

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

RAFAELA DO ROSÁRIO FLORINDO PESTANA

GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E MORTE
NEURONAL NO MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL
INDUZIDO POR PILOCARPINA EM RATOS

SÃO PAULO
2010

RAFAELA DO ROSÁRIO FLORINDO PESTANA

Geração de espécies reativas de oxigênio e morte neuronal no
modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina em
ratos

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo como exigência parcial para
obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Luiz Roberto Giorgetti de Britto

SÃO PAULO
2010

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

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Pestana, Rafaela do Rosário Florindo.

Geração de espécies reativas de oxigênio e morte neuronal no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina em ratos / Rafaela do Rosário Florindo Pestana; orientador Luiz Roberto Giorgetti de Britto. -- São Paulo, 2010.

75 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Epilepsia 2. Neurodegeneração 3. Espécies reativas de oxigênio 4. Pilocarpina I. Título.

RC372.A4



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: icb@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **137** nas fls. **64** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Luiz Roberto Giorgetti de Britto, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Geração de espécies reativas de oxigênio e morte neuronal no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina em ratos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Rafaela do Rosário Florindo Pestana, Marina Hernandez Sorrentino, Érika Reime Kinjo** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **15.12.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 09 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaela do Rosário Florindo Pestana

Geração de espécies reativas de oxigênio e morte neuronal no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina em ratos

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como exigência parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pela educação e dedicação para que eu conseguisse realizar este sonho.

Ao meu marido, meu parceiro e grande incentivador desta longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças e luz para realizar este trabalho e que nas horas de desânimo e medo do fracasso, me deu consolo e serenidade, mesmo que muitas vezes não tenha percebido que era dele que vinha.

Agradeço à minha mãe, meu grande exemplo, que me ensinou que tudo aquilo que eu quisesse eu poderia conseguir, com garra e determinação. Ao meu pai por todo o apoio, por ter me permitido que eu começasse mais uma vez, mesmo achando que eu deveria seguir outro caminho.

Aos meus irmãos, por inúmeras vezes que os perturbei, principalmente em relação ao computador, já que tudo acontece comigo. Prometo ser mais cautelosa e, quem sabe, fazer um cursinho básico do Windows.

Ao meu marido, sem dúvida minha maior riqueza, que me ensina a viver feliz com as pequenas coisas da vida... amor, sem você tudo ficaria mais difícil, muito obrigada !!!!!

Ao Thorzinho, Yasmim e ao Bafana-bafana, que me alegram com suas estripulias.

A família do Rô, meu sogro e minha sogra, que chamo carinhosamente de tia Marli e tio Toninho, aos meus cunhados, sobrinhos (Leleco e Lelê), por todos os almoços de domingo e pelo convívio, graças a Deus somos uma família unida.

Aos amigos do laboratório de fatores neurotróficos Bia, Camila, Bianca, Taty, Jú, em especial ao André e a Jéssica, que me ajudaram a dar os primeiros passos na pesquisa.

Ao Professor Britto, pela paciência e acolhida no seu laboratório no momento em que mais precisava, me fazendo acreditar que existem pessoas honestas na pesquisa.

À Erika (Ricotinha), amiga tão querida, obrigada por me ensinar o modelo da PILO, pela ajuda nas correções, pelos dias em que ficamos até tarde trabalhando, os dias em que dormi na sua casa, pelas nossa conversas, pela nossa viagem aos Estados Unidos e por agüentar muitas vezes o meu mal humor, vou sentir muitas saudades.

À Marina (Marilda), minha amiga acolhedora e protetora, que nas horas do desânimo me tranqüilizava e me fazia acreditar que tudo iria dar certo, obrigada pelas inúmeras vezes que me ajudou.

A Carol Real, Ceci, Carol Alencar, Taísa, Gabi, Lú, Caio, Mauro, Dani, Ana, Rosana, Vera, Vivian, Maru, Mi, Guilherme, Kallene, Juju, Paula e Andréa por todas as vezes que me ajudaram, pelas conversas, pelos ensinamentos, fui muito bom conviver com vocês.

Ao Adilson, a alegria do laboratório e que sempre deixa tudo certinho para que possamos trabalhar.

À todos aqueles que muitas vezes perturbei, fiz várias perguntas, parecendo ser chata, desculpa... Fiz sempre no intuito de aprender e me tornar uma pesquisadora melhor.

À todos aqueles que talvez possa ter esquecido nesse momento, mas estão presente em meu coração.

Aos ratinhos que propiciaram a execução do trabalho.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

PESTANA, R.R.F. Geração de espécies reativas de oxigênio e morte neuronal no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina em ratos. São Paulo, 2010. 75p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia em adultos. Estudos experimentais têm descrito aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) na morte neuronal relacionada à excitotoxicidade, presente em muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a epilepsia. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação das EROs e da NADPH oxidase na morte neuronal no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de ELT induzido pela pilocarpina (PILO). Os métodos utilizados foram a dihidroetidina (DHE) para determinar a geração de EROs, Fluoro-Jade B (detecta a degeneração de neurônios) e o tratamento com apocinina (APO), um antioxidante e inibidor da NADPH oxidase durante 7 dias prévios à injeção de PILO. Ratos machos *Wistar* adultos (n=5/grupo) foram submetidos à indução do *status epilepticus* (SE) e sacrificados após diferentes períodos (3, 6, 12 e 24 horas do início do SE). O giro denteado (GD) apresentou morte neuronal e aumento da geração de EROs em todos os períodos avaliados após indução de SE. Na região CA1, foi observada morte neuronal após 24 horas e aumento da geração em 6 e 24 horas. Na região CA3 morte neuronal e geração de EROs foram observadas após 24 horas do início do SE. O tratamento com APO diminuiu os níveis de EROs e morte neuronal em todas as regiões avaliadas. Nossos resultados indicam que o estresse oxidativo contribui para a morte neuronal durante o SE induzido por PILO. Além disso, pode-se sugerir que a NADPH oxidase está envolvida nesse processo, uma vez que o tratamento com APO diminuiu a neurodegeneração presente neste modelo de epilepsia.

Palavras chave: epilepsia, neurodegeneração, espécies reativas de oxigênio, pilocarpina.

ABSTRACT

PESTANA, R.R.F. Reactive oxygen species generation and neurodegeneration in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rats. São Paulo, 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most frequent form of epilepsy in adults. Experimental data have described an increase of reactive species oxygen (ROS) generation in relation to the neuronal death related to excitotoxicity, which occurs in many neurodegenerative diseases, including epilepsy. The aim of this study was to evaluate the participation of ROS generated by NADPH oxidase in the cell death observed in the hippocampus of rats submitted to the pilocarpine (PILO) model of TLE. Dihydroethidium (DHE) oxidation and Fluoro-Jade B assays were performed in order to detect ROS generation and neurodegeneration, respectively. Moreover, treatment of rats with apocynin (APO), an antioxidant and NADPH oxidase inhibitor, was also performed for 7 days prior to induction of status epilepticus (SE). Male Wistar rats (n=5/group) were submitted to PILO injection for SE induction and sacrificed after different periods (3, 6, 12 and 24 hours after SE establishment). The dentate gyrus (DG) present clear neurodegeneration, as well as an increase of ROS generation, in all analysed periods. In the CA1 area neuronal death was observed at 24h and ROS generation after 6h and 24h after SE establishment. In the CA3 area neuronal death and ROS generation were detected 24h after SE induction. APO treatment was effective in decreasing both ROS production and neurodegeneration in all three hippocampal areas. These results reinforce the idea that oxidative stress contributes to the neuronal death ensuing after SE induced by pilocarpine. In addition, as the APO treatment decreased neurodegeneration present in this epilepsy model, we suggest an involvement of ROS generated by NADPH oxidase in TLE.

Palavras chave: epilepsia, neurodegeneration, reactive oxygen species, pilocarpine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema ilustrativo de corte coronal de encéfalos de ratos, ilustrando as regiões CA1-CA3, giro denteado e suas respectivas camadas.

Figura 2. Efeito da PILO sobre a geração de EROs na região CA1 do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE.

Figura 3. Efeito da PILO sobre a geração de EROs na região CA3 do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE.

Figura 4. Efeito da PILO sobre a geração de EROs no giro denteado do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE.

Figura 5. Efeito da PILO na morte neuronal na região CA1 do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE.

Figura 6. Efeito da PILO na morte neuronal na região CA3 do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE.

Figura 7. Efeito da PILO na morte neuronal no giro denteado do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE.

Figura 8. Efeito do tratamento com APO sobre a geração de EROs na região CA1 do hipocampo de ratos avaliados após 24 horas de SE.

Figura 9. Efeito do tratamento com APO sobre a geração de EROs na região CA3 do hipocampo de ratos avaliados após 24 horas de SE.

Figura 10. Efeito do tratamento com APO sobre a geração de EROs no giro denteado do hipocampo de ratos avaliados após 24 horas de SE.

Figura 11. Efeito do tratamento com APO na morte neuronal na região CA1 do hipocampo de ratos após 24 horas de SE.

Figura 12. Efeito do tratamento com APO na morte neuronal na região CA3 do hipocampo de ratos após 24 horas de SE.

Figura 13. Efeito do tratamento com APO na morte neuronal no giro denteado do hipocampo de ratos após 24 horas do início do SE.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema demonstrando a divisão dos grupos para o tratamento com APO.

Tabela 2: Resumo dos resultados após diferentes tempos do início do SE induzido por PILO.

Tabela 3: Resumo dos resultados apresentados do tratamento com APO após 24 horas do início do SE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
DTPA	Dietilenotriaminopentaacético
APO	Apocinina
DHE	Dihidroetidina
ELT	Epilepsia do lobo temporal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
GD	Giro denteado
GrDG	Camada granular do giro denteado
GSH	Glutationa
ip	Intraperitoneal
Lmol	Stratum lacunosum moleculare
MoDG	Camada molecular do giro denteado
Or	Stratum oriens
PB	Tampão fosfato
PoDG	Camada polimórfica do giro denteado
Py	Stratum pyramidale
Rad	Stratum radiatum
Slu	Stratum lucidum
SOD	Superóxido dismutase
sc	Subcutâneo
TUNEL	Terminal deoxynucleitidyl transferase dUTP nick end labeling

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL</i>	15
1.2. <i>MORTE NEURONAL E STATUS EPILEPTICUS</i>	17
1.3. <i>ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO</i>	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. <i>OBJETIVOS GERAIS</i>	25
2.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. <i>INDUÇÃO DO SE</i>	26
3.2. <i>ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DERIVADA DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA DHE EM CORTES HISTOLÓGICOS.....</i>	27
3.3. <i>DETECÇÃO DE NEURÔNIOS EM DEGENERAÇÃO</i>	28
3.4. <i>PREPARO DA APO.....</i>	29
3.5. <i>TRATAMENTO COM APOCININA (APO).....</i>	29
3.6. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</i>	30
4. RESULTADOS.....	31
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

As síndromes epiléticas são afecções do sistema nervoso central que afetam aproximadamente 1% da população mundial, sendo caracterizadas pela ocorrência de crises recorrentes e espontâneas, resultantes de descargas anormais e desordenadas de células nervosas (Hauser e Hesdorffer, 1991).

Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia, sendo esta a condição neurológica mais comum (Sander, 2003). Nos Estados Unidos, aproximadamente 100.000 novos casos de epilepsia são diagnosticados a cada ano (Begley et al., 1994; Annegers, 1997). No Reino Unido, entre 1 em 140 e 1 em 200 pessoas (pelo menos 300.000 pessoas) estão atualmente sendo tratadas de epilepsia (Yuen e Sander, 2004). No Brasil, um estudo demonstrou que a prevalência das epilepsias é de 5,4/1000 habitantes (Noronha et al., 2007).

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia em adultos, ocorrendo em pelo menos 40% de todos os casos e apresentando alta refratariedade ao tratamento medicamentoso (Hauser et al., 1996; Wieser, 2004). Clinicamente, a ELT é caracterizada por crises parciais complexas, apresentando ou não generalização secundária (Guerreiro e Guerreiro, 1996). Geralmente, a ELT começa na infância ou adolescência, sendo muito comum a ocorrência de convulsão febril (Bourgeois, 1992). Após um período livre de crises, que pode durar de meses a anos, os pacientes passam a apresentar crises espontâneas e recorrentes (Engel, 1989).

O hipocampo é a estrutura mais freqüentemente envolvida neste tipo de epilepsia, sendo que a ressecção unilateral do hipocampo diminui as crises (Ojemann,1987; Spencer, 2002), além de lesões serem encontradas no hipocampo de pacientes com ELT (Babb e Brown,1986).

Anatomicamente a formação hipocampal consiste do corno de Amon, que apresenta 4 regiões, CA1, CA2, CA3 e CA4 (esta última também chamada de região polimórfica do giro denteado ou hilo). Outras regiões que compõem a formação hipocampal são o giro denteado, o complexo subicular e o córtex entorrinal.

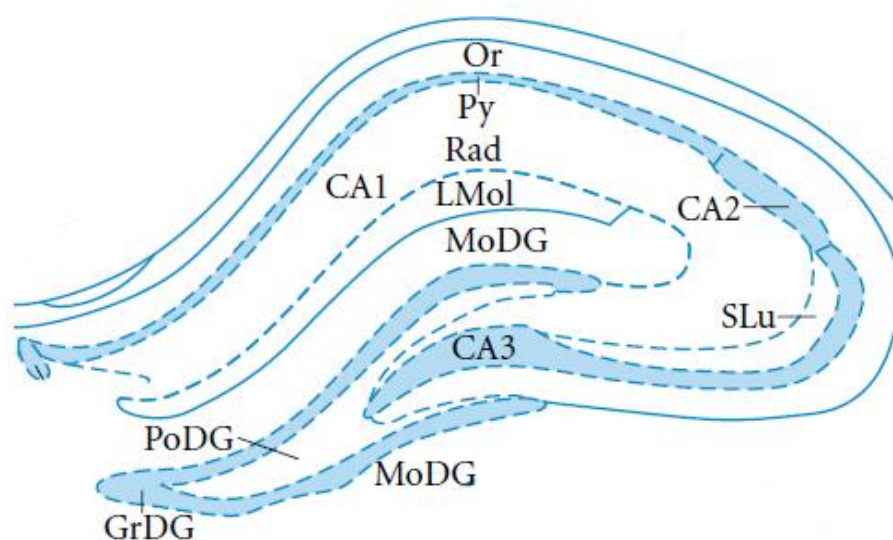


Figura 1. Esquema ilustrativo de corte coronal de encéfalos de ratos, ilustrando as regiões CA1-CA3 e giro denteado e suas respectivas camadas. Or: stratum oriens, Py: stratum pyramidale; Rad: stratum radiatum, LMol: stratum lacunosum moleculare; SLu: stratum lucidum; MoDG: camada molecular do giro denteado; GrDG: camada granular do giro denteado; PoDG: camada polimórfica do giro denteado (Paxinos e Watson, 2005).

Na ELT, a formação hipocampal sofre grande perda de neurônios piramidais das regiões CA1, CA3 e de neurônios da camada polimórfica do giro denteado, intensa gliose, além de reorganização dos axônios das células

granulares (fibras musgosas), denominada brotamento das fibras musgosas (Tauck e Nadler, 1985; Sutula et al., 1988; Mello et al., 1993). Esse conjunto de características histológicas é denominado de esclerose hipocampal.

Dentre os modelos de epilepsia mais estudados destaca-se o da pilocarpina (PILO), descrito por Turski e colaboradores (1983a), que mimetiza com grande fidelidade as três fases da ELT em humanos. A descrição detalhada do modelo em ratos e camundongos permite caracterizar três fases distintas: a) período agudo, fase em que os animais apresentam crises ininterruptas por períodos de até 24 horas (*status epilepticus*, SE); b) um período latente caracterizado pela normalização comportamental e eletroencefalográfica, com duração variável de 3 a 44 dias; c) período crônico, que se inicia com o aparecimento da primeira crise espontânea, que se torna recorrente ao longo da vida do animal (Turski et al., 1983a, 1983b; Cavalheiro et al., 1996).

O modelo da PILO reproduz a ELT humana, fornecendo diversos dados comportamentais, eletroencefalográficos, assim como aponta a presença de lesões hipocampais compatíveis com a esclerose hipocampal em humanos (Lothman et al., 1995; Engel, 1996; Isokawa, 1997).

1.2. MORTE NEURONAL E STATUS EPILEPTICUS

A apoptose ou morte celular programada é um processo de morte celular que ocorre naturalmente, essencial para o desenvolvimento normal e homeostase de organismos multicelulares (Schwartzman e Cidlowski, 1993). Este processo é também importante para o reparo de lesões, infecções ou células neoplásicas potentes (Nagata, 1996).

Durante este processo, uma célula individual sofre um processo ativo de morte celular caracterizado por alteração bioquímica do núcleo e citoplasma, sinalizado por mecanismos programados que incluem caspases e proteínas da família Bcl-2 (Yuan et al., 1993; Hengartner e Horvitz, 1994; Lushnikov e Yu, 2001). Os achados morfológicos de apoptose nos neurônios, assim como em outras células, consistem em encolhimento, condensação de cromatina, formação de corpos apoptóticos das membranas citoplasmáticas e nucleares, e brotamento de fragmentos celulares. A apoptose é um processo dependente de energia que requer ATP para síntese de proteínas, sinalização e reações de fosforilação (Jiang e Wang, 2000; Donovan et al., 2002; Bengzon et al., 2002).

Já a necrose é tipicamente uma forma patológica, desregulada, não fisiológica, de morte celular, caracterizada por dilatação das mitocôndrias e do retículo endoplasmático e por extensa vacuolização do citoplasma. Não há amplo enrugamento da membrana plasmática, mas há desintegração do núcleo, as células incham e lisam sem a formação de vesículas e o conteúdo celular é liberado no espaço intercelular, frequentemente danificando as células da vizinhança e induzindo respostas inflamatórias (Majno e Joris, 1995; Leist e Jaatela, 2001; Proskuryakov et al., 2002).

A necrose tipicamente envolve grupos de células e está associada com interrupção da arquitetura tecidual, enquanto a apoptose geralmente afeta células isoladas e preserva a arquitetura do tecido. A necrose é sempre patológica; já a apoptose parece ser um processo fisiológico que pode ser disparado em condições patológicas (Kerr et al., 1972).

Modelos experimentais e estudos clínicos têm confirmado que o SE pode causar morte neuronal em certas regiões do encéfalo. A perda celular no corno

de amon e giro denteado é a lesão mais comumente observada, embora outras regiões límbicas como a amígdala também estejam prejudicadas, além do cerebelo e do córtex cerebral (Meldrum e Bruton, 1992).

Após poucas horas do início do SE já é possível verificar a presença de dano celular, sendo mais intensa nas camadas superficiais de algumas áreas neocorticais, camada polimórfica do giro denteado do hipocampo, núcleo endopiriforme, córtex piriforme e clastrum. A morte celular nestas áreas cerebrais distintas é dependente do tempo, sendo que oito horas após o início do SE o prejuízo se intensifica nessas áreas e em geral torna-se significativo no córtex entorrinal, núcleo amigdalóide, núcleo ventral do hipotálamo, região CA1, CA3 e subiculum. (Cavalheiro, 1995; Leite et al.,1990; Turski et al., 1983a,1983b,1984).

A morte neuronal induzida pelas crises resulta em grande parte da neurotransmissão glutamatérgica excitotóxica com excessiva entrada de Na^+ e Ca^{2+} , resultando em estresse osmolítico, ruptura/tumefação celular, produção de radicais livres com prejuízo de DNA e ativação de proteases, levando à proteólise da célula e de organelas da membrana, culminando em necrose (Fujikawa et al., 2006).

Atualmente muitos estudos são realizados com o intuito de caracterizar e diferenciar morfologicamente os tipos de morte neuronal durante o SE, ou seja, se a morte celular é necrótica, apoptótica e se tem a presença de mecanismos programados.

Neste sentido, Sloviter et al.(1996) encontraram em neurônios hilares e células piramidais do hipocampo no modelo de estimulação intermitente da via perfurante por 24 horas, achados morfológicos de necrose, caracterizado em

parte por vacuolização citoplasmática, antes mesmo de mudanças nucleares ocorrerem; contudo, as células granulares exibiram achados morfológicos de apoptose, incluindo agrupamento de cromatina nuclear em múltiplos corpos nucleares, compactação do citoplasma, encolhimento celular e formação de corpos apoptóticos envoltos por células gliais.

Fujikawa et al. (1996, 1999, 2000, 2002) demonstraram nos modelos que apresentam crises recorrentes e mimetizam a ELT, a saber PILO, PILO-lítio e ácido caínico, a presença de neurônios com características de necrose em diversas áreas encefálicas, incluindo o hipocampo dorsal e ventral, sendo que alguns desses neurônios necróticos tornaram-se positivos para TUNEL (método que detecta fragmentação de DNA) somente 72 horas após indução do SE. No entanto, os mesmos autores também encontraram (2007) no modelo do ácido caínico que caspases 8 e 9 não são ativadas em células que apresentam características de necrose durante as primeiras 24 horas após a indução do SE, concluindo que mecanismos independentes de caspases contribuem para a morte neuronal necrótica nesse período avaliado.

A coexistência de necrose morfológica com fragmentação de DNA no SE é acompanhada pela ativação de outros mecanismos de morte celular programada, como os que envolvem p53 (Sakhi et al.,1994,1996), bax (Gillardon et al.,1995), cyclin D1 (Liu et al.,1996) e expressão de *c-jun* (Dragunow et al.,1993).

Outro aspecto a ser levado em consideração é que a morte neuronal, seja ela necrótica, apoptótica ou ambas, provavelmente depende de fatores intrínsecos, como o tipo celular e suas conexões, e de fatores extrínsecos

como a severidade e/ou duração do estímulo lesivo (Sloviter et al.; 1996; Bonfoco et al.; 1995).

Apesar da vasta quantidade de estudos sobre morte neuronal e epilepsia, os dados existentes são controversos e ainda não é claro quais mecanismos estão envolvidos e, portanto, a classificação do dano celular simplesmente em necrose ou apoptose pode ser confusa. A perspectiva mais ponderada parece ser a de considerar que a agressão excitotóxica disparada pelo SE induzido por PILO leva a lesão celular imediata, de minutos a poucas horas depois do início, resultando em um processo prolongado de neurodegeneração que leva de semanas a meses para se desenvolver (Cavalheiro, 1995; Leite et al., 1990; Turski et al., 1983a, 1983b, 1984).

1.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os eventos celulares e moleculares responsáveis pela vulnerabilidade de neurônios hipocâmpais às crises induzidas pela PILO ainda não são completamente entendidos. Estudos *in vitro* sugerem que um aumento de glutamato extracelular e da geração de (EROs), assim como a resultante peroxidação lipídica, podem estar relacionados com este fenômeno (Cohen et al., 1987; Bruce e Baudry, 1995; Ueda et al., 1997, 1998; Candelario-Jalil et al., 2000).

Tanto no modelo da PILO como no que utiliza ácido caínico existe um forte envolvimento de lesão neuronal excitotóxica (Ben-Ari, 1985; Cavalheiro et al., 1991; Mello et al., 1993; Bonan et al., 2000). A geração de EROs tem sido considerada como parte dos mecanismos envolvidos com a excitotoxicidade

glutamatérgica *in vitro* (Bonfoco, 1995) e *in vivo* (Bondy e Lee, 1993; Bruce e Baudry, 1995; Shulz et al., 1995; Ueda et al., 1997).

As EROs são essenciais na manutenção da homeostase celular. O ambiente redox intracelular é constantemente controlado e mantido em estado redutor, a não ser que a célula seja exposta a situações oxidantes extremas. A homeostase redox é crucial para que diversas funções celulares ocorram de maneira adequada, tais como ativação enzimática, síntese de DNA, regulação do ciclo celular e até mesmo apoptose (Kamata e Hirata, 1999).

O ambiente redox também é importante para manter a atividade biológica e a geração adequada tanto de EROs quanto de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Schafer e Buettner, 2001). Assim, as células desenvolveram sofisticados mecanismos para manter a homeostase redox, também chamada de estado redox, que é o resultado da combinação de fatores pró-oxidantes e anti-oxidantes.

As EROs incluem espécies radicalares como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila ($-OH$), assim como espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kamata e Hirata, 1999).

Fontes exógenas e endógenas contribuem para a formação de EROs intracelulares. As fontes exógenas incluem radiação (radiação UV, raios-X, raios gama), poluentes atmosféricos e outros agentes químicos (Srinivasan et al., 2001). A maior fonte endógena de EROs é a mitocôndria, onde $O_2^{\bullet-}$ é gerado pela cadeia transportadora de elétrons (Srinivasan et al., 2001; Le Bras et al., 2005). A atividade de algumas enzimas como a NADPH oxidase, citocromo c oxidase e xantina oxidase também são fontes endógenas de

EROs. A presença de metais redox ativos, como ferro e cobre, contribui para a geração de EROs (Babior, 1999; Kehrer, 2000; Vignais, 2002).

As células são equipadas com agentes antioxidantes, que são moléculas capazes de decompor EROs. Os maiores grupos de agentes antioxidantes são: moléculas com baixo peso molecular (vitaminas C e E, e as ubiquinonas), enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, redutase e catalase) e moléculas contendo grupos tióis (Arrigo, 1999).

Em 1985, Helmut Sies definiu estresse oxidativo como um desequilíbrio celular no qual os oxidantes predominariam sobre os antioxidantes (Sies e Cadenas, 1985). Ou seja, quando a produção de EROs e ERNs excedesse a capacidade dos antioxidantes de defesa, ocorreria o estresse oxidativo (Poon et al., 2004). Neste sentido, o termo estresse oxidativo refere-se, portanto, à citotoxicidade causada por EROs e ERNs, incluindo o $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxila ($\cdot OH$) e H_2O_2 , que são produtos de processos metabólicos normais ou anormais que utilizam oxigênio molecular (O_2) (Coyle e Puttfarcken, 1993). Esta idéia do desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes para explicar o estresse oxidativo, embora ainda seja válida para explicar a modulação da concentração de EROs no organismo, está sendo atualmente substituída por uma visão mais complexa e elaborada de que EROs intermediariam desde circuitos de sinalização fisiológicos e patológicos até lesões a constituintes celulares. Neste contexto, o estresse oxidativo seria resultado de um aumento na geração de EROs que, além de diretamente ocasionarem danos a constituintes celulares, atuariam como intermediários de circuitos redox. A ativação destes circuitos patológicos levaria a um aumento na proliferação, migração, remodelamento da

matriz celular e inflamação, resultando, por exemplo, na lesão vascular observada na hipertensão arterial (Jones, 2006; Augusto, 2006).

O estresse oxidativo está presente em uma variedade de condições patológicas incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e epilepsia, levando ao prejuízo oxidativo irreversível dos lipídios, proteínas, DNA e ativação de processos de apoptose (Bruce e Baudry, 1995; Ueda et al., 1997; Todorova et al., 2004; Valko et al., 2007).

2. OBJETIVOS

O modelo de epilepsia induzido por PILO, como já mencionado, é um modelo animal útil para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de epileptogênese na ELT. Há evidências de que o SE, que corresponde à fase aguda do modelo, é responsável por muitas das lesões hipocampais observadas no modelo, contribuindo mais do que as crises espontâneas recorrentes para a neurodegeneração (Ferreira et al., 2003; Lancel et al., 1997). Muitos estudos demonstram a existência de dano oxidativo durante o SE induzido por PILO, porém nenhuma relação foi estabelecida entre o envolvimento do estresse oxidativo na neurodegeneração hipocampal presente na ELT.

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar o envolvimento das EROs e da NADPH oxidase na morte neuronal no modelo de epilepsia induzido por PILO em ratos.

2.2. Objetivos Específicos

Investigar o hipocampo dorsal de ratos no período agudo do modelo de ELT induzida por PILO avaliando:

- A geração de EROs;
- A morte neuronal;
- Os efeitos do tratamento com um inibidor da enzima NADPH oxidase, a APO, na morte neuronal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Indução do SE

Os animais empregados neste estudo foram ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 270g-290g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($20\pm 2^\circ\text{C}$), iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) e alimentação balanceada para ratos e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais, que incluem a indução do SE, decapitação e perfusão dos animais, foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo n°. 137/2009).

Os animais foram previamente tratados (20 minutos antes da administração da PILO) com metil-escopolamina (dose 1mg/kg, sc), visando minimizar os efeitos periféricos da PILO. Posteriormente esses animais (n=139) foram injetados com PILO (360mg/kg) diluída em salina estéril e administrada intraperitonealmente.

De 5 a 10 min após a administração de PILO os animais passaram a apresentar automatismos orofaciais, movimento das vibrissas e clonia de cabeça. Essas alterações persistiram por 30 minutos quando progrediram para crises límbicas tônicas, clônicas ou tônico-clônicas, com salivação intensa, perda do padrão postural e queda. A permanência nesse estado por períodos superiores a 15 minutos marca o início do SE, que tem duração de aproximadamente 24 horas ininterruptas, caracterizando o período agudo do modelo. Após 4 horas do início do SE foi administrado diazepam (5 mg/kg, sc).

O diazepam é um anticonvulsivante muito utilizado na clínica, responsável por aumentar os efeitos inibitórios gabaérgicos; esta dose foi utilizada apenas para atenuar a crise e não bloquea-lá.

3.2. Análise da fluorescência derivada dos produtos de oxidação da DHE em cortes histológicos

Para análise dos níveis de EROs intracelulares, 5 animais por grupo foram sacrificados por decapitação, a saber controle, 3, 6, 12 e 24 horas após o início do SE, e seus encéfalos foram imersos em meio para congelamento (Leica Instruments) e congelados em gelo seco. Foram feitos cortes transversais de 18µm em criostato e os tecidos fatiados na região do hipocampo foram colocados em lâminas gelatinizadas. Os cortes do tecido foram incubados com tampão fosfato (PB) contendo o ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) (100 µM) por 10 min e incubadas com dihidroetidina (5 µM) diluída em PB contendo DTPA 100 µM, em câmara úmida (5 minutos, a 37° C), protegida de luz.

A fluorescência dos cortes foi detectada em microscópio óptico Nikon com filtro para rodamina, com objetiva de 20x. Imagens digitais das regiões CA1, CA3 e giro dentado do hipocampo foram obtidas por meio de uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio e as figuras correspondentes foram montadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop.

A fluorescência foi analisada pela densidade integrada em uma área de 0.04 mm² em cada corte pelo programa Image J[®] 4.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health/USA). Imagens digitais das regiões CA1, CA3 e giro dentado foram capturadas (1 hemisfério, 3 cortes de encéfalo de cada

animal) e posteriormente a média da densidade integrada de cada grupo foi calculada. Cada dado do grupo experimental foi normalizado pelo seu controle do dia. Os parâmetros usados para capturar as imagens digitais foram mantidos absolutamente constantes. A análise estatística foi realizada pelo programa Graphpad Prism (3.02).

3.3. Detecção de neurônios em degeneração

Utilizamos o método de Fluoro-Jade B, um tipo de fluorocromo, que pode detectar degeneração neuronal. Este traçador possui alta afinidade com neurônios em degeneração, incluindo corpo celular, dendritos, axônios e terminais axônicos (Schmued e Hopkins, 2000). O método é bastante utilizado na detecção da degeneração de áreas encefálicas que foram submetidas a lesões com ácido caínico (Olney et al., 1973; Chang et al., 2007; Rijak et al., 2007).

Para análise dos neurônios em degeneração, 5 animais por grupo foram perfundidos, a saber controle, 3, 6, 12 e 24 horas após o início do SE, e seus encéfalos foram imersos em 30% de sacarose durante 48 horas. Posteriormente foram realizados cortes transversais de 30 µm de seus encéfalos em micrótomo. As secções do hipocampo de ratos submetidos ao SE no período agudo foram montadas em lâminas gelatinizadas, reidratadas e incubadas em uma solução de 0,06 % de permanganato de potássio. Após esse processo foram incubadas em solução de 0,001% de Fluoro-Jade B (Chemicon) e ácido acético 0,1%. Logo após, as lâminas foram lavadas novamente, cobertas com lamínulas e analisadas por meio de microscópio

Nikon acoplado a um sistema de imagens composto de câmera de vídeo e computador com placa de aquisição de vídeo.

Para análise da morte neuronal foram feitas contagens de pericários dos neurônios em degeneração pelo programa Image J[®] 4.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) nas regiões CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo. As contagens foram realizadas unilateralmente, em 1 hemisfério, em 3 cortes do encéfalo de cada animal. Os resultados obtidos a partir da contagem de pericários foram representados pelo valor médio do número de neurônios marcados em 1 mm² (células/mm²) de cada grupo.

3.4. Preparo da APO

A APO foi diariamente adicionada aos bebedouros de água dos animais em tratamento, obtendo-se assim a concentração final desejada (12 mg/kg), totalizando uma ingestão diária de aproximadamente 3 mg da droga, de acordo com protocolo descrito por Ceravolo et al. (2007).

3.5. Tratamento com apocinina (APO)

GRUPOS DE TRATAMENTO COM APO	
GRUPO CONTROLE	Bebeu água durante 7 dias Injeção de salina no 8° dia
GRUPO CONT+APO	Bebeu água com APO durante 7 dias Injeção de salina no 8° dia
GRUPO PILO	Bebeu água durante 7 dias Injeção de PILO no 8° dia
GRUPO PILO+APO	Bebeu água com APO durante 7 dias Injeção de PILO no 8° dia

Tabela 1: Esquema demonstrando a divisão dos grupos para o tratamento com APO.

Os animais que receberam APO, 7 animais por grupo foram tratados por 7 dias. No 8º dia foi injetado PILO nos animais experimentais (PILO e PILO+APO) e salina nos animais controles (CONTROLE e CONT+APO); todos os grupos foram sacrificados após 24 horas do início do SE para a realização das técnicas de Fluoro-Jade B e DHE.

3.6. Análise Estatística

Os dados estão representados como média \pm e.p.m. A análise estatística dos dados foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism, versão 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância ANOVA *One Way* e *pós-teste de Tukey*. O índice de significância utilizado foi $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Do total de animais submetidos à injeção de PILO (n=139), 100% deles desenvolveram o estado de mal epiléptico, caracterizado por alterações comportamentais descritas previamente. Os que sobreviveram ao período agudo somam 68 (49%). O número total de animais que fizeram parte do estudo, somando os experimentais e os controles de todos os grupos somam 106.

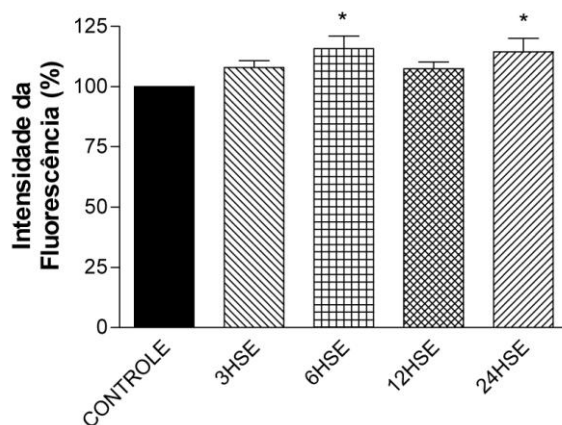
A análise dos produtos derivados da oxidação da DHE revelou um aumento significativo nos níveis de EROs intracelulares no hipocampo dos animais submetidos ao SE. Nossos resultados demonstram um aumento significativo da geração de EROs na camada das células piramidais de CA1 em 6 (16%) e 24 horas (15%) após o SE quando comparado aos animais do grupo controle (Figura 2A). Na região CA3 houve aumento da geração de EROs somente após 24 horas (20%) quando comparada aos animais do grupo controle (Figura 3A). Por outro lado, no giro denteado houve aumento da geração em todos os períodos avaliados, quando comparada aos animais do grupo controles: 3 (11%), 6 (16%), 12 (13%) e 24 horas (15%) após indução do SE (Figura 4A).

A análise da morte neuronal avaliada pela técnica de Fluoro-jade B revelou um padrão de morte celular no hipocampo dos animais submetidos ao SE. Nossos resultados foram expressos em média do valor absoluto do número de células/ $\text{mm}^2 \pm$ erro padrão e confirmam um aumento significativo de morte neuronal na camada de células piramidais de CA1 e CA3 (378 ± 104 e 203 ± 74 , respectivamente) após 24 horas de SE, quando comparada aos animais do grupo controle sem morte (Figuras 5A e 6A). Já no giro denteado,

principalmente na camada polimórfica, foi observado um aumento significativo da morte celular em todos os períodos avaliados quando comparada ao grupo controle: 3 horas (126 ± 15), 6 horas (137 ± 41), 12 horas (208 ± 13) e 24 horas (457 ± 31) após indução de SE (Figura 7A).

O tratamento com APO 7 dias antes da indução do SE produziu uma diminuição significativa nos níveis de EROs intracelulares no grupo PILO+APO com 24 horas de SE, na camada de células piramidais de CA1(17%), CA3 (20%) e giro denteado (24%), quando comparado aos animais do grupo PILO (Figuras 8A, 9A, 10A). Além da diminuição de EROs, a APO também foi capaz de diminuir a neurodegeneração no grupo PILO+APO nas camadas de células piramidais de CA1 (77%), CA3 (57%) e giro denteado principalmente na camada polimórfica (48%) quando comparada ao grupo PILO (Figuras 11A, 12A, 13A). As tabelas 2 e 3 resumem os resultados obtidos neste trabalho, em relação à evolução temporal dos efeitos da PILO e o tratamento com APO.

A



B

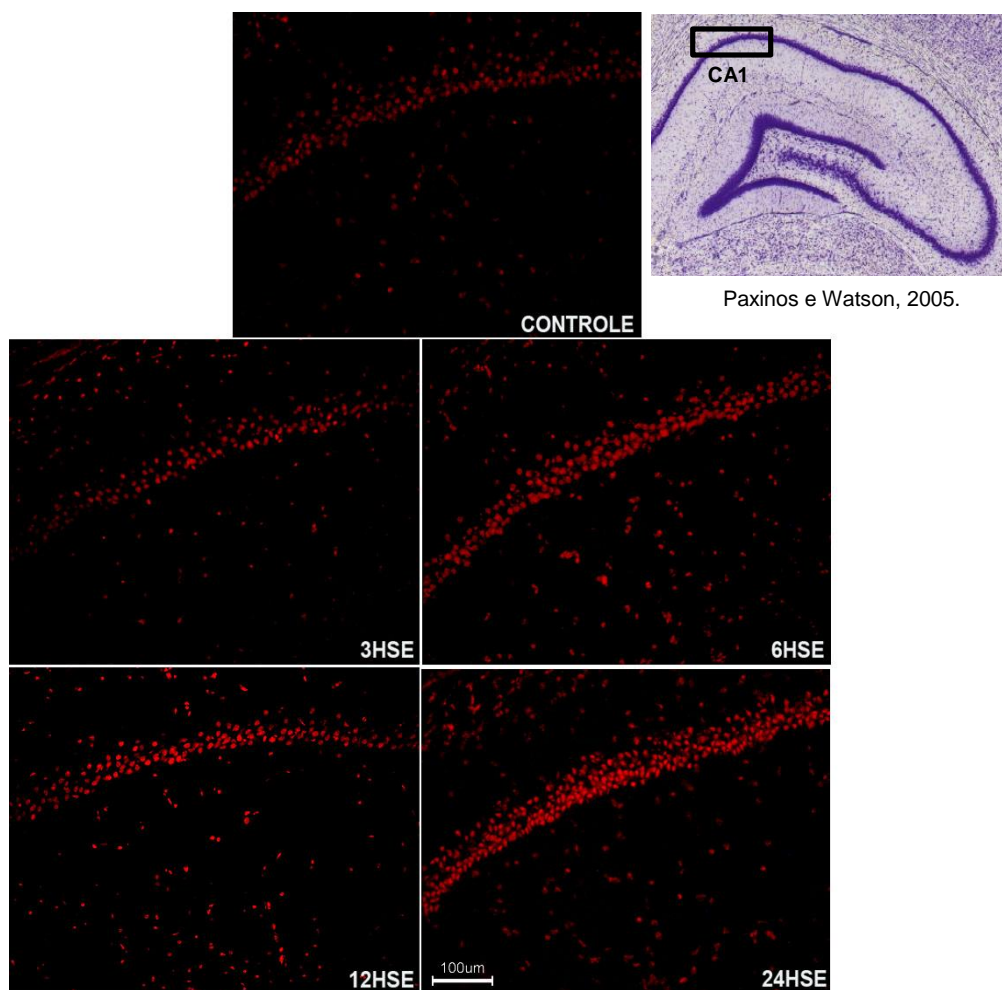
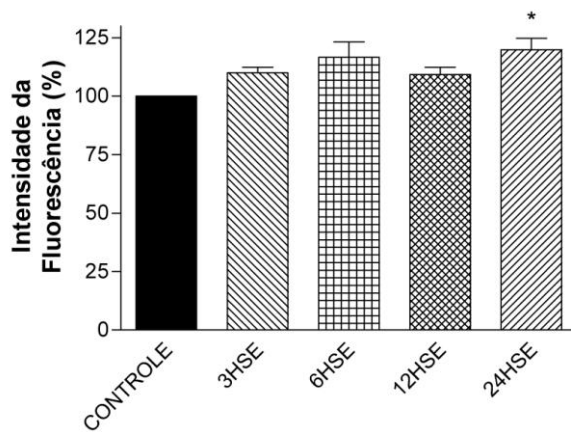


Figura 2. Efeito da PILO sobre a geração de EROs na região CA1 do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE. Os valores do gráfico representam a intensidade da fluorescência dos produtos derivados da oxidação da DHE (A). * indica $p < 0,05$ vs CONTROLE. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando a geração de EROs na região CA1 do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

A



B

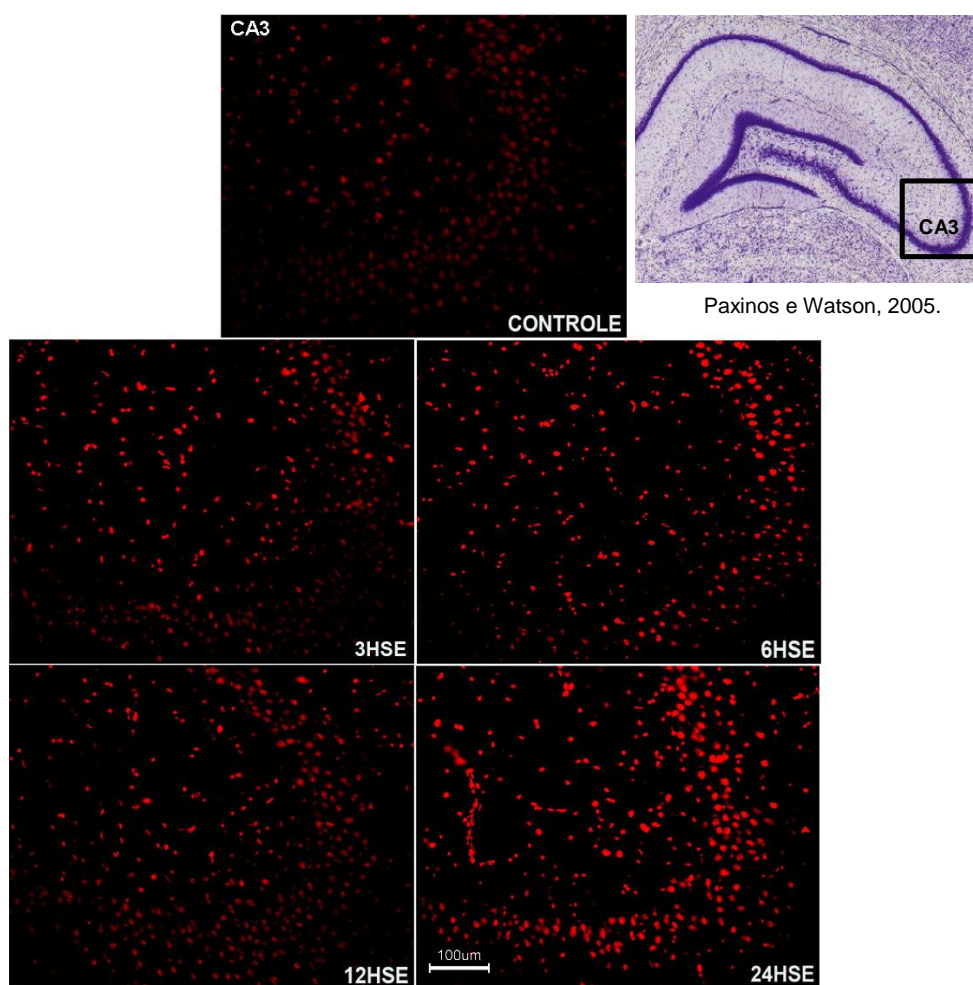
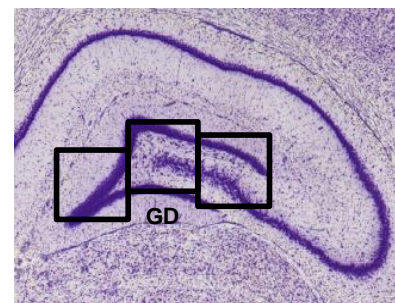
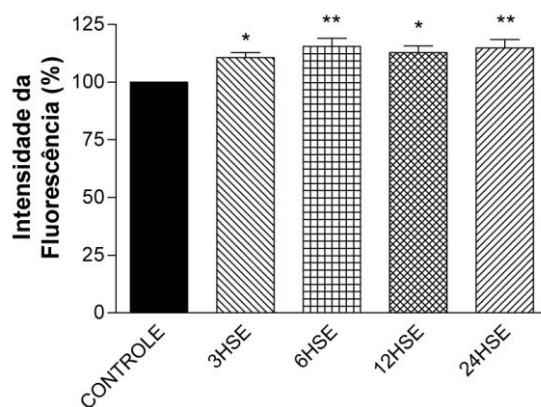


Figura 3. Efeito da PILO sobre a geração de EROs na região CA3 do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE. Os valores do gráfico representam a intensidade da fluorescência dos produtos derivados da oxidação da DHE (A). * indica $p < 0,05$ vs CONTROLE. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando a geração de EROs na região CA3 do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

A



Paxinos & Watson, 2005.

B

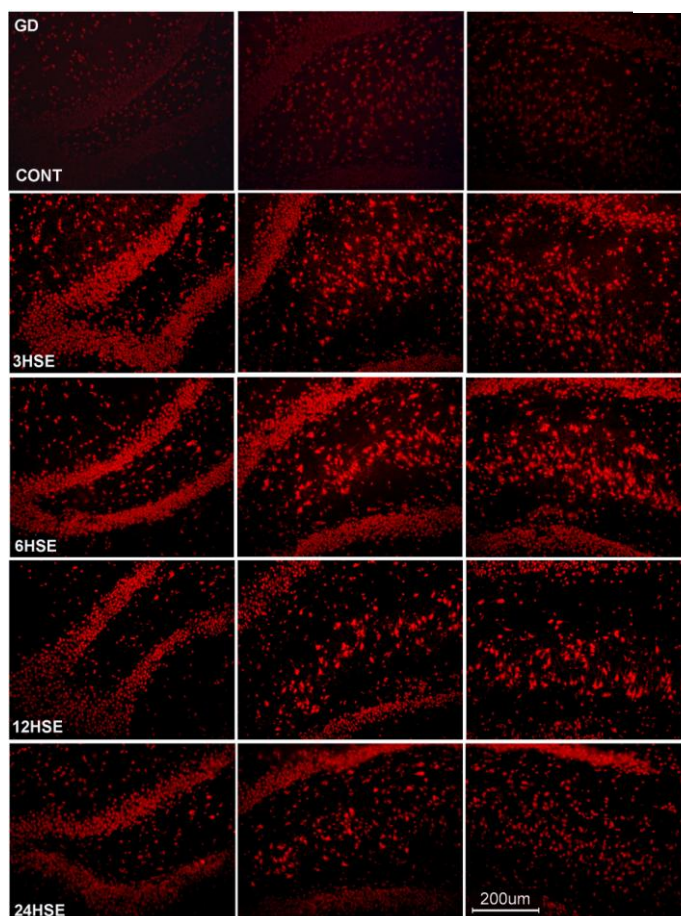


Figura 4. Efeito da PILO sobre a geração de EROs no giro dentado do hipocampo de ratos avaliados após 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE. Os valores do gráfico representam a intensidade da fluorescência dos produtos derivados da oxidação da DHE (A). * indica $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs CONTROLE. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando a geração de EROs representada por 3 imagens no sentido médio-lateral do giro dentado do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

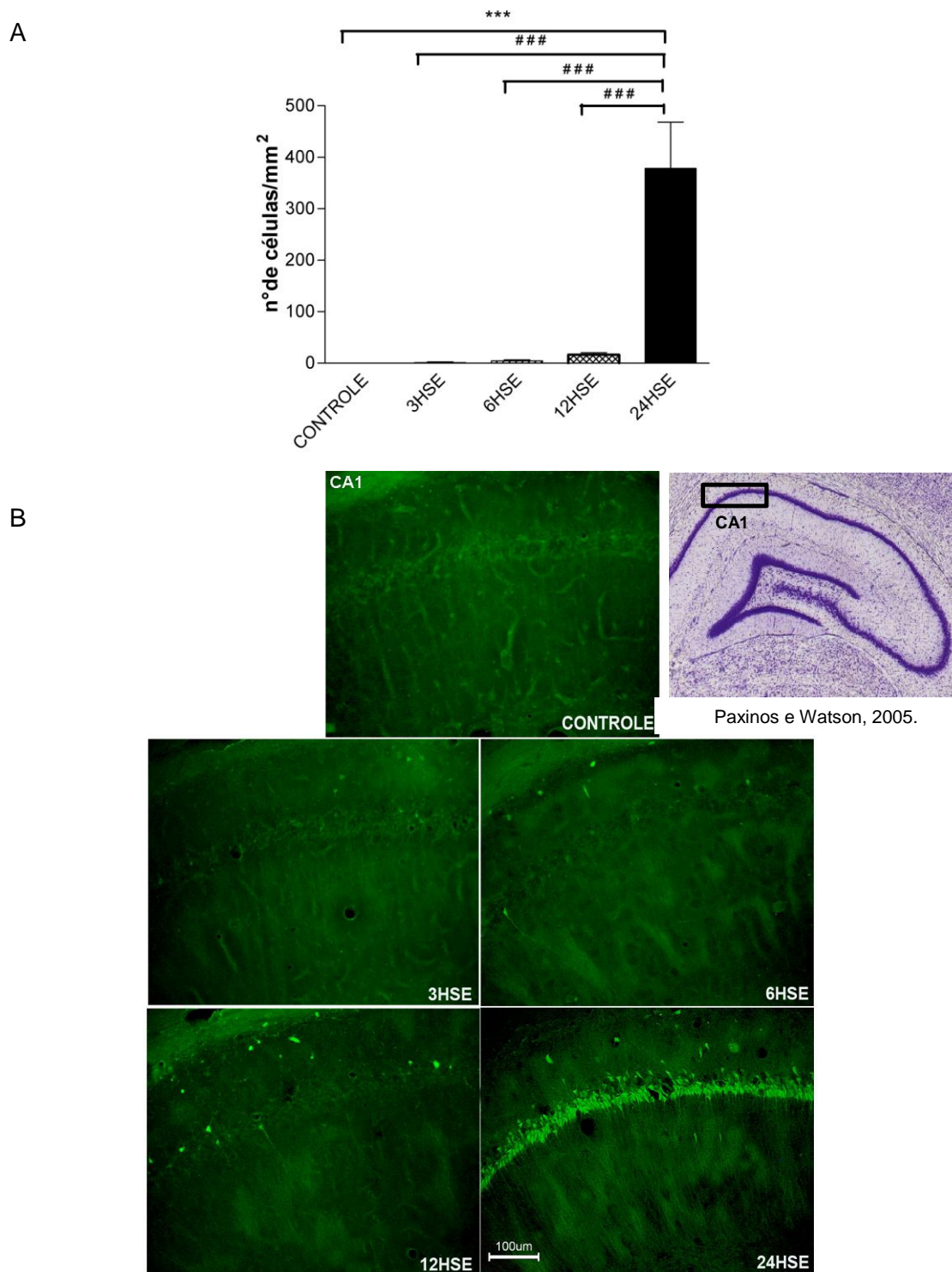
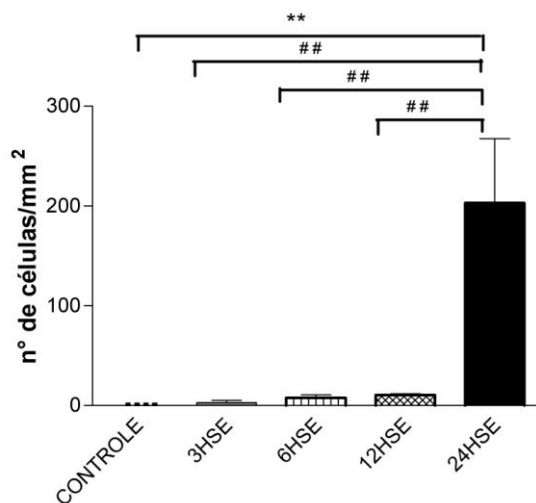


Figura 5. Efeito da PILO na morte neuronal na região CA1 do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE. Os valores do gráfico representam a contagem de corpos celulares de neurônios em degeneração na região CA1 (A). *** indica $p < 0,001$ vs CONTROLE, # # # indica $p < 0,001$ vs 24HSE. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando o padrão de morte neuronal pelo método de Fluoro-Jade B na região CA1 do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

A



B

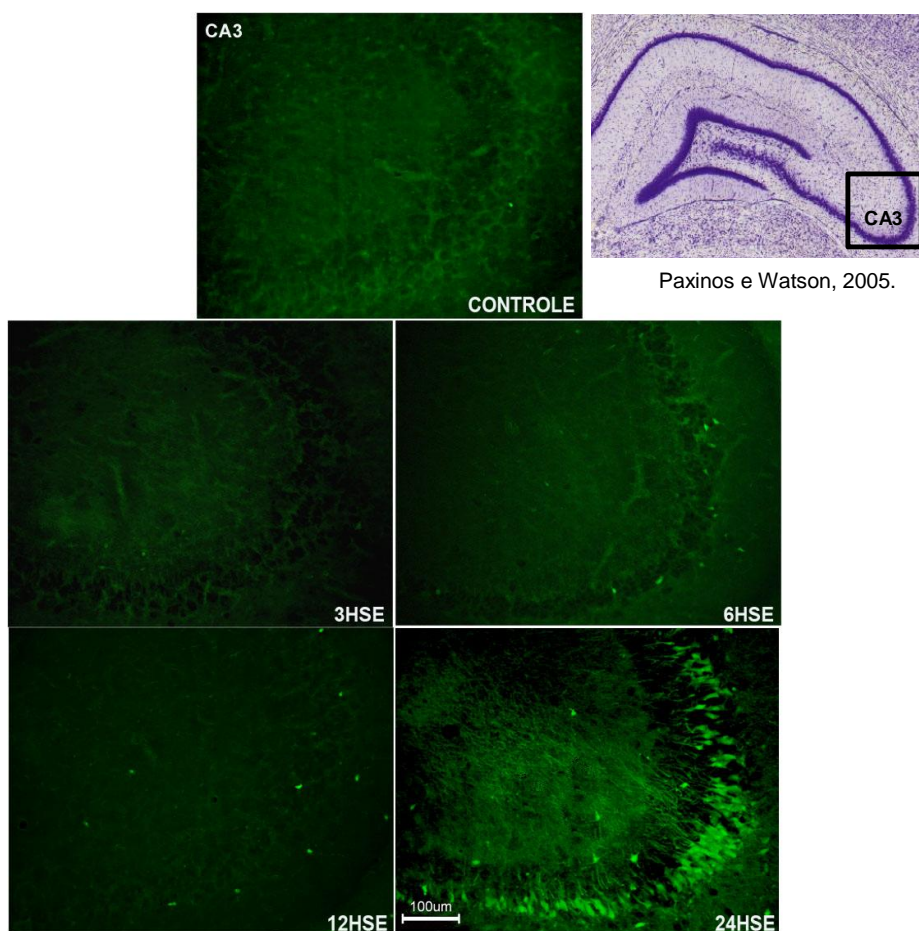


Figura 6. Efeito da PILO na morte neuronal na região CA3 do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE. Os valores do gráfico representam a contagem de corpos celulares de neurônios em degeneração na região CA3 (A). ** indica $p < 0,01$ vs CONTROLE, # # indica $p < 0,01$ vs 24HSE. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando o padrão de morte neuronal pelo método de Fluoro-Jade B na região CA3 do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

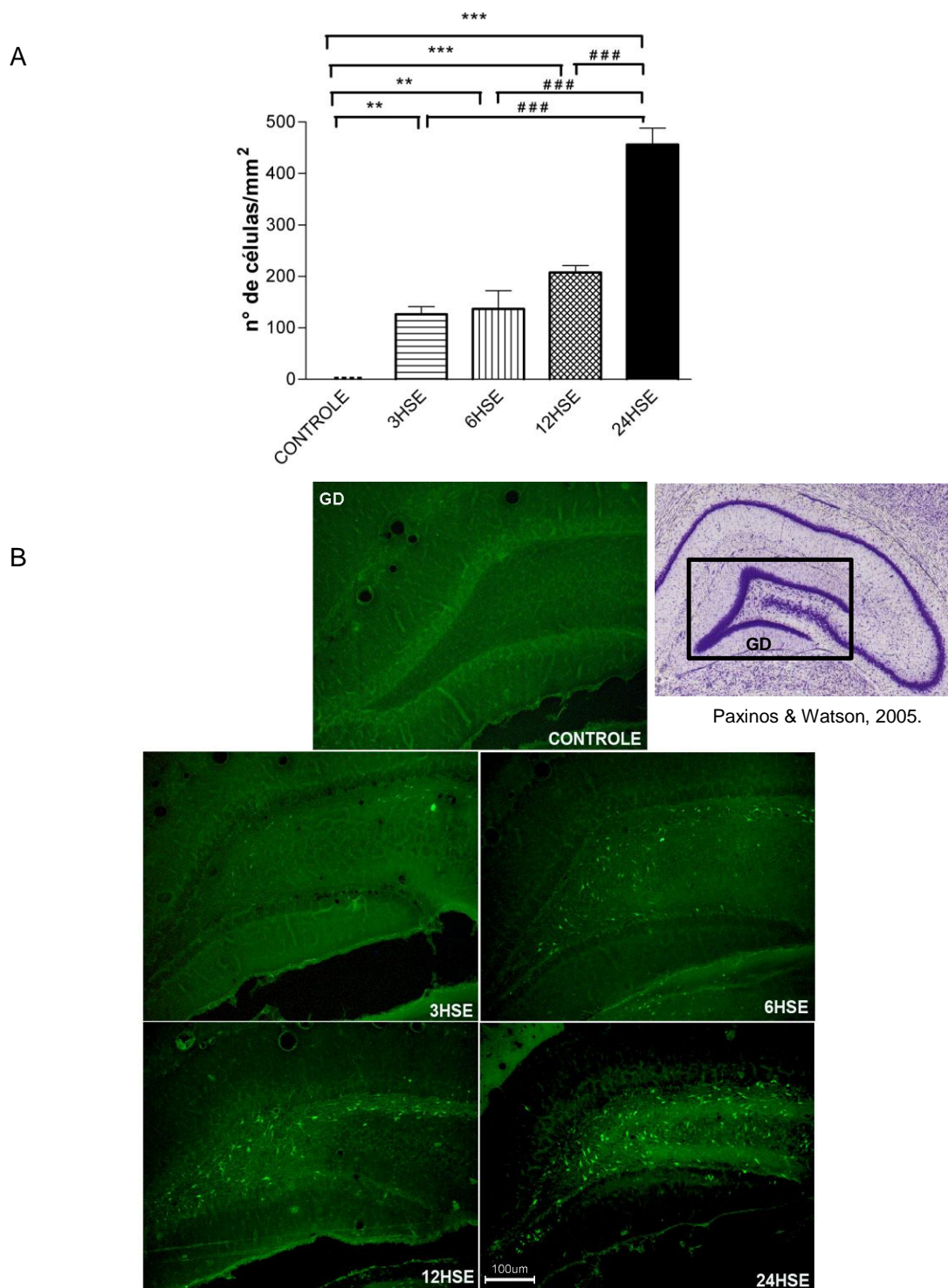
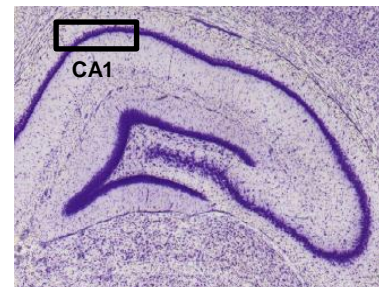
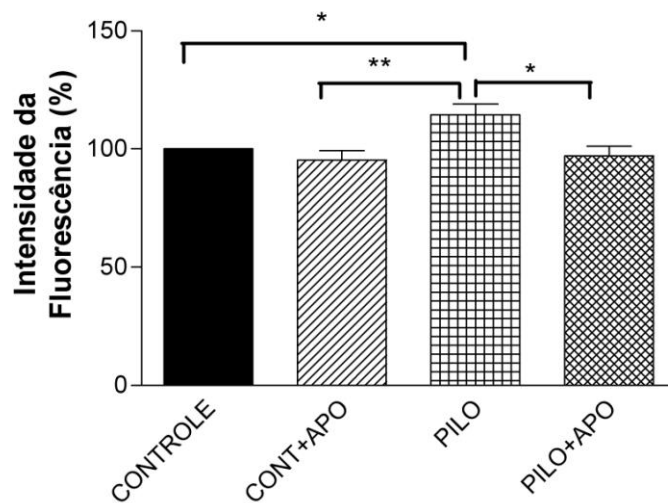


Figura 7. Efeito da PILO na morte neuronal no giro denteado do hipocampo de ratos avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após indução de SE. Os valores do gráfico representam a contagem de corpos celulares de neurônios em degeneração no giro denteado (A). *** indica $p < 0,001$, ** indica $p < 0,01$ vs CONTROLE, ### indica $p < 0,001$ vs 24HSE. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando o padrão de morte neuronal pelo método de Fluoro-Jade B no giro denteado do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

A



Paxinos e Watson, 2005.

B

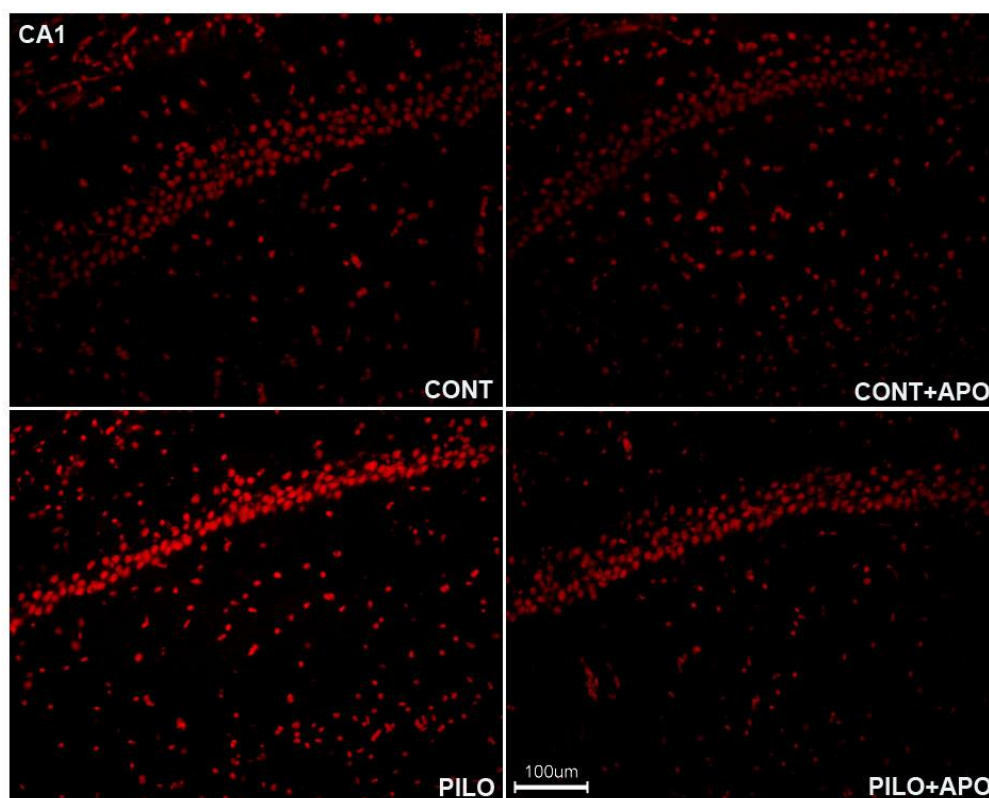
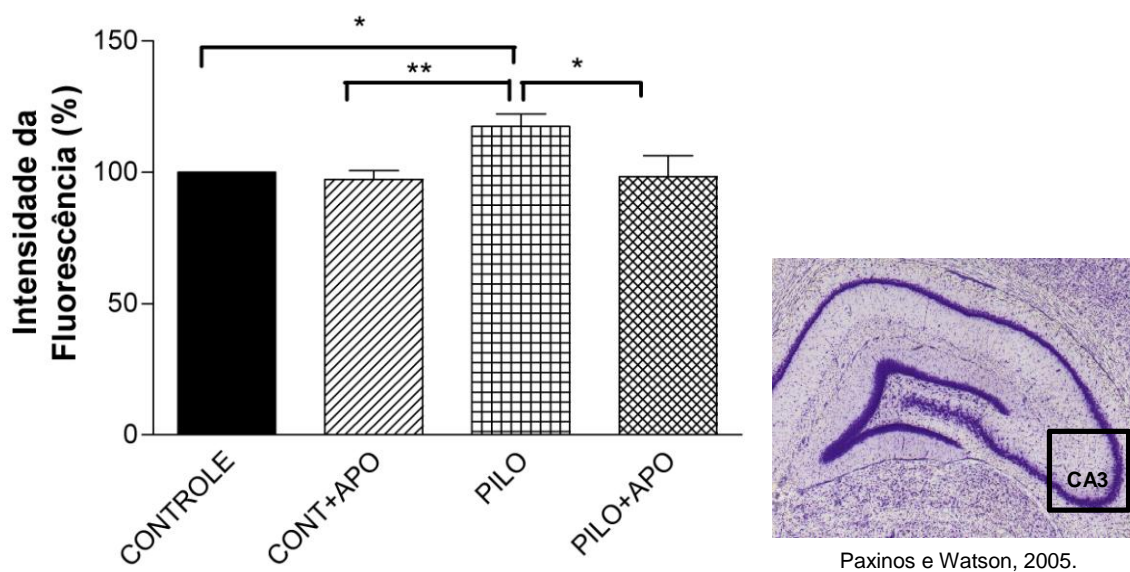


Figura 8. Efeito do tratamento com APO sobre a geração de EROs na região CA1 do hipocampo de ratos avaliados após 24 horas de SE. Os valores do gráfico representam a intensidade da fluorescência dos produtos derivados da oxidação da DHE (A). * indica $p < 0,05$ PILO vs CONTROLE, PILO vs PILO+APO ** indica $p < 0,01$ CONT+APO vs PILO. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando a geração de EROs na região CA1 do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

A



B

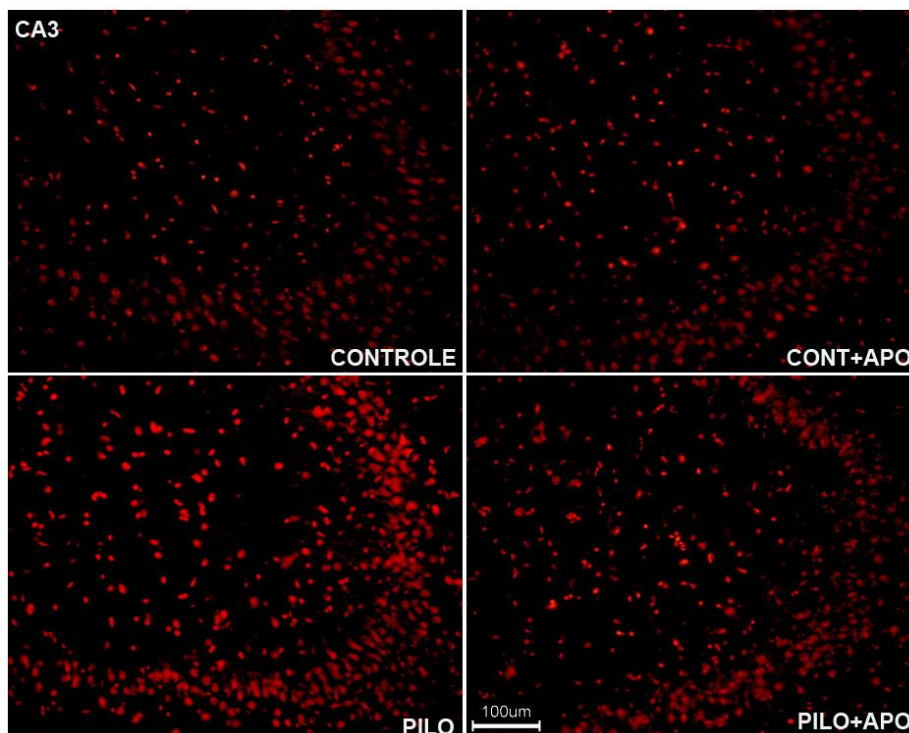


Figura 9. Efeito do tratamento com APO sobre a geração de EROs na região CA3 do hipocampo de ratos avaliados após 24 horas de SE. Os valores do gráfico representam a intensidade da fluorescência dos produtos derivados da oxidação da DHE (A). * indica $p < 0,05$ PILO vs CONTROLE, PILO vs PILO+APO ** indica $p < 0,01$ CONT+APO vs PILO. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando a geração de EROs na região CA3 do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

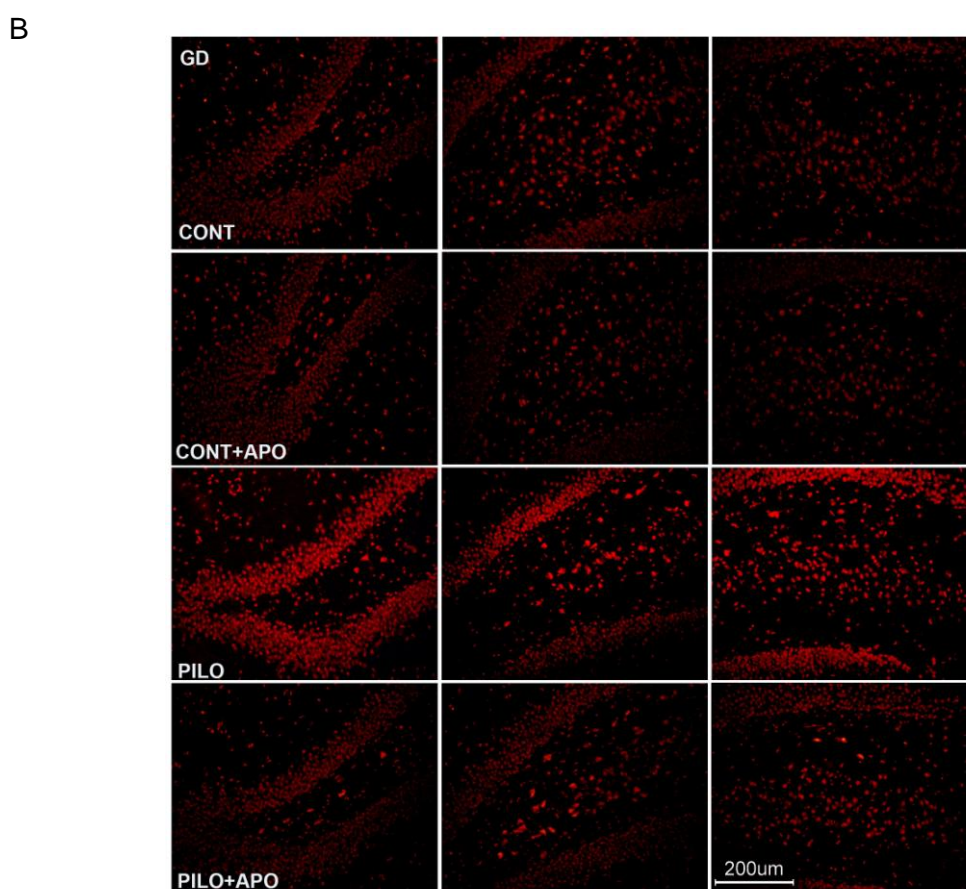
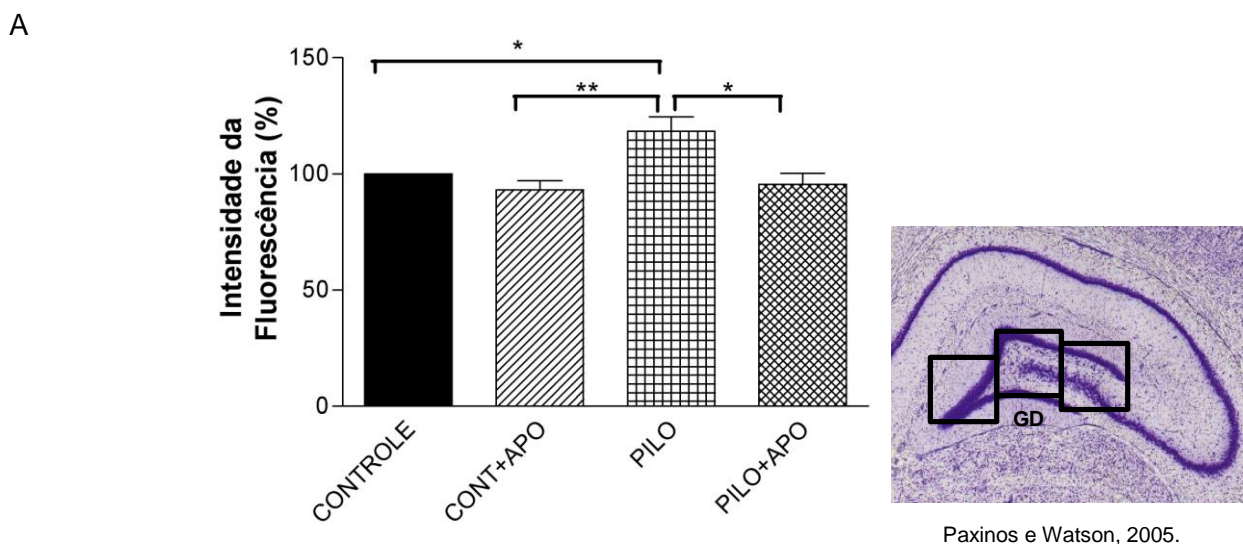
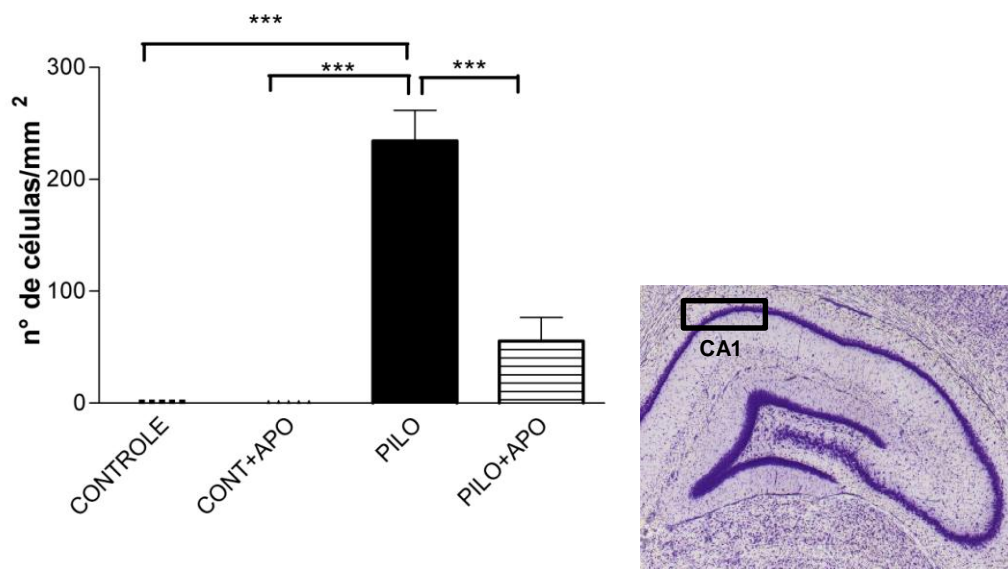


Figura 10. Efeito do tratamento com APO sobre a geração de EROs no giro denteado do hipocampo de ratos avaliados após 24 horas de SE. Os valores do gráfico representam a intensidade da fluorescência dos produtos derivados da oxidação da DHE (A). * indica $p < 0,05$ PILO vs CONTROLE, PILO vs PILO+APO ** indica $p < 0,01$ CONT+APO vs PILO. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando a geração de EROs representada por 3 imagens no sentido médio-lateral do giro denteado do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

A



Paxinos e Watson, 2005.

B

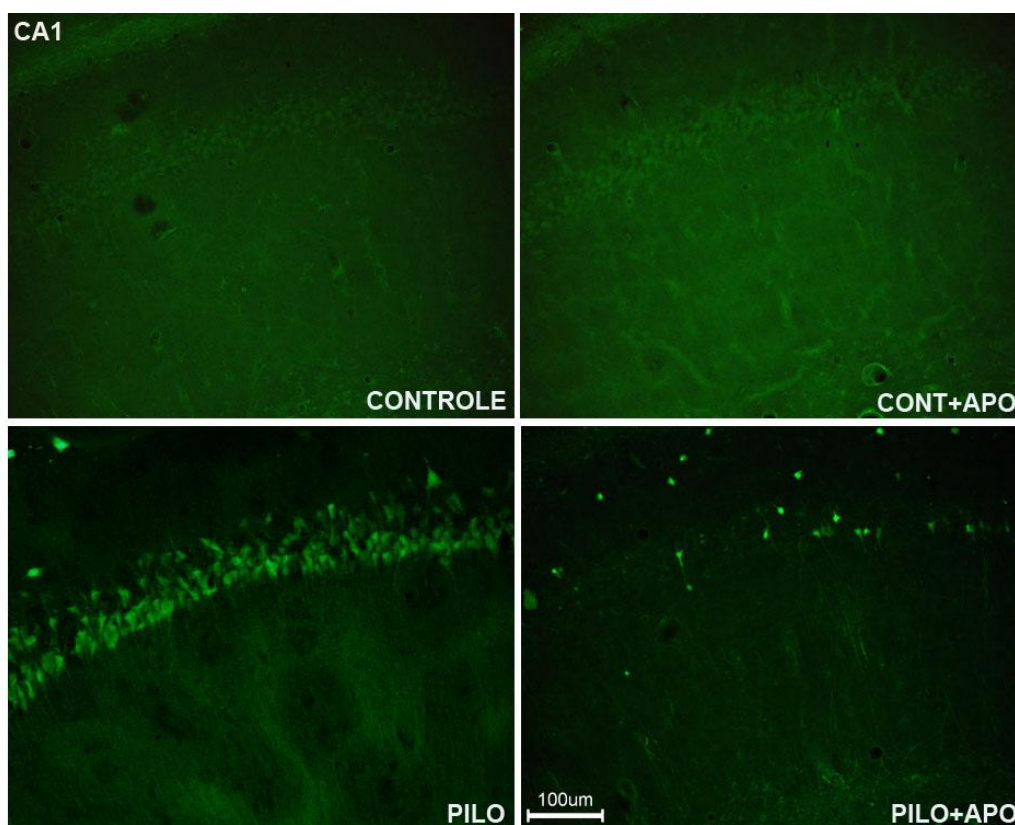


Figura 11. Efeito do tratamento com APO na morte neuronal na região CA1 do hipocampo de ratos após 24 horas de SE. Os valores do gráfico representam a contagem de corpos celulares de neurônios em degeneração na região CA1 (A). *** indica $p < 0,001$ PILO vs CONTROLE, CONT+APO vs PILO, PILO vs PILO+APO. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando o padrão de morte neuronal pelo método de Fluoro-Jade B na região CA1 do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

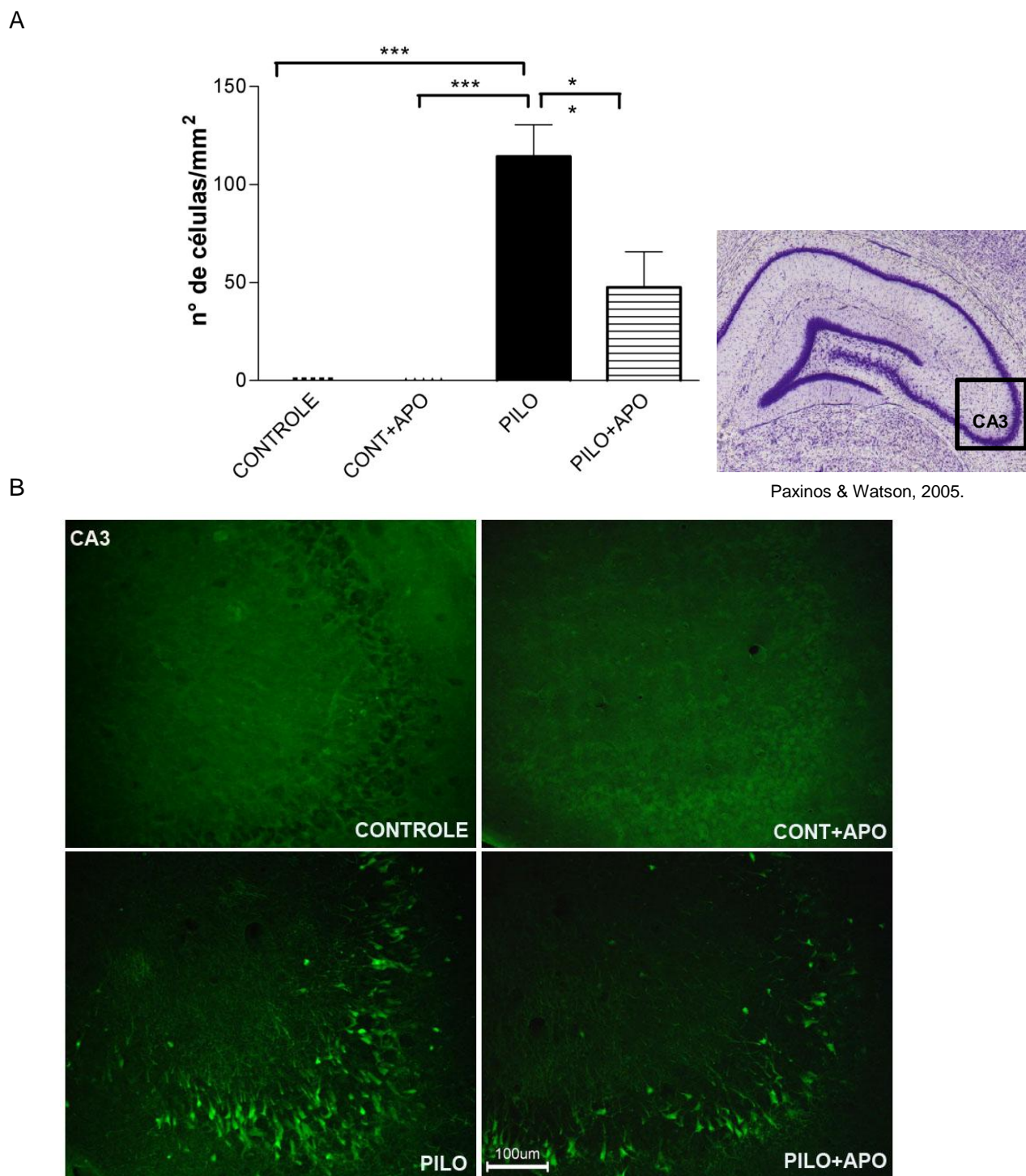
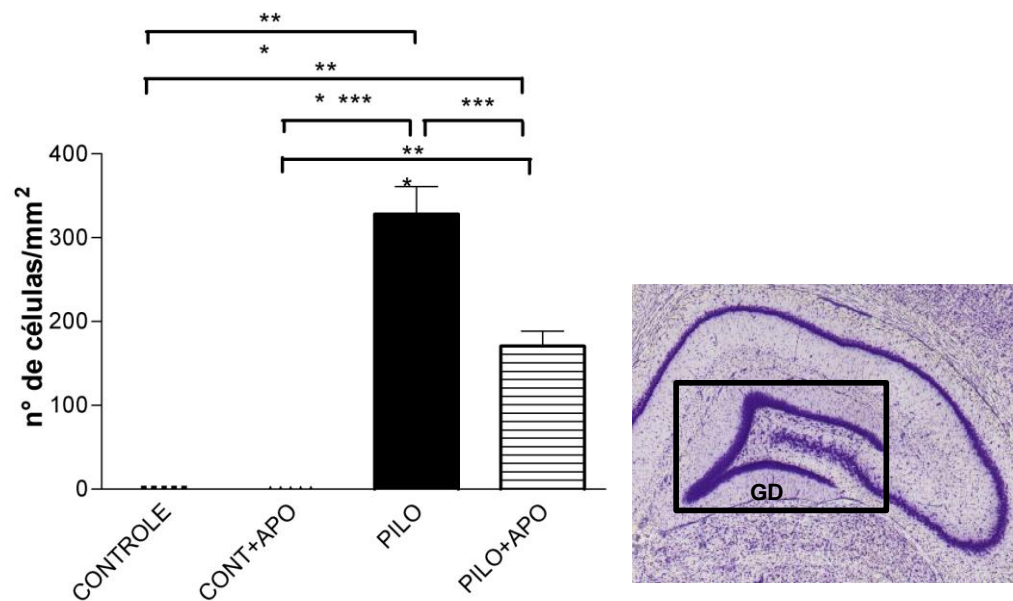


Figura 12. Efeito do tratamento com APO na morte neuronal na região CA3 do hipocampo de ratos após 24 horas de SE. Os valores do gráfico representam a contagem de corpos celulares de neurônios em degeneração na região CA3 (A). *** indica $p < 0,001$ PILO vs CONTROLE, CONT+APO vs PILO, $p < 0,01$ PILO vs PILO+APO. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando o padrão de morte neuronal pelo método de Fluoro-Jade B na região CA3 do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

A



B

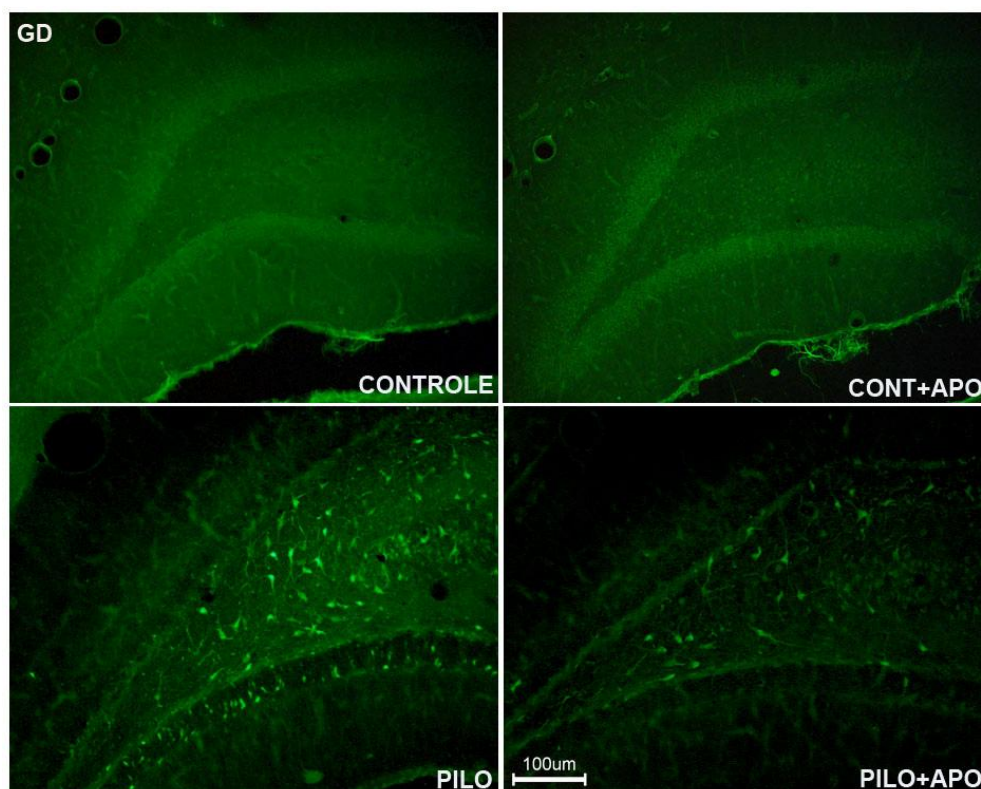


Figura 13. Efeito do tratamento com APO na morte neuronal no giro denteado do hipocampo de ratos após 24 horas de SE. Os valores do gráfico representam a contagem de corpos celulares de neurônios em degeneração no giro denteado (A). *** indica $p < 0,001$ PILO vs CONTROLE, PILO+APO vs CONTROLE, CONT+APO vs PILO, PILO vs PILO+APO. Em B, imagens digitais de cortes histológicos coronais de encéfalos de ratos ilustrando o padrão de morte neuronal pelo método de Fluoro-Jade B no giro denteado do hipocampo. A figura do hipocampo com coloração de Nissl ilustra o local de onde foram obtidas as imagens.

EVOLUÇÃO TEMPORAL					
Regiões	Efeitos da PILO	Períodos			
		3HSE	6HSE	12HSE	24HSE
CA1	Geração de EROs		↑		↑
	Morte Neuronal				↑
CA3	Geração de EROs				↑
	Morte Neuronal				↑
GD	Geração de EROs	↑	↑	↑	↑
	Morte Neuronal	↑	↑	↑	↑

Tabela 2: Resumo dos resultados após diferentes tempos do início do SE induzido por PILO.

TRATAMENTO APO		
Regiões	Efeitos do tratamento com APO	Períodos
		24HSE
CA3	Geração de EROs	↓
	Morte Neuronal	↓
CA1	Geração de EROs	↓
	Morte Neuronal	↓
GD	Geração de EROs	↓
	Morte Neuronal	↓

Tabela 3: Resumo dos resultados apresentados do tratamento com APO após 24 horas do início do SE .

5. DISCUSSÃO

A neurodegeneração no hipocampo é um marco importante na ELT, o que justifica os inúmeros estudos que visam entender os mecanismos que contribuem para a morte neuronal nessa condição. O modelo de ELT induzido por PILO reproduz os eventos moleculares e celulares da doença, representando uma oportunidade ímpar para a compreensão do fenômeno epiléptico.

A PILO é um potente agonista colinérgico muscarínico extraído da planta brasileira *Pilocarpus jaborandi* (Cavalheiro et al., 1995). Quando administrada intraperitonealmente, ela é capaz de induzir um quadro de SE prolongado que causa dano excitotóxico e morte neuronal (Freitas et al., 2004). A PILO, ligando-se aos receptores muscarínicos M1, ativa a fosfolipase C e produz diacilglicerol e inositol trifosfato, alterando as correntes de Ca^{2+} e K^+ , conseqüentemente aumentando a excitabilidade da membrana pós-sináptica (Segal, 1988). Este aumento de excitabilidade termina por promover o aumento da liberação de glutamato, que induz o SE. O glutamato, ao ligar-se aos receptores do tipo AMPA e NMDA, permite grande influxo de Ca^{2+} na célula pós-sináptica, induzindo excitotoxicidade e consequente morte celular. Existem indícios de que o início das crises resulta da ativação dos receptores M1 e que a sua manutenção depende da ativação dos receptores de glutamato do tipo NMDA (Nagao et al., 1996; Smolders et al., 1997).

Os dois mecanismos principais responsáveis por manter a toxicidade induzida pelo glutamato são: o influxo de cálcio, que leva à ativação de vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} e o estresse oxidativo, que pode diretamente ocasionar danos a constituintes celulares como a oxidação de proteínas,

lipídeos e do DNA. Todos estes fatores sabidamente contribuem para morte neuronal (Choi, 1985, 1987, 1988, 1992; Choi et al., 1989; Choi and Rothman, 1990).

As EROs oxidam gorduras poliinsaturadas e resíduos de fosfolipídios, os quais parecem ser especialmente susceptíveis à oxidação (Siems et al., 1995). Os danos oxidativos também levam a mudanças na função das proteínas, fragmentação química e aumento da susceptibilidade ao ataque proteolítico (Davies, 1987; Stadtman, 1986; Wolff et al., 1986).

Considerando que no modelo de PILO o estresse oxidativo contribui para a morte neuronal (Bondy e Lee, 1993; Bruce e Baudry, 1995; Shulz et al., 1995; Ueda et al., 1997) investigamos a morte neuronal e a geração de EROs em animais submetidos ao SE.

Os resultados obtidos demonstraram morte neuronal no GD após 3, 6, 12 e 24 horas do SE e nas regiões CA1 e CA3 após 24 horas. Nossos resultados corroboram com os achados de Fujikawa et al. (1996) e Covolan et al. (2000), que observaram um prejuízo precoce na camada polimórfica do GD 3 horas após o início do SE, seguindo para as regiões CA3-CA1 24 horas após o início do SE, utilizando o método de coloração conhecido como “dark neuron”. Ainda nesse sentido, Wang et al. (2008) evidenciaram neurônios positivos para Fluoro-jade C após 4 horas de SE, alcançando picos após 12 horas na camada piramidal de CA1-CA3 e região polimórfica do GD.

Esta perda acentuada de neurônios da camada polimórfica e de neurônios piramidais nas regiões CA1 e CA3 com relativa preservação dos neurônios granulares e neurônios da região CA2 é uma característica marcante da esclerose hipocampal (Babb et al., 1984a, 1984b, Duvernoy 1988; Babb e

Brown 1987; Mouritzen-Dam 1980). Sabe-se que os principais fatores responsáveis por essa variação de sensibilidade as lesões no hipocampo, não somente nas epilepsias, mas em outras condições, estão intimamente relacionadas à expressão diferencial de receptores e proteínas nos neurônios hipocámpais que podem levar a um aumento da excitabilidade e/ou neurodegeneração de populações neuronais específicas (Gloor, 1991; Auer e Siesjö, 1988).

As regiões CA1, CA3 e a região polimórfica do giro denteado são vulneráveis por duas razões. Primeiro, estas regiões são ricas em certos receptores para glutamato, como os receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA) no caso de CA1 e receptores para cainato no caso da camada polimórfica e região CA3 (Geddes e Cotman,1986; Tremblay et al., 1985). Estes receptores, quando ativados, permitem um influxo de grande quantidade de íons cálcio para o meio intracelular do neurônio-alvo, que poderiam alcançar concentrações lesivas às células. Características que conferem maior resistência neuronal incluem a presença de proteínas com propriedades de tamponar o cálcio, tais como calbindina e cromogranina (Babb et al., 1989; Baimbridge e Miller, 1982; Sloviter, 1989). Nesse sentido as células granulares do giro denteado, resistentes ao SE apresentam grandes quantidades de receptores NMDA, porém estas são capazes de sobreviver ao influxo de cálcio melhor que os neurônios de CA1 possivelmente porque contêm grandes quantidades citoplasmáticas da proteína ligante de cálcio calbindina (Bronstein et al.,1990).

Há sugestões também que os receptores de glutamato do tipo AMPA podem estar envolvidos na vulnerabilidade hipocámpal. A ausência ou

diminuição da expressão da subunidade GluR2 nos receptores AMPA pode desempenhar um papel na hiperexcitabilidade e/ou neurodegeneração neuronal, pois a presença da subunidade GluR2 nos receptores AMPA regula negativamente o influxo de Ca^{2+} nos neurônios. Friedman et al. (2003) observaram que ratos “knockdown” para GluR2, preparados pela administração de oligonucleotídeos no hipocampo dorsal, apresentavam degeneração dos neurônios de CA3. Adicionalmente, Sommer et al. (2001) observaram que a diminuição da expressão da subunidade GluR2 nos neurônios de CA3 no modelo de ELT induzido por ácido caínico implica na degeneração neuronal. Similarmente, Sanchez et al. (2001) observaram que diminuição da expressão de GluR2 nos neurônios de CA1 pode levar à hiperexcitabilidade neuronal no modelo de epileptogênese perinatal induzido por hipóxia em ratos. Por outro lado, During et al. (1993) observaram que o aumento da expressão da subunidade GluR6 pela administração do vetor HSV-1 no hipocampo de ratos causa crises espontâneas, hiperexcitabilidade nas células de CA1 e perda de neurônios nas regiões CA1 e CA3.

A morte neuronal nas regiões CA1, CA3 e camada polimórfica do giro denteado no presente estudo foram avaliadas pelo método de Fluoro-Jade B, a qual marca neurônios em degeneração e não diferencia se esses neurônios são necróticos ou apoptóticos. No entanto, Fujikawa et al. (1996, 1999, 2000, 2002) demonstraram em modelos animais de ELT, como os da PILO, PILO-lítio e ácido caínico que os neurônios piramidais de CA1, CA3 e neurônios da camada polimórfica do giro denteado apresentavam características morfológicas de necrose, sendo que alguns destes neurônios necróticos apresentaram fragmentação de DNA somente após 72 horas de SE. Nesse

contexto podemos sugerir que os neurônios em degeneração presentes neste estudo são necróticos.

Em relação ao aumento da geração de EROs, observamos aumento da geração no GD em 3, 6, 12 e 24 horas após o SE, na região CA1 em 6 e 24 horas após início do SE e em CA3 após 24 horas. Nossos achados estão de acordo com os obtidos por Freitas et al. (2005) que observaram o aumento da geração de EROs no hipocampo durante o SE induzido por pilocarpina através do aumento dos metabólitos nitrito, nitrato e, além disso, diminuição da atividade das enzimas decompositoras de EROs, superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione (GSH) após 24 horas de SE. Adicionalmente, Frantseva et al. (2000), usando o modelo de epilepsia induzido por estimulação da amígdala (*kindling*) também demonstraram aumento da produção de EROs no hipocampo pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica e que o tratamento com antioxidantes pode diminuir a morte neuronal induzida pelas crises. Ainda, Tejada et al. (2007) observaram com 2 horas de SE que altas doses de PILO no córtex produzem níveis aumentados de peroxidação lipídica e das atividades das enzimas catalase, GSH, e SOD, além de diminuição da vitamina E.

Nossos resultados demonstram que o aumento da geração de EROs ocorreu em tempos diferentes nas regiões avaliadas. Este aumento das EROs em tempos diferentes pode sugerir uma relação com a expressão diferencial de receptores e proteínas nas regiões avaliadas, como previamente descrito. Outra hipótese seria que as enzimas antioxidantes também podem se comportar de maneira diferente nas regiões hipocâmpais, podendo ser mais expressas nas regiões CA1 e CA3 e menos expressas no GD por exemplo,

hipótese não vista em nenhum estudo, já que os mesmos em geral avaliam as atividades enzimáticas em homogenatos hipocampais.

Outro aspecto que tem que ser levado em consideração em relação ao aumento de EROs em tempo diferentes é o método de quantificação empregado, que pode não ter sensibilidade suficiente para produzir diferenças significativas com o número de animais utilizados.

De acordo com os nossos resultados, o aumento de EROs coincidiu com a neurodegeneração após 24 horas da indução do SE; portanto, escolhemos este período para o tratamento com o inibidor da NADPH oxidase, a APO .

O resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o tratamento com APO durante 7 dias, utilizando a dose de aproximadamente 3 mg por dia (Ceravolo et al., 2007), foi capaz de diminuir a geração de EROs e a morte neuronal após 24 horas de SE.

Como descrito previamente, a enzima NADPH oxidase é uma fonte endógena de EROs; ela está presente em neutrófilos, células vasculares, células endoteliais, fibroblastos, neurônios, entre outras células e sua ativação ocorre após estímulo, fosforilação e migração para a membrana de suas subunidades citosólicas, que efetuam a transferência de equivalentes redutores do NADPH para o oxigênio, gerando $O_2^{\bullet-}$ (Babior, 1999; Lopes et al., 1999a; 1999b; Vignais, 2002).

A APO tem sido usada como um inibidor eficiente do complexo NADPH oxidase em muitos modelos experimentais envolvendo células fagocíticas e não fagocíticas (Lafeber et al., 1999; Zhang et al., 2005). O mecanismo de inibição não é totalmente conhecido, mas sabe-se que a apocinina evita a translocação do componente citosólico p47phox para a membrana do

complexo NADPH oxidase, impedindo a geração de $O_2^{\bullet-}$ (Barbieri et al., 2004; Peters et al., 2001). Há indícios também que a APO age predominantemente como um antioxidante em células endoteliais e células musculares lisas vasculares, e não apenas como um inibidor da NADPH oxidase ao menos nessas células. (Heumuler et al., 2008).

Nossos resultados estão de acordo com Maldonado et al. (2010), que testaram dois protocolos utilizando 5 mg/kg de APO no modelo de Huntington induzido por ácido quinolínico (QUIN) em ratos. Em um dos protocolos a APO foi administrada ip 30 minutos antes e 1 hora depois da injeção intraestriatal de QUIN, e no outro protocolo a APO foi administrada apenas 30 minutos após a injeção de QUIN. Os dois protocolos se mostraram eficazes tanto na prevenção da geração de EROs avaliada pela análise dos produtos derivados da oxidação da DHE em homogenatos estriatais, quanto na melhora do quadro comportamental. No entanto, diminuição da neurodegeneração foi observada apenas no protocolo que utilizou a APO antes e após a injeção de QUIN.

Nesse sentido, em um estudo que avaliou a liberação de superóxido em cultura primária de microglia tratada com paraquato (um herbicida utilizado na indução do modelo de Parkinson), Peng et al. (2009) demonstraram que o tratamento com APO inibiu a liberação dessa ERO, além de terem observado uma redução da morte de neurônios dopaminérgicos por meio da marcação por tirosina hidroxilase. Adicionalmente Masood et al. (2008) também demonstraram que o tratamento com APO (3mg/kg i.p.), administrada 30 minutos antes do início do tratamento com *L-buthionine-(S,R)-sulfoximine* (300 mg/kg i.p.), um agente indutor de estresse oxidativo, reverteu a geração de EROs no hipotálamo e na amígdala de camundongos observada pelo marcador

fluorescente DCF-DA (diacetato de dichlorodihidrofluoresceína), assim como alterações comportamentais induzidas pelo tratamento.

Nossos resultados apontam para o envolvimento da NADPH oxidase na morte neuronal hipocampal induzida por PILO durante o SE, inferindo que isoformas da Nox estão presentes no hipocampo, o que está de acordo com dados da literatura (Tejada-Simon et al., 2005). Estudos revelaram que neurônios expressam as isoformas da NADPH oxidase Nox 1 (Ibi et al.; 2006), Nox 2 (Tammariello et al.; 2000) e Nox 4 (Vallet et al., 2005). Além disso, outros trabalhos revelaram a presença da isoforma Nox 2 em células da glia (Pawate et al., 2004; Abramov, et al., 2005). Patel et al. (2005) demonstraram através do marcador quimioluminescente coelenterazina que as crises induzidas pelo ácido caínico em ratos resultam no aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ pela NADPH em frações de membranas de células hipocâmpais avaliadas 2 a 7 dias após a injeção, quando comparadas com ratos controles, além de terem relatado também ativação microglial através do marcador OX-42. Estes autores também verificaram que os níveis de subunidades citosólicas da NADPH oxidase (p47phox, p67phox e rac-1) avaliadas por *immunoblotting* estavam diminuídas nas frações citosólicas e aumentadas nas frações de membranas, sendo que esta translocação ocorreu de 3 a 7 dias após administração de ácido caínico.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se sugerir que o estresse oxidativo contribui para a morte neuronal durante o SE induzido por PILO. Além disso, é provável que a NADPH oxidase esteja envolvida nesse processo, uma vez que a APO, possivelmente pela diminuição de EROs, diminui a neurodegeneração presente na ELT. Sendo assim fica clara a

importância de estudos que visam investigar os mecanismos envolvidos na geração de EROs como subsídio para futuras intervenções no processo de epileptogênese.

6. CONCLUSÕES

- No período agudo do modelo de ELT induzido por PILO ocorre aumento da geração de EROs e morte neuronal;
- O tratamento com APO diminui os níveis de EROs e a morte neuronal durante o período agudo do modelo de ELT nas regiões CA1, CA3 e giro denteado;
- Pode-se sugerir que as EROs geradas pela NADPH oxidase estão envolvidas na morte neuronal observada durante o período agudo do modelo de ELT .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramov AY, Jacobson J, Wientjes F, Hothersall J, Canevari L, Duchen MR (2005). Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. *J Neurosci.* 25(40): 9176-84.

Annegers JF (1997) Epidemiology of epilepsy. In: WYLLIE E (Ed), *The treatment of epilepsy: principles and practice* 2nd ed., Baltimore: Williams & Wilkins 165–172.

Arrigo AP (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med.* 27:936-44.

Auer RN, Siesjö, BK (1988) Biological differences between ischemia, hypoglycemia, and epilepsy. *Ann Neurol.* 24: 699-707.

Augusto O (2006) *Radicais livres bons, maus e naturais.* São Paulo.

Babb TL, Brown WJ (1986) Neuronal, dendritic, and vascular profiles of human temporal lobe epilepsy correlated with cellular physiology in vivo. *Adv Neurol.* 44: 949–66.

Babb, TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH (1984a) Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 25:729-40.

Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH (1984b) Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia* 25: 721-8.

Babb TL, Wilson CL, Isokawa-Akesson M (1987) Firing patterns of human limbic neurons during stereoencephalography (SEEG) and clinical temporal lobe seizures. *EEG Clin Neurophysiol.* 66: 467-482.

Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH (1989) Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci.*9: 2562-74.

Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood.* 93:1464-76.

Baimbridge KG, Miller J (1992) Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. *Brain Res.*245: 223-9.

Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, Brambilla M, Caiani A, Tremoli E, Colli S (2004) Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 37:156–165.

Begley CE, Annegers JF, Lairson LB, Reynolds TF, Hauser WA (1994) Cost of epilepsy in the United States: a model based on incidence and prognosis.

Epilepsia.35: 1230-43.

Ben-Ari Y (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375-403.

Bengzon, J, Mohapel P, Ekdahl CT, Lindvall O (2002) Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. *Prog Brain Res.* 135: 111-19.

Bonan CD, Walz R, Pereira GS, Worm PV, Battastini AM, Cavalheiro EA, Izquierdo I, Sarkis JJ (2000) Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 39:229-238.

Bondy SC, Lee DK (1993) Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res.* 610:229-33.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7162-6.

Bourgeois BF (1992) General concepts of medical intractability. In: *Epilepsy surgery* (Ludens H, ed), pp 77-82. New York.

Bronstein JM, Farber DB, Micevych PE, Lasher R, Wasterlain CG (1990)

Kindling induced changes in calmodulin kinase II immunoreactivity. *Brain Res.* 524:49-53.

Bruce AJ, Baudry M (1995) Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radic Biol Med.* 18:993-1002.

Candelario-Jalil E, Ajamieh HH, Sam S, Martinez G, Leon Fernandez OS (2000) Nimesulide limits kainate-induced oxidative damage in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 390:295-8.

Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32:778-82.

Cavalheiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 16:33-37.

Cavalheiro EA, Santos NF, Priel MR (1996) The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia* 37(10): 1015-9.

Ceravolo GS, Fernandes L, Munhoz CD, Fernandes DC, Tostes RC, Laurindo FR, Scavone C, Fortes ZB, Carvalho MH (2007). Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension.* 50: 756-61.

Chang ML, Wu CH, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY (2007) Reactive

changes of retinal astrocytes and Muller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity. *J Anat.* 210:54-65.

Choi DW (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett.* 58:293-7.

Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 7:369-79.

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

Choi DW, Weiss JH, Koh JY, Christine CW, Kurth MC (1989) Glutamate neurotoxicity, calcium, and zinc. *Ann N Y Acad Sci.* 568:219-24.

Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci.* 13:171-182.

Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 23:1261-1276.

Cohen MR, Ramchand CN, Sailer V, Fernandez M, McAmis W, Sridhara N, Alston C (1987) Detoxification enzymes following intrastriatal kainic acid. *Neurochem Res.* 12:425-9.

Covolán L, Mello LE (2000) Temporal profile of neuronal injury following

pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.* 39:133-52.

Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262(5134): 689-95.

Davies KJ (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem.* 262:9895-901.

Donovan N, Becker EB, Konishi Y, Bonni A (2002) JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem.* 277:40944-9.

Dragunow M, Young D, Hughes P, MacGibbon G, Lawlor P, Singleton K, Sirimanne E, Beilharz E, Gluckman P (1993) Is *c-jun* involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischemic brain injury? *Brain Res Mol Brain Res.* 18: 347–52.

During, MJ, Mirchandani, GR, Leone P, Williamson A, de Lanerolle NC, Geschwind, MD, Bergold, PJ, and Federoff, HJ (1993). Direct hippocampal injection of a HSV-1 vector expressing GLUR6 results in spontaneous seizures, hyperexcitability in CA1 cells and loss of CA1, hilar and CA3 neurons. In *Society for Neuroscience Abstracts*, 19, 21.

Duvernoy H (1988) *The Human Hippocampus: An Atlas of applied anatomy.*

Engel JJ (1989) Seizures and epilepsy. Philadelphia: F. A. Davis.

Engel J Jr (1996) Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 26:141-50.

Ferreira BL, Valle AC, Cavalheiro EA, Timo-laria C (2003) Absence-like seizures in adult rats following pilocarpine-induced status epilepticus early in life. *Braz J Med Biol Res.*36: 1685-94.

Frantseva MV, Perez Velazquez JL, Tsoraklidis G, Mendonca AJ, Adamchik Y, Mills LR, Carlen PL, Burnham MW (2000) Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. *Neuroscience.* 97:431-5.

Freitas RM, Nascimento VS, Vasconcelos SM, Sousa FC, Viana GS, Fonteles MM (2004) Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 365:102-5.

Freitas RM, Vasconcelos SM, Souza FC, Viana GS, Fonteles MM (2005) Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *Febs J.* 272:1307-12.

Friedman LK, Veliskova J, Kaur J, Magrys BW, Liu H (2003) GluR2(B) knockdown accelerates CA3 injury after kainate seizures. *J Neuropathol Exp*

Neurol 62:733-50.

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

Fujikawa DG, Shinmei S, Cai B (1999) Lithium–pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. *Eur J Neurosci.* 11: 1605–14.

Fujikawa DG (2000) Confusion between neuronal apoptosis and activation of programmed cell death mechanisms in acute necrotic insults. *Trends Neurosci.* 23: 410-1.

Fujikawa DG (2002) Apoptosis: ignoring morphology and focusing on biochemical mechanisms will not eliminate confusion. *Trends Pharmacol Sci.* 23: 309–10.

Fujikawa DG (2006) Status Epilepticus: Mechanisms and Management. In: (Press M, ed), pp 463-480. Cambridge.

Fujikawa DG, Shinmeia SS, Zhaoa S, Aviles Jr ER (2007) Caspase-dependent programmed cell death pathways are not activated in generalized seizure-induced neuronal death. *Brain Research* 1135:206-218.

Geddes JW, Cotman CW (1986) Plasticity in hippocampal excitatory amino acid

receptors in Alzheimer's disease. *Neurosci Res.*3: 672-8.

Gillardon F, Wickert H, Zimmerman M (1995) Up-regulation of *bax* and down-regulation of *bcl-2* is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain. *Neurosci. Lett.* 192: 85–88.

Gloor P (1991) Mesial temporal sclerosis: Historical background and overview from a modern perspective. In: H. Luders, Ed., *Epilepsy surgery*, New York, pp. 689-703.

Guerreiro C, Guerreiro M (1996) *Epilepsia*. 2^a edição. São Paulo.

Hauser WA, Hesdorffer DH (1991) *Epilepsy: frequency, causes e consequences*, Demos Press Edition. New York.

Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA (1996) Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 71:576–86.

Hengartner MO, Horvitz HR (1994) *C.elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell.* 76: 665-76.

Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K, Brandes RP (2008) Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension.* 51:211-7.

Ibi M, Katsuyama M, Fan C, Iwata K, Nishinaka T, Yokoyama T, Yabe- Ibi M, Katsuyama M, Fan C, Iwata K, Nishinaka T, Yokoyama T, Yabe-Nishimura C (2006) NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Free Radic Biol Med.* 40(10): 1785-95.

Isokawa M (1997) Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 744: 339-43.

Jiang X, Wang X (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem.* 275:31199-203.

Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 8, 1865-79.

Kamata H, Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 11:1-14.

Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 149:43-50.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-57.

Lafeber FP, Beukelman CJ, van den Worm E, van Roy JL, Vianen ME van

Roon JA, van Dijk H, Bijlsma JW (1999) Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis," *Rheumatology* 38:1088–93.

Lancel M, Faulhaber J, Schiffelholz T, Mathias S, Deisz RA (1997) Muscimol and midazolam do not potentiate each other's effects on sleep EEG in the rat. *J Neurophysiol.* 77: 1624-9.

Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C (2005) Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol.* 20:205-219.

Leist M, Jäätelä M (2001). Fours deaths and a funeral; from caspases to alternative mechanisms. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2: 589-598.

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1990). Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neurosc Biobehav Rev.* 14:511–7.

Liu W, Bi X, Tocco G, Baudry M, Schreiber SS (1996) Increased expression of cyclin D1 in the adult rat brain following kainic acid treatment. *Neuroreport.* 7: 2785–9.

Lopes LR, Hoyal CR, Kanus UG, Babior BM (1999a) Activation of the leukocyte

NADPH oxidase by protein kinase C in a partially recombinant cell-free system. *J Biol Chem.* 274: 15533-7.

Lopes LR, Laurindo FR, Mancini Filho J, Curi R, Sannomiya P (1999b) NADPH-oxidase activity and lipid peroxidation in neutrophils from rats fed fat-rich diets. *Cell Biochem Funct.* 17(1): 57-64.

Lothman EW, Rempe DA, Mangan OS (1995) Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol.* 74: 841-8.

Lushnikov EF (2001) *Cell Death (Apoptosis)*. Moscou.

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

Maldonado PD, Molina-Jijón E, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J (2010) NAD(P)H oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: protective role of apocynin. *J Neurosci Res.* 88:620-9.

Masood A, Nadeem A, Mustafa SJ, O'Donnell JM (2008) Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 326:369-79.

Meldrum BS, Bruton CJ (1992) Epilepsy. In: Greenfiels neuropathology. 5th ed. Oxford, England: Oxford University Press. p. 1246-83.

Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34:985-95.

Mouritzen-Dam A (1980) Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia*. 21:617-629.

Nagao T, Alonso A, Avoli M (1996) Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience*. 72:399-408.

Noronha AL, Borges MA, Marques LH, Zanetta DM, Fernandes PT, de Boer H, Espíndola J, Miranda CT, Prilipko L, Bell GS, Sander JW, Li LM (2007) Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. *Epilepsia*. 48:880-5.

Ojemann, GA (1987) Surgical therapy for medically intractable epilepsy. *J Neurosurg*. 66: 489–99.

Olney JW, Ho OL, Rhee V, DeGubareff T (1973) Letter: Neurotoxic effects of glutamate. *N Engl J Med*. 289:1374-1375.

Patel M, Li QY, Chang LY, Crapo J, Liang LP (2005) Activation of NADPH

oxidase and extracellular superoxide production in seizure-induced hippocampal damage. *J Neurochem.* 92:123-31.

Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier Academic Press.

Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR (2004) Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res.* 77(4): 540-51.

Peng J, Stevenson FF, Oo ML, Andersen JK (2009) Iron-enhanced paraquat-mediated dopaminergic cell death due to increased oxidative stress as a consequence of microglial activation. *Free Radic Biol Med.* 46:312-20.

Peters EA, Hiltermann JTN, Stolk J (2001) Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics *Free Radic Biol and Med.* 31:1442–47.

Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA (2004) Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 59:478-93.

Proskuryakov SY, Gabai VL, Konoplyannikov AG (2002) Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Mosc)* 67:387-408.

Riljak V, Milotova M, Jandova K, Pokorny J, Langmeier M (2007) Morphological changes in the hippocampus following nicotine and kainic acid administration. *Physiol Res.* 56:641-9.

Sakhi S, Bruce A, Sun N, Tocco G, Baudry M, Schreiber SS (1994) p53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci. USA* 91: 7525–9.

Sakhi S, Sun N, Wing LL, Mehta P, Schreiber SS (1996) Nuclear accumulation of p53 protein following kainic acid-induced seizures. *Neuroreport.* 7:493–6.

Sanchez RM, Koh S, Rio C, Wang C, Lamperti ED, Sharma D, Corfas G, Jensen FE (2001) Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J Neurosci.* 21:8154-63.

Sander JW (2003) The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol.* 16: 165–70.

Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30: 1191-212.

Schmued LC, Hopkins KJ (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 874:123-30.

Shulz JB, Henshaw DR, Siwek D, Jenkins BG, Ferrante RJ, Cipolloni PB, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF (1995) Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem.* 64:2239-47.

Schwartzman RA, Cidlowski JA (1993) Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev.* 14:133-51.

Segal M. (1988) Synaptic activation of a cholinergic receptor in rat hippocampus. *Brain Res.* 452: 79–86.

Siems WG, Grune T, Esterbauer H (1995) 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sci.* 57:785-9.

Sies H, Cadenas E (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 311: 617-31.

Sloviter RS (1989) Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol.* 280:183-96.

Sloviter RS, Dean E, Sollas AL, Goodman JH (1996) Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J Comp Neurol.* 366:516-33.

Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol.* 121:1171-9.

Sommer C, Roth SU, Kiessling M (2001) Kainate-induced epilepsy alters protein expression of AMPA receptor subunits GluR1, GluR2 and AMPA receptor binding protein in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol.* 101:460-8.

Spencer SS (2002) Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia* 43: 219–27.

Srinivasan A, Lehmler HJ, Robertson LW, Ludewig G (2001) Production of DNA strand breaks in vitro and reactive oxygen species in vitro and in HL-60 cells by PCB metabolites. *Toxicol Sci.* 60:92-102.

Stadtman ER (1986) Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem Sci.* 11: 11–12.

Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G (1988) Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science.* 239:1147-50.

Tammariello SP, Quinn MT, Estus S (2000) NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci.* 20: RC53.

Tauck DL, Nadler JV (1985) Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci.* 5:1016-22.

Tejada S, Sureda A, Roca C, Gamundi A, Esteban S (2007) Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine. *Brain Res Bull.* 71:372-5.

Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, Kanterewicz BI, Wu GY, Quinn MT, Klann E (2005) Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci.* 29:97-106.

Todorova VK, Harms SA, Kaufmann Y, Luo S, Luo KQ, Babb K, Klimberg VS (2004) Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res Treat* 88: 247–56.

Tremblay E, Represa A, Ben-Ari Y (1985) Autoradiographic localization of kainic acid binding sites in the human hippocampus. *Brain Res.* 343: 378-82.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983a) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 9:315-35.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L,

Kleinrok Z (1983b) Acute and long-term effects of systemic pilocarpine in rats: spontaneous recurrent seizures as a possible model of temporal lobe epilepsy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 324: 25R.

Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LE, Schwarz M, Turski L (1984) Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res.* 321: 237–53.

Ueda Y, Yokoyama H, Niwa R, Konaka R, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H (1997) Generation of lipid radicals in the hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rats. *Epilepsy Res.* 26:329-33.

Ueda Y, Yokoyama H, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H (1998) ESR spectroscopy for analysis of hippocampal elimination of a nitroxide radical during kainic acid-induced seizure in rats. *Magn Reson. Med* 40:491-3.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:44-84.

Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Herrmann F, Michel JP, Szanto I (2005) Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience.* 132: 233-8.

Vignais PV (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural

aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 59:1428-59.

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

Wieser HG (2004) ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 45:695–714.

Wolff SP, Garner A, and Dean RT (1986) Free radicals, lipids, and protein degradation. *Trends Biochem Sci* 11: 27–31.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encode a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* 75: 641-52.

Yuen AW, Sander JW (2004). Is omega-3 fatty acid deficiency a factor contributing to refractory seizures and SUDEP? A hypothesis. *Seizure.* 13: 104-7.

Zhang Y, Chan MMK, Andrews MC (2005) Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *Am J Hypertens.* 18: 910–6.