maslinska D, Boellaard JW, Schlote W. Acid phosphatase activity in human neural and glial lipofuscin. **Acta Neuropathol.**, 64: 222 – 228, 1984.
- Matsumoto A, Okada R, Arai Y. Synaptic changes in the hypothalamic arcuate nucleus of old male rats. **Experimental Neurology**, 78: 583 – 590, 1982.
- Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. **Neurobiol Aging.**, 27 (4): 645-654, 2006.
- Nanda BS, Getty R. Lipofuscin pigment in the nervous system of aging pig. **Exp. Gerontol.**, 6: 447 - 452, 1971.
- Nanda BS, Getty R. Occurrence of aging pigment (lipofuscin) in the nucle and cortices of the canine brain. **Exp. Gerontol.**, 8: 1 – 7, 1973.
- Nandy K, Bourne GH. Effect of centrophenoxine on the lipofuscin pigments in the neurons of senile guinea-pigs. **Nature**, 5033: 313 – 314, 1966.

- Reichel W, Hollander J, Clark JH, Strehler BL. Lipofuscin pigment accumulation as a function of age and distribution in rodent brain. **J Gerontol.**, 23 (1): 71 – 8, 1968.
- Riga S, Riga D. Effects of centrophenoxine on the lipofuscin pigments in the nervous system of old rats. **Brain Research**, 72: 265 – 275, 1974.
- Samorajski T, Ordy JM, Keefe JR. The fine structure of lipofuscin age pigments in the nervous system of aged mice. **J Cell Biol.**, 26(3): 779 – 795, 1965.
- Seehafer SS, Pearce DA. You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material. **Neurobiol. Aging**, 27(4): 576 – 588, 2006.
- Sgobio C, Ghiglieri V, Costa C, Bagetta V, Siliquini S, Barone I, Di Filippo M, Gardoni F, Gundelfinger ED, Di Luca M, Picconi B, Calabresi P. Hippocampal synaptic plasticity, memory, and epilepsy: effects of long-term valproic acid treatment. **Biol. Psychiatry**, 67: 567 – 574, 2010.
- Szweda PA, Camouse M, Lundberg KC, Oberley TD, Szweda LI. Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems (review). **Ageing Research Reviews**, 2: 383 – 405, 2003.
- Thal DR, Schlote W. Ultrastructural morphometric analysis of lipofuscin in pyramidal cells of the human Ammon's horn. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, 18: 59 -77, 1994.
- Uchizono K. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. **Nature**, 207: 642 – 643, 1965.
- Uemura E. Age-related changes in prefrontal cortex of *Macaca mulatta*: synapse density. **Experimental Neurology**, 69: 164 – 172, 1980.
- Yankner BA, Lu T, Loerch P. The aging brain (review). **Annu. Rev. Pathol. Mech.**, 3: 41-66, 2008.
- Wang LE, Fink GR, Diekhoff S, Rehme AK, Eickhoff SB, Grefkes C. Noradrenergic Enhancement Improves Motor Network Connectivity in Stroke Patients. **Ann Neurol.**, 69 (2): 379-388, 2011.
- Witcher MR, Park YD, Lee MR, Sharma S, Harris KM, Kirov SA. Three-dimensional relationships between perisynaptic astroglia and human hippocampal synapses. **Glia**, 58 (5): 572-587, 2010.

Tables Legends:

Table 1: LGs with Sudan Black

Table 2: LGs with Electron Microscopy

Table 3: Number and quality of the synapses

Table 4: Distribution of the post synaptic contacts in excitatory synapses

Table 5: Distribution of the post synaptic contacts in inhibitory synapses

Table 6: Morphology of vesicles in excitatory synapses

Table 7: Morphology of vesicles in inhibitory synapses

Table 1:

LGs: Sudan Black	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
LGs area/Soma area	3,17 ± 0,73	4,31 ± 0,99	7,47 ± 2,33*
Soma area	361,60 ± 59,78	334,88 ± 35,34	335,51 ± 48,86

* p < 0.05 in relation to group 1

Table 2:

LGs: Electron microscopy	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
LGs area/Cytoplasm area	3,13 ± 0,68	4,88 ± 1,63	7,60 ± 2,19*
LGs area/Soma area	1,80 ± 0,53	2,75 ± 0,75	4,79 ± 1,63*
LGs number	7,81 ± 2,32	7,89 ± 1,57	9,91 ± 1,74
Lipidic portions number	4,33 ± 0,91	5,82 ± 2,48	11,25 ± 5,25*
Protein portion (%)	81,10 ± 5,85	75,36 ± 4,32	64,65 ± 10,15*
Lipidic portion (%)	18,90 ± 5,85	24,64 ± 4,32	35,35 ± 10,15*
Soma area	109,44 ± 20,75	110,07 ± 21,83	128,24 ± 24,60

* p < 0.05 in relation to group 1

Table 3:

Synapses	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Synapses number/analyzed area	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,08	0,15 ± 0,02
Presynaptic terminal area/analyzed area	0,03 ± 0,008	0,02 ± 0,006	0,03 ± 0,005
Excitatory synapses	92,42 ± 1,24	79,38 ± 4,77*	88,10 ± 1,47
Inhibitory synapses	6,26 ± 0,65	10,88 ± 1,70	8,56 ± 2,87
Electric synapses	1,32 ± 1,53	9,77 ± 4,77	3,34 ± 1,55

* p < 0.05 in relation to group 1

Table 4:

Post synaptic contact in excitatory synapses	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Dendrites	47,44 ± 11,21	42,43 ± 12,94	43,16 ± 9,54
Dendritic spines	50,83 ± 13,60	54,64 ± 14,17	51,00 ± 8,47
Axon	1,73 ± 3,00	2,44 ± 2,25	5,19 ± 3,13
Cell body	0,00 ± 0,00	0,49 ± 0,85	0,65 ± 1,30

No significant differences between the groups

Table 5:

Post synaptic contact in inhibitory synapses	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Dendrites	83,33 ± 16,67	57,58 ± 18,12	73,13 ± 10,10
Dendritic spines	0,00 ± 0,00	4,17 ± 7,22	2,08 ± 4,16
Axon	11,11 ± 9,62	38,26 ± 11,38	19,24 ± 13,15
Cell body	5,56 ± 9,62	0,33 ± 0,58	5,55 ± 11,11

No significant differences between the groups

Table 6:

Vesicles number in excitatory synapses/ pre-synaptic terminal area	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Electron lucid	180,09 ± 108,40	256,34 ± 12,42	215,44 ± 61,13
Electron dense	0,61 ± 0,45	0,38 ± 0,03	0,75 ± 0,53
Electron lucid round	175,73 ± 104,29	242,26 ± 16,45	208,77 ± 58,72
Electron lucid pleomorphic	4,37 ± 4,20	14,08 ± 4,14	6,67 ± 3,25
Electron dense small	0,16 ± 0,11	0,12 ± 0,08	0,28 ± 0,29
Electron dense large	0,45 ± 0,46	0,25 ± 0,09	0,46 ± 0,41
Docked and fused	11,65 ± 6,65	12,36 ± 4,87	7,58 ± 2,61
Clathrin coated	1,88 ± 1,52	1,69 ± 1,10	3,57 ± 3,00

No significant differences between the groups

Table 7:

Vesicles number in inhibitory synapses/ pre-synaptic terminal area	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Electron lucid	120,18 ± 46,64	199,81 ± 49,68	165,04 ± 67,34
Electron dense	0,16 ± 0,28	0,44 ± 0,13	1,59 ± 0,57*
Electron lucid round	87,36 ± 34,99	148,13 ± 42,16	117,44 ± 56,84
Electron lucid pleomorphic	32,82 ± 11,84	51,68 ± 8,08	47,60 ± 11,92
Electron dense small	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,25	0,70 ± 0,45*
Electron dense large	0,16 ± 0,28	0,11 ± 0,18	0,89 ± 0,41 [#]
Docked and fused	3,51 ± 2,57	7,45 ± 4,94	1,26 ± 0,96
Clathrin coated	1,55 ± 2,34	1,15 ± 0,77	1,64 ± 1,84

* p < 0.05 in relation to group 1, # p = 0.05 in relation to group 1

Figure Legends:

Figure 1: LGs (next to asterisks). Electron lucid (red arrow) and dense (black arrow) portions of a LG. Human temporal cortex. Left: group 1 (20 to 28 years). Right: Group 3 (50 to 55 years). Observe that the portion of the electron lucid of LGs in group 3 is larger than in group 1. There are no significant differences in the number of LGs between the two groups.

Figure 2: Three-dimensional reconstruction of a LG of a human temporal cortex neuron from group 3 (reconstruction of 19 serial sections 80 nm thick). The green area corresponds to the electron dense part and in yellow the electron lucid portions.

Figure 3: Autofluorescence of LGs (red) viewed by confocal microscopy using an argon laser 488 - 620 nm. The nuclei are stained with DAPI (blue, argon laser: 405 - 490 nm). Reconstruction of 32 sections of 0.6 micrometers. Sample from a human cortex slice of group 2 (37 to 41 years).

Figure 4: Excitatory synapses: round vesicles and asymmetric postsynaptic densities (black asterisk) on dendritic spine. Observe microtubules in the dendrite, before the formation of the spine (black arrows). Electrical synapse (red arrow).

Figure 5: A. Excitatory synapses: round vesicles and asymmetric postsynaptic density (black asterisk). **B.** Inhibitory synapses: pleomorphic vesicles and symmetric postsynaptic density (red asterisk). The pointed synapse has synaptic contact with a dendrite (microtubules presented).

Figure 1

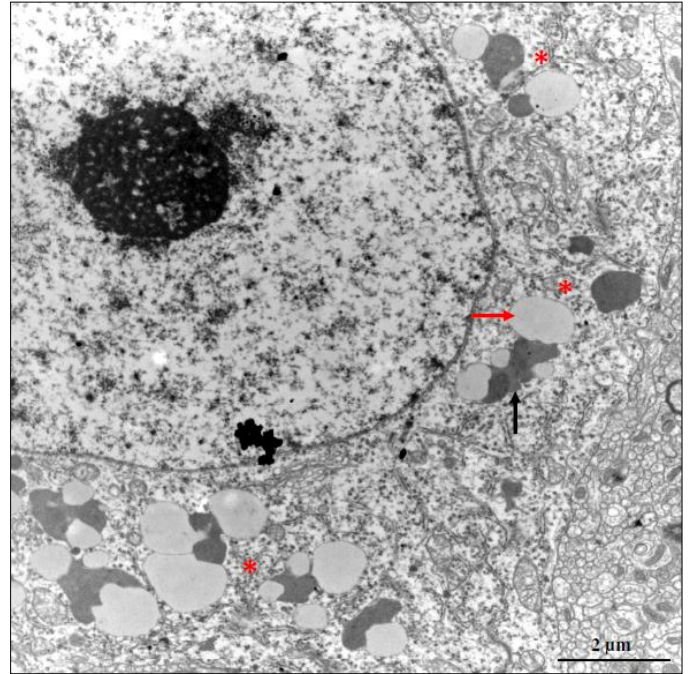
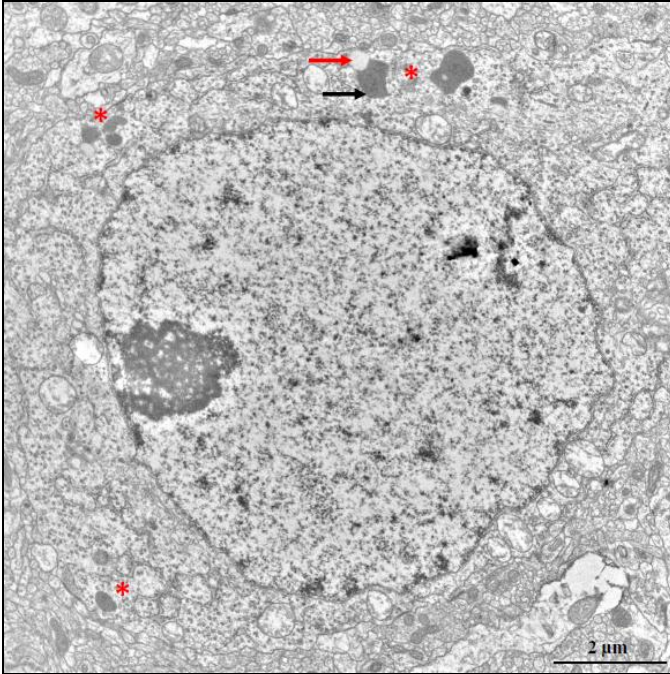


Figure 2

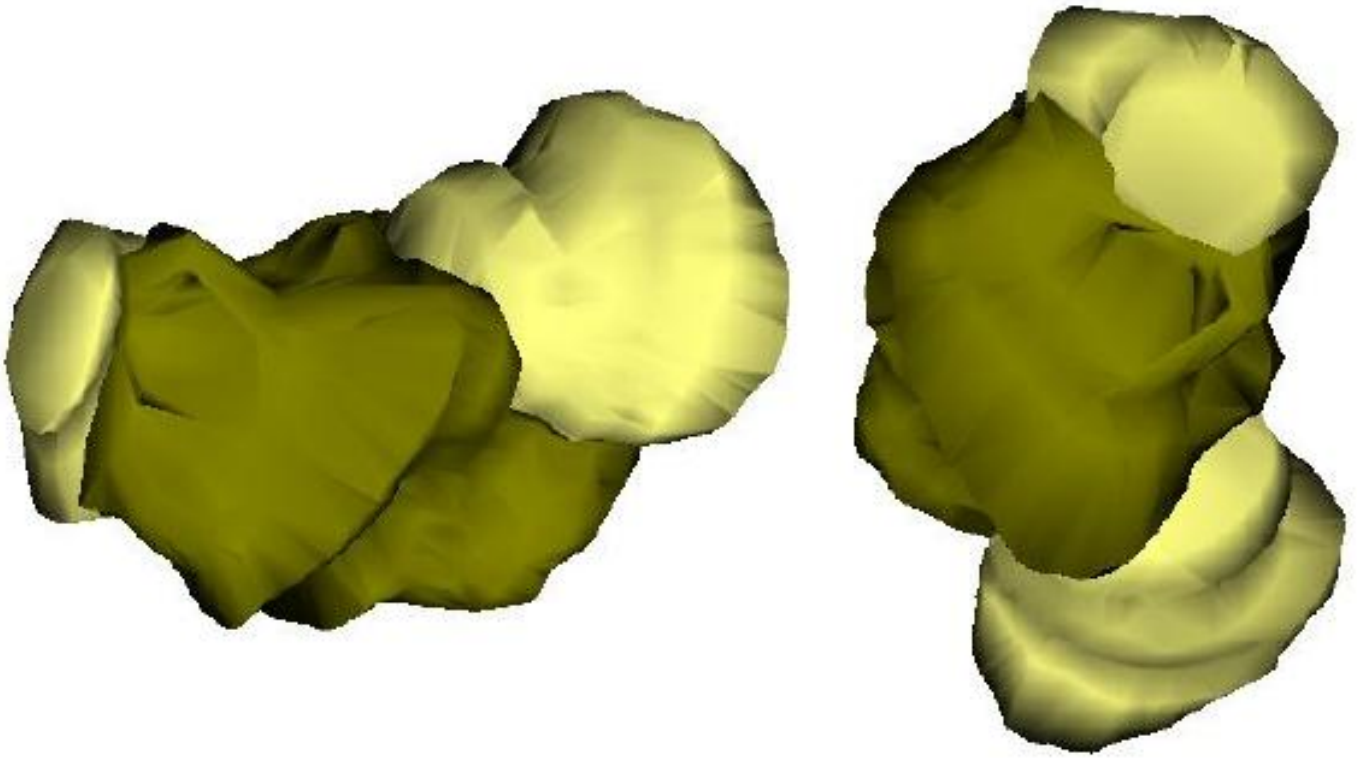


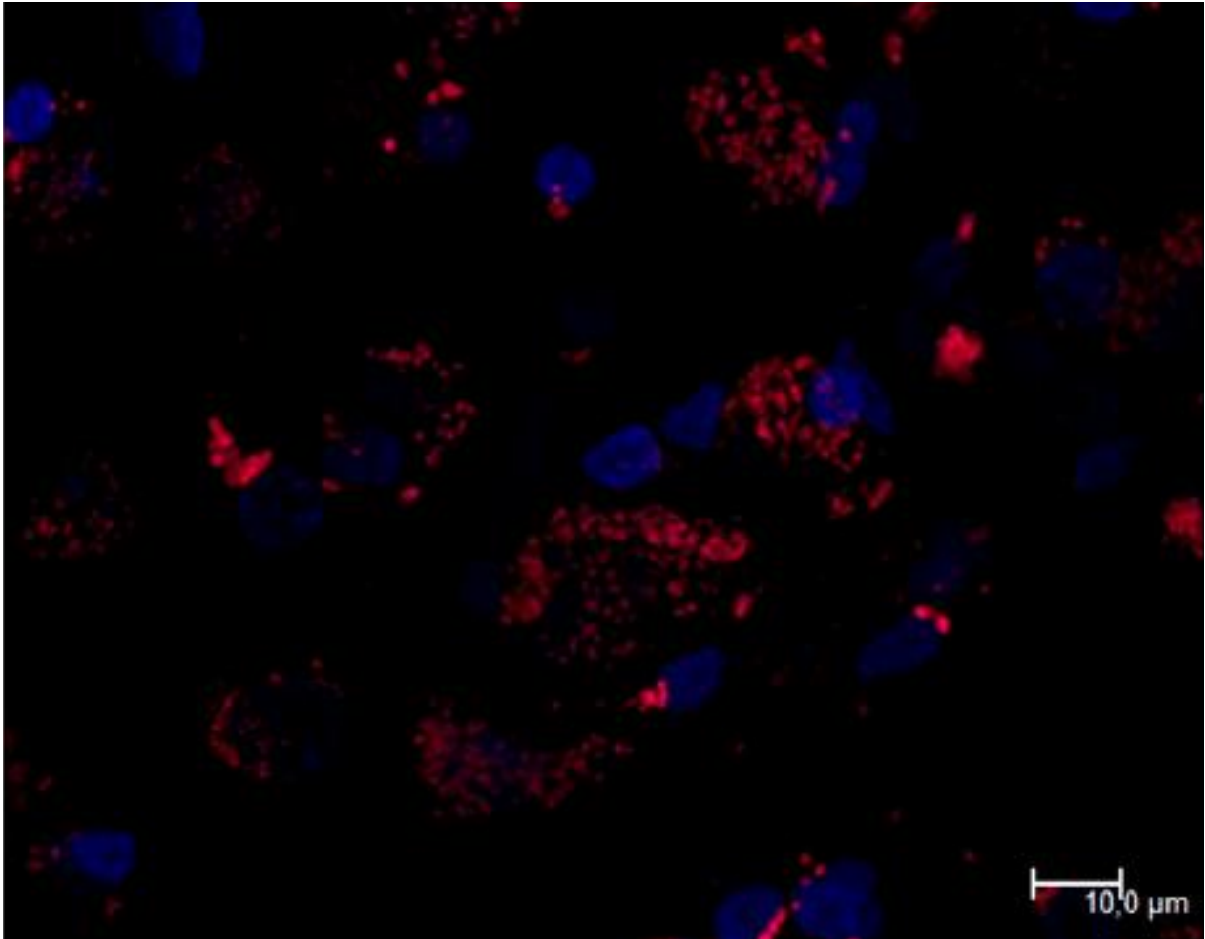
Figure 3

Figure 4

