

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Morfologia dos neurônios granulares novos do hipocampo no modelo  
de epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina**

**Gabriel Maisonnave Arisi**

**Ribeirão Preto**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Morfologia dos neurônios granulares novos do hipocampo no modelo  
de epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina**

**Gabriel Maisonnave Arisi**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade  
de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo para concorrer ao Título de  
Doutor em Ciências pelo curso de Pós-  
Graduação em Fisiologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco**

**Ribeirão Preto**

**2007**

## SUMÁRIO

Lista de figuras e tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Resumo	x
Summary	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Hipocampo	2
1.1.1. Neuroanatomia da formação hipocampal	2
1.1.2. Fisiologia do hipocampo	11
1.2. Neurogênese	14
1.3. Epilepsia	17
1.3.1. Modelos Experimentais de Epilepsia	20
1.3.1.1. Modelo experimental da pilocarpina	22
1.3.2. Brotamento das fibras musgosas	24
1.4. Morfologia de neurônios	29
<b>2. MATERIAIS &amp; MÉTODOS</b>	<b>32</b>
2.1. Animais Experimentais	32
2.2. Modelo da Pilocarpina	32
2.3. Monitoramento do comportamento	33
2.4. Perfusão	33
2.5. Imunohistoquímica para <i>doublecortin</i>	34
2.6. Microscopia e Estereologia	35
2.7. Reconstrução tridimensional	36

2.7.1. Análise de Sholl	38
2.7.2. Análise de segmentos dendríticos ( <i>branch order analyses</i> )	38
2.7.3. Histograma polar	39
2.8. Autometalografia de Timm-Danscher	39
2.9. Imunohistoquímica para BDNF	40
2.10. Imunohistoquímica para <i>doublecortin</i> em tecido humano	41
2.11. Estatística	42
3. RESULTADOS	43
3.1. Tratamento com Pilocarpina	43
3.2. Monitoramento do comportamento	43
3.2.1. Comportamentos de sacudir o corpo e a cabeça	43
3.2.2. Crises espontâneas	43
3.3. Imunohistoquímica para <i>doublecortin</i>	44
3.4. Contagem Estereológica	47
3.5. Reconstrução tridimensional	49
3.5.1. Análise de Sholl	52
3.5.2. Análise dos segmentos dendríticos ( <i>branch order analyses</i> )	55
3.5.3. Histograma polar	56
3.6. Autometalografia de Timm-Danscher	58
3.7. Imunohistoquímica para BDNF	60
3.8. Imunohistoquímica para <i>doublecortin</i> em tecido humano	60
4. DISCUSSÃO	63
4.1. Aumento da neurogênese nos animais epiléticos	64
4.2. Arborização dendrítica apical e brotamento das fibras musgosas	66
4.3. O papel do BDNF	69

<b>4.4. Dendritos basais</b>	<b>70</b>
<b>4.5. Arquivos digitais dos neurônios DCX+</b>	<b>71</b>
<b>4.6. <i>Doublecortin</i> em tecido humano</b>	<b>72</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>74</b>
<b>6. Resumos apresentados em congressos</b>	<b>75</b>
<b>7. Distinções</b>	<b>76</b>
<b>8. Bibliografia</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO C</b>	<b>104</b>

## Lista de figuras e tabelas

Figura 1. Esquema de corte coronal da formação hipocampal de ratos	3
Figura 2. Camadas da formação hipocampal	5
Figura 3. Esquema mostrando a via trissináptica do hipocampo	8
Figura 4. Neurogênese hipocampal	15
Figura 5. Brotamento das fibras musgosas	26
Figura 6. Exemplo de arquivo de coordenadas	37
Figura 7. Imunohistoquímica para DCX	45
Figura 8. Soma e dendritos de neurônios DCX+	46
Figura 9. Contagem estereológica	47
Figura 10. Número de neurônios DCX+	48
Figura 11. Neurônios DCX+ e análise de Sholl	50 e 51
Figura 12. Análise de Sholl (bifurcações e intersecções)	53
Figura 13. Análise de Sholl (terminações e comprimento)	54
Figura 14. Comprimento dos segmentos dendríticos	56
Figura 15. Histogramas polares	57
Figura 16. Autometalografia de Timm-Danscher	59
Figura 17. Imunohistoquímica para BDNF	60
Figura 18. Imunohistoquímica para <i>doublecortin</i> em tecido humano	61
Figura 19. Arborização dendrítica dos neurônios DCX+	68
Tabela 1. Medidas morfológicas dos neurônios DCX+	49
Tabela 2. Análise dos segmentos dendríticos	55

## Lista de abreviaturas e siglas

AMG	autometalografia
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil- isoxazolpropionato
BDNF	fator neurotrófico derivado de cérebro
BrdU	bromodeoxiuridina
CA	corno de Amon
CA1	região 1 do corno de Amon
CA2	região 2 do corno de Amon
CA3	região 3 do corno de Amon
CCD	dispositivo de carga acoplado
CS	colaterais de Schaffer
DCX	<i>doublecortin</i>
DCX+	neurônio <i>doublecortin</i> -positivo
DNA	ácido desoxirribonucléico
ELT	epilepsia do lobo temporal
EPM	erro padrão da média
FM	fibras musgosas
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GABA	ácido gama-amino-butírico
GCL	camada granular do giro denteado
GD	giro denteado
GEPR	<i>genetically epilepsy-prone rats</i>

Lista de abreviaturas e siglas (cont.)

HS	<i>head shakes</i>
IML	camada molecular interna do giro denteado
IPI	injúria precipitadora inicial
LIS	lissencefalia
LTP	potenciação de longa duração
ML	camada molecular do giro denteado
MML	camada molecular média do giro denteado
NDS	<i>normal donkey serum</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
NMDA	n-metil-D-aspartato
O/A	interneurônios <i>oriens/alveus</i>
OML	camada molecular externa do giro denteado
PB	tampão fosfato
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PHA-L	leucoaglutinina do feijão
RNA	ácido ribonucléico
SCLH	lâmina subcortical heterotópica
SE	<i>status epilepticus</i>
SGZ	zona subgranular do giro denteado
SNC	sistema nervoso central

Lista de abreviaturas e siglas (cont.)

TrkB	proteína tirosina-quinase B
VP	via perforante
WAR	<i>Wistar audiogenic rats</i>
WDS	<i>wet dog shakes</i>
X-SCLH/LIS	síndrome SCLH/LIS do cromossomo X
ZnT-3	transportador vesicular de zinco

## RESUMO

A epilepsia do lobo temporal é a síndrome epiléptica humana mais comum e a mais difícil de controlar com o uso de fármacos. Muitos desses pacientes farmacorresistentes têm que ser submetidos a drásticas intervenções cirúrgicas para a ressecção de grandes áreas cerebrais. A epilepsia do lobo temporal associada à esclerose do hipocampo, denominada epilepsia do lobo temporal mesial, é alvo de intensos estudos clínicos e experimentais.

O hipocampo esclerótico é caracterizado pela morte de neurônios piramidais e pelo brotamento de terminais sinápticos aberrantes ricos em zinco na camada molecular interna e no *hilus* do giro denteado. Esse brotamento resulta do crescimento de colaterais axonais dos neurônios granulares do giro denteado. Outra mudança fundamental no hipocampo na condição epiléptica é o aumento da neurogênese que ocorre no giro denteado. Essas alterações afetam o padrão de conectividade da formação hipocampal e, portanto, o funcionamento desta rede neuronal.

Modelos animais experimentais foram desenvolvidos para auxiliar na elucidação da patofisiologia dessa condição. O modelo da pilocarpina induz um estado convulsivo sustentado denominado *status epilepticus* e após um período silencioso, crises recorrentes espontâneas e esclerose hipocampal.

A proteína *doublecortin* tem sido utilizada recentemente como um marcador de neurônios granulares novos no giro denteado de animais adultos. Sua distribuição citoplasmática permite a visualização e o estudo da arborização dendrítica dos novos neurônios.

O objetivo desse estudo foi quantificar e visualizar em três dimensões, através de estereologia e reconstruções digitais, alterações na quantidade dos novos neurônios granulares e em sua morfologia no hipocampo de animais experimentais com epilepsia do lobo temporal.

Ratos Wistar adultos foram tratados com pilocarpina e a ocorrência de *status epilepticus* registrada. Os animais foram monitorados diariamente para o registro de crises recorrentes espontâneas. Um mês após o *status epilepticus* induzido por pilocarpina os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos com solução fixadora.

Os neurônios positivos para *doublecortin* eram duas vezes mais numerosos no hipocampo dos animais epiléticos e apresentavam arborização dendrítica apical com o mesmo número de bifurcações e terminações e também o mesmo comprimento total que os animais controles. Porém, a distribuição da árvore dendrítica apical era bastante diferente nos animais epiléticos. As bifurcações dendríticas eram mais numerosas na camada granular e as terminações dendríticas se concentraram na camada molecular interna do giro denteado. Havia mais comprimento dendrítico nas camadas granular e molecular interna e menos comprimento dendrítico nas camadas molecular média e externa no giro denteado dos animais epiléticos.

Essa mudança na distribuição da arborização dendrítica apical em conjunto com a maior frequência de dendritos basais nos novos neurônios granulares dos animais epiléticos causou uma concentração dos dendritos nas regiões onde ocorreram brotamentos das fibras musgosas.

Essas alterações morfológicas indicam que os novos neurônios granulares que são adicionados ao giro denteado após o *status epilepticus* não se desenvolvem normalmente. Isso poderia ser causado por mudanças de níveis extracelulares de neurotrofinas como o *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF).

A coincidência espacial entre os dendritos dos novos neurônios granulares e os terminais sinápticos aberrantes que resultam do brotamento das fibras musgosas poderia facilitar a formação de sinapses recorrentes que contribuiriam para a epileptogênese no hipocampo.

## SUMMARY

The role of hippocampal neurogenesis in epileptogenesis is under investigation in the last years. In this thesis, the newly born granule cells morphology was investigated in the temporal lobe epilepsy pilocarpine model. The immunohistochemistry for the protein doublecortin was employed to visualize the soma and dendritic arborizations of the newly born granular neurons.

Digital reconstructions of doublecortin-positive neurons revealed that apical dendrites had the same total length and number of nodes in epileptic and control animals. Nonetheless, Sholl's concentric spheres analyses revealed that apical dendrites spatial distribution was radically altered in epileptic animals. The apical dendrites had more bifurcations inside the granular cell layer and more terminations in the inner molecular layer of epileptic dentate gyrus. Branch order analyses showed that second and third order dendrites were shorter in epileptic animals. Polar histograms showed no differences in the angular growth distribution of epileptic animals. Nonetheless, apical dendrites were concentrated in regions like the inner molecular layer where granular neuron axons, named mossy fibers, sprout in epileptic animals.

The combination of altered dendritic morphology and number enhancement of the new granular neurons suggest a deleterious role of hippocampal neurogenesis in epileptogenesis. Being more numerous and with dendrites concentrated in regions where aberrant axon terminals sprout, the newly born granular neurons could contribute to the slow epileptogenesis in hippocampal circuits commonly observed in temporal lobe epilepsy.

# 1. INTRODUÇÃO

O estudo da epilepsia muitas vezes contribuiu para a descoberta de propriedades fisiológicas do sistema nervoso como, por exemplo, o mapeamento das regiões somatosensórias realizado *in vivo* em neurocirurgias para resecção de focos epiléticos (Penfield & Rasmussen, 1952).

O mesmo ocorreu na descoberta da participação do hipocampo na formação de memórias declarativas em estudos com o paciente H. M. que teve boa parte do lobo temporal, incluindo o hipocampo, ressecado de ambos os hemisférios cerebrais em 1953 para controlar crises epiléticas (Corkin, 2002). A epilepsia do lobo temporal é até os dias de hoje a síndrome epilética mais difícil de controlar com o uso de fármacos. Muitas vezes apenas o tratamento cirúrgico com a resecção de grandes porções do lobo temporal consegue debelar as crises epiléticas (Semah *et al.*, 1998).

O interesse pelo estudo do hipocampo na condição epilética foi aumentado pela demonstração de que o giro denteado da formação hipocampal é uma das regiões do sistema nervoso central com contínua produção de novos neurônios em animais adultos (Altman & Das, 1965), inclusive na nossa espécie (Eriksson *et al.*, 1998). A importância da neurogênese hipocampal na epilepsia do lobo temporal ficou mais evidente com a demonstração em animais experimentais que crises epiléticas tornavam mais numerosos os neurônios granulares novos (Bengzon *et al.*, 1997; Parent *et al.*, 1997).

A possibilidade de estudar a morfologia dos novos neurônios granulares do hipocampo através da imunohistoquímica para a proteína *doublecortin* (Rao

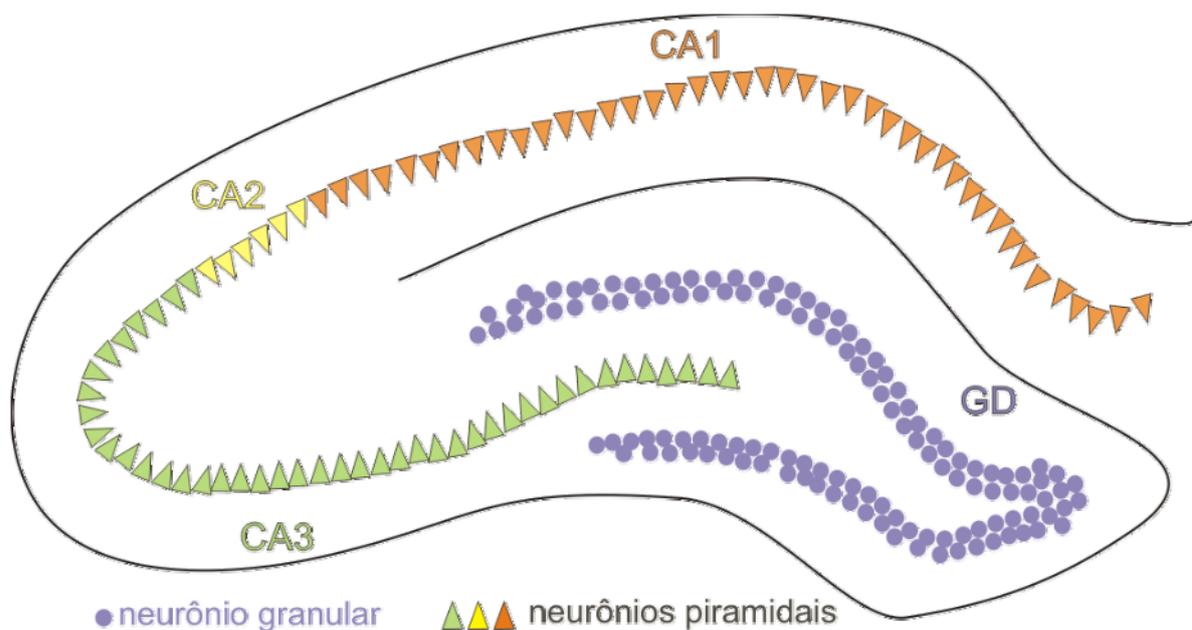
& Shetty, 2004) abriu novas janelas para a compreensão do papel da neurogênese hipocampal na epilepsia do lobo temporal.

A hipótese que norteou a realização desse estudo foi a de que os novos neurônios granulares do giro denteado teriam sua morfologia alterada nos animais epiléticos. Abordaremos agora em maior profundidade como o hipocampo e a neurogênese que ocorre nesse relacionam-se com a epilepsia.

## **1.1. Hipocampo**

### **1.1.1. Neuroanatomia da formação hipocampal**

Os neurônios da formação hipocampal, uma proeminente estrutura mesial do sistema límbico, foram intensamente estudados nas últimas décadas. Esse interesse é explicado por três motivos: primeiro, o papel da formação hipocampal no aprendizado associativo e memória é mais bem compreendido que o papel desempenhado por outras estruturas corticais; segundo, a organização em três camadas das duas estruturas centrais da formação hipocampal, o corno de Amon (CA) e o giro denteado (GD), característica de arqueocórtex, é mais simples que as estruturas neocorticais (Figs. 1 e 2); terceiro, o hipocampo é também uma das principais zonas de proliferação neuronal com a presença de novos neurônios granulares que são incorporados funcionalmente ao giro denteado (Figs. 3 e 4).



**Figura 1.** Esquema de corte coronal da formação hipocampal de ratos. Estão representados os neurônios granulares do giro dentado (GD) e os neurônios piramidais do corno de Amon (CA) dividido nas regiões CA1, CA2 e CA3.

Além de seu papel fisiológico, o hipocampo desperta interesse por seu envolvimento em patologias. Uma esclerose do hipocampo é comumente associada à síndrome epiléptica mais comum e difícil de controlar com o uso de fármacos, a epilepsia do lobo temporal. Esse quadro clínico é denominado epilepsia do lobo temporal mesial (Hermann *et al.*, 1997).

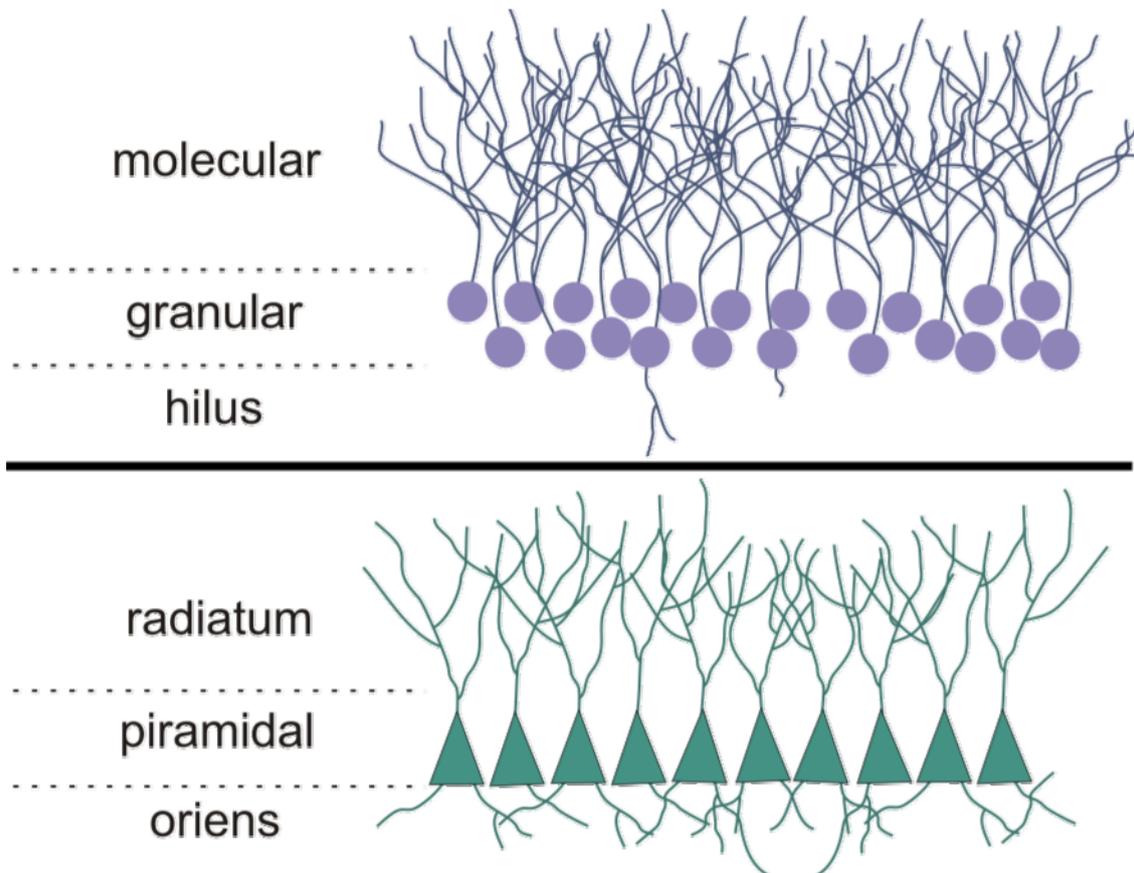
O sistema límbico forma uma borda (*limbus*) em torno da extremidade anterior do tronco cerebral, do diencéfalo e corpo caloso do cérebro humano. Os principais componentes do sistema límbico são a formação hipocampal, os córtices límbicos associativos e o complexo amigdalóide. A amígdala e a formação hipocampal estão localizadas na parte medial do lobo temporal, adjacente ao giro parahipocampal em seres humanos. O córtex do giro parahipocampal inclui o complexo subicular e o córtex entorrinal, os quais

estão relacionados funcionalmente à formação hipocampal (Salmenperä, 2001).

A formação hipocampal faz parte do sistema límbico e foi identificada pelo anatomista Arantius no século XVI. Foi assim denominada por sua semelhança com um cavalo marinho (hipocampo, em grego) quando observada no assoalho das projeções temporais dos ventrículos laterais do cérebro humano. A formação hipocampal é constituída pelo hipocampo, giro denteado (também chamado *fascia dentata*), complexo subicular e córtex entorrinal. O hipocampo propriamente dito é denominado *Cornu Ammonis*, ou corno de Amon, por sua forma lembrar a de um chifre de carneiro presente na cabeça do deus egípcio Amon (Amaral, 1999).

As lâminas de neurônios principais que originam o corno de Amon e o giro denteado dobram-se ao longo do desenvolvimento formando duas estruturas interdigitadas em forma de C, ambas constituindo um arqueocórtex em três camadas ou *strata* (Affifi & Bergman, 1998). Essa estrutura em camadas é conservada nos giros denteados de roedores e primatas (Amaral & Witter, 1989).

Neurônios são denominados principais quando recebem ou realizam sinapses com neurônios externos ao núcleo ou região em que estão situados. Interneurônio é a denominação de neurônios que apenas possuem sinapses locais, não necessariamente inibitórias (Shepherd, 2003).



**Figura 2.** Camadas da formação hipocampal. Na parte superior da figura esquema das camadas do giro denteado, onde os somas dos neurônios granulares formam a camada granular, seus dendritos apicais a camada molecular e os poucos dendritos basais estão situados no *hilus*, também chamado camada polimórfica. Na parte inferior da figura esquema das camadas do corno de Amon mostra que os somas dos neurônios piramidais formam a camada piramidal, seus dendritos apicais formam o *stratum radiatum* e seus dendritos basais o *stratum oriens*.

As camadas centrais do corno de Amon e do giro denteado são constituídas pelos corpos celulares dos neurônios principais, sendo denominadas camada piramidal e granular, respectivamente (Fig. 2). Os dendritos apicais dos neurônios piramidais do CA constituem o *stratum radiatum* e seus dendritos basais, o *stratum oriens*. Os dendritos apicais dos neurônios granulares do GD constituem a camada molecular (ou *stratum*

*moleculare*) e seus dendritos basais misturam-se em um estrato polimórfico com os interneurônios presentes no *hilus* (Fig. 2).

Os dendritos basais dos neurônios granulares são muito raros em roedores e mais freqüentes em primatas (Seress, 1992). A camada molecular do giro denteado de roedores é subdividida em três regiões: interna, média e externa. Essa subdivisão existe devido à organização lamelar das aferências do giro denteado. O terço interno recebe principalmente sinapses dos interneurônios do *hilus* e os terços médio e externo recebem sinapses dos neurônios do córtex entorrinal através da via perfurante (Amaral *et al.*, 2007).

Pelo menos vinte e um diferentes tipos de interneurônios foram identificados morfológicamente na região hilar do hipocampo. Alguns são excitatórios, como os neurônios musgosos, que são a maioria na população de interneurônios do *hilus* (Amaral, 1978). A população de interneurônios do *hilus* também apresenta uma grande diversidade histoquímica com a expressão de proteínas como calretinina, parvalbumina, calbindina e neuromoduladores como o neuropeptídeo Y (para uma revisão leia Freund & Buzsáki, 1996).

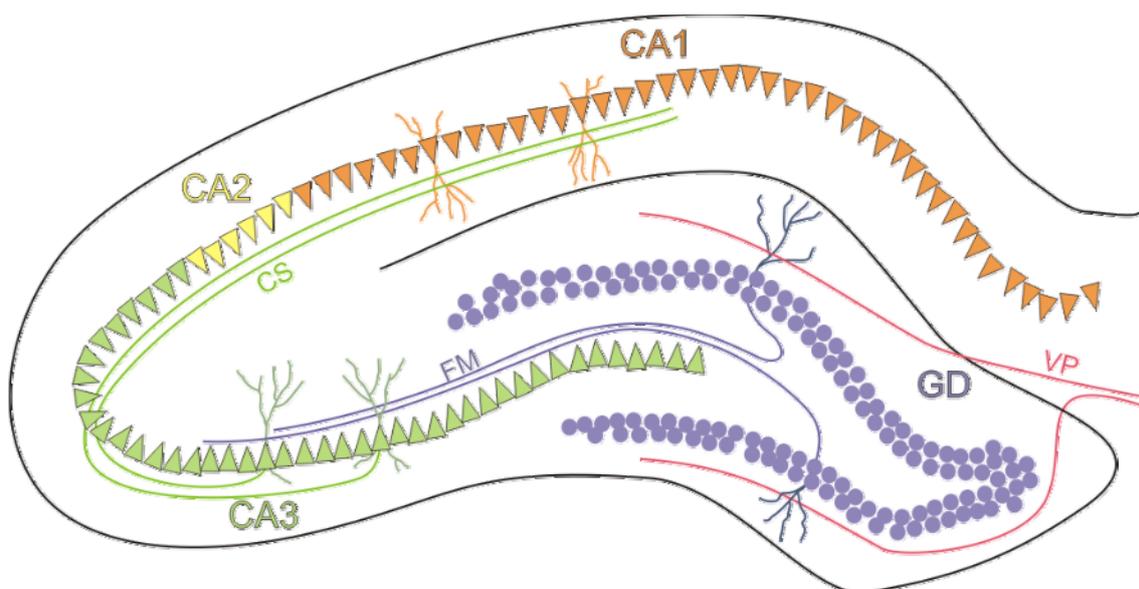
Os interneurônios mais importantes do corno de Amon são os interneurônios O/A, situados no limite do *stratum oriens* com o *alveus*, um conjunto de fibras axonais, e os interneurônios L/M, situados entre os *strata lacunosum* e *moleculare*.

A estrutura tridimensional da formação hipocampal em roedores é relativamente complexa. É uma estrutura alongada com seu eixo mais longo dobrando-se em forma de banana a partir dos núcleos septais localizados rostro-dorsalmente até o lobo temporal em uma posição caudo-ventral. O eixo

longo é denominado septotemporal e o eixo ortogonal a este, é denominado transverso (Amaral & Witter, 1989).

Os conhecimentos anatômicos sobre o hipocampo foram refinados no século XIX por Camillo Golgi, que utilizando sua técnica de coloração por prata, estudou “a forma exata das células que o constituem e o curso e organização de seus feixes de fibras nervosas, o que pode aclarar sua função, que ainda é obscura” (Golgi, 1886). Em seus detalhados estudos morfológicos em 1934, Lorente de Nó estabeleceu a divisão do corno de Amon, em suas regiões (CA1, CA2 e CA3), baseado na avaliação da correlação de diferentes conexões com a citoarquitetura dos neurônios piramidais (Zigmond *et al.*, 1999).

O estudo fisiológico das conexões sinápticas do hipocampo levou ao delineamento, por Andersen e colaboradores (1971), de uma via trissináptica organizada em lamelas dispostas transversalmente ao eixo septotemporal do hipocampo (Fig. 3). Essa via inicia nos neurônios da camada II do córtex entorrinal que projetam seus axônios, que constituem a via perfurante (VP), assim denominada por perfurar a fissura hipocampal, sobre as regiões média e externa da camada molecular do giro denteado onde formam a primeira sinapse da via sobre os dendritos apicais dos neurônios granulares. A segunda sinapse é formada entre os axônios, denominados fibras musgosas, dos neurônios granulares do giro denteado e os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA3. A terceira sinapse da via ocorre entre as projeções axonais dos neurônios piramidais de CA3, chamadas colaterais de Schaffer, e os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA1 (Fig. 3).



**Figura 3.** Esquema mostrando a via trissináptica do hipocampo. Os axônios provenientes do córtex entorrinal constituem a via perfurante (VP) que fazem sinapses nos dendritos apicais dos neurônios granulares. Os axônios dos neurônios granulares, denominados fibras musgosas (FM) fazem sinapses nos dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA3. Os axônios dos neurônios piramidais de CA3, que constituem as colaterais de Schaffer (CS), fazem sinapses nos dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA1.

A via de “saída” de informação do corno de Amon são os axônios dos neurônios piramidais de CA1 que se projetam para o complexo subicular. Andersen e colaboradores (1971) sugeriram que “através desta organização lamelar, pequenas fatias do córtex hipocampal poderiam operar como unidades funcionais independentes, embora conexões septotemporais excitatórias e inibitórias possam modificar o comportamento de disparo de lamelas vizinhas”.

Em uma revisão dos dados anatômicos e fisiológicos realizada por Amaral e Witter (1989) a proposição da organização lamelar do hipocampo foi fortemente contestada. A utilização de traçadores anterógrados (especialmente PHA-L, uma leucoaglutinina do feijão) permitiu a visualização de uma grande

divergência septotemporal das conexões da via trissináptica. Na via perfurante observou-se que, de um ponto de partida no córtex entorrinal, os feixes axonais divergem septal e temporalmente ao longo de vários milímetros, com maior intensidade no sentido septal. Além disso, a via perfurante estimula diretamente os neurônios piramidais de CA3 com intensidade igual à encontrada no GD.

As colaterais de Schaffer também percorrem o eixo septotemporal organizadas em diversos gradientes. Os neurônios piramidais localizados próximos ao giro denteado lançam projeções superficiais no *stratum radiatum* e distantes em CA1, ou seja, próximas ao complexo subicular; estas projeções terminam principalmente em posições situadas um milímetro septalmente em relação às células de origem.

A partir do ponto de origem, as projeções septais distribuem-se mais próximas em CA1 e mais profundamente no *stratum radiatum*. Já nas projeções temporais, as fibras e terminais de CA3 distribuem-se distalmente em CA1 e superficialmente no *stratum radiatum*. Projeções de neurônios piramidais de CA3 situados próximos aos neurônios de CA1 formam terminações no *stratum oriens* e profundamente no *stratum radiatum*. As colaterais de Schaffer possuem muitas terminações recorrentes sobre os dendritos dos próprios neurônios piramidais de CA3, o que, combinado à existência de sinapses elétricas entre esses neurônios, torna o disparo dos neurônios de CA3 altamente sincronizado (Ishizuka *et al.*, 1990).

Apenas as fibras musgosas parecem realmente obedecer a uma organização lamelar transversal ao eixo septotemporal da formação hipocampal. Em roedores, porém, as numerosas terminações sobre os neurônios piramidais

de CA3 são divididas igualmente ipsi e contralateralmente. Colaterais dos axônios musgosos possuem algumas sinapses na camada molecular interna, criando um circuito recorrente no hipocampo normal (Franck et al., 1995; Cavazos et al., 1992 e Seress, 1992). As fibras musgosas receberam este nome, assim como as fibras cerebelares, por assemelhar-se a musgo ao microscópio óptico quando coradas pelo método Golgi. Esta aparência deve-se à existência de botões sinápticos gigantes ao longo dos axônios dos neurônios granulares do giro denteado (Acsády et al., 1998).

Outra característica fundamental das fibras musgosas foi revelada quando Timm (1958) aplicou sua técnica de autometalografia (AMG) revelando a presença de alta quantidade de íons de zinco nos terminais sinápticos destas fibras. Assim como os neurotransmissores, os íons livres de zinco são acumulados no interior de vesículas sinápticas pela atividade de um transportador vesicular específico e então liberados na fenda sináptica em conjunto com o glutamato.

O transportador vesicular de zinco foi denominado ZnT-3, por ser o terceiro a ser descoberto da família dos transportadores de zinco (ZnT-1 a ZnT-5; Kambe *et al.*, 2002), sua expressão é limitada à neurônios e células do testículo. A sequência de aminoácidos desse transportador foi determinada em camundongos e humanos (Palmiter *et al.*, 1996) e sua presença na membrana de vesículas sinápticas que contém zinco foi detectada com a combinação de imunolocalização ultraestrutural com AMG de Timm-Danscher (Wenzel *et al.*, 1997).

Mais uma importante via da formação hipocampal é a via temporoamônica, constituída de contatos monosinápticos de projeções axonais

de neurônios da camada III do córtex entorrinal para o complexo subicular e CA1 (Witter *et al.*, 2000). Esta via realiza apenas uma influência modulatória no ritmo de disparo dos neurônios piramidais de CA1, pois se encontra, em condições fisiológicas normais, sob controle inibitório de interneurônios O/A (Maccaferri & Mcbain, 1995).

Assim sendo, parece ser razoável concluir que “a formação hipocampal é uma região cortical com uma organização tridimensional que realiza processamento de informação em seus eixos transversos e longo” (Amaral & Witter, 1989) e onde as propriedades da rede surgem da interação entre neurônios principais e interneurônios.

Porém é importante salientar que o giro denteado possui conexões neuronais muito mais simples que as do corno de Amon. As conexões externas do GD são unidirecionais com aferências do córtex entorrinal e eferências para a região CA3 (Amaral *et al.*, 2007). A grande complexidade das conexões intrínsecas do giro denteado especialmente entre os neurônios granulares e a grande população de interneurônios do *hilus* contrasta com a simplicidade de suas conexões extrínsecas.

### **1.1.2. Fisiologia do hipocampo**

A descoberta acidental da participação da formação hipocampal na consolidação de memórias explícitas ocorreu graças a lobectomia temporal bilateral, realizada por Scoville (1954) no paciente HM, para o tratamento de epilepsia do lobo temporal em 1953. A formação de novas memórias explícitas foi impossibilitada, mas não houve perda de lembranças anteriores à cirurgia,

sugerindo que o hipocampo atua na formação, mas não na estocagem e evocação de memórias de longo prazo.

A caracterização do fenômeno da potenciação de longa duração (LTP, abreviatura de expressão equivalente em inglês) foi realizada através de estudos eletrofisiológicos, em 1973 por Bliss e Lømo, onde a estimulação rítmica da via perfurante causava uma forte resposta pós-sináptica dos neurônios granulares do giro denteado, com uma mudança duradoura no potencial de membrana destas células. A LTP se tornou o principal mecanismo para a explicação da memória em nível sináptico quando associado ao clássico postulado de plasticidade sináptica de Donald Hebb (1949):

“Quando o axônio da célula A está próximo o bastante para excitar a célula B e repetida ou persistentemente estimula seu disparo, algum processo de crescimento ou mudança metabólica ocorre em uma ou ambas as células, aumentando a eficiência de A como estimuladora do disparo de B”.

A LTP ocorre, em condições fisiológicas, principalmente nas sinapses entre as colaterais de Schaffer e os neurônios piramidais de CA1. O receptor para glutamato do tipo n-metil-D-aspartato (NMDA) medeia esta interação. O hipocampo recebe através do córtex entorrinal aferências da área septal e dos córtices cingulado, íntero-temporal e órbito-frontal, e projeta vias eferentes para as regiões do lobo temporal medial e através destas para os córtices pré-frontal, parietal e as regiões anteriores e posteriores do lobo temporal e também para os corpos mamilares do hipotálamo e o núcleo mediodorsal do tálamo.

A organização interna do hipocampo associada à sua localização estratégica e ampla conexão possibilita a integração e distribuição das representações de alta ordem da percepção episódica, dando origem a memórias associadas amplamente distribuídas em estruturas neocorticais.

O hipocampo e outras estruturas do sistema límbico atuam na gênese da epilepsia do lobo temporal em humanos. A propensão do hipocampo para a ocorrência de disparos neuronais sincronizados de alta frequência, ou seja, epileptiformes, foi demonstrada experimentalmente por Liberson e Cadilhac (1954) com a estimulação elétrica de várias áreas corticais. O hipocampo apresentou o menor limiar elétrico de estimulação para gerar disparos endógenos sustentados. O próprio mecanismo de LTP pode ampliar a disseminação da sincronia da excitação neuronal, realizando o “aprendizado” de padrões de disparo epileptiformes por uma população de neurônios que passa a atuar como foco epileptogênico (Buzsaki, 1989).

O hipocampo também é muito sensível a estímulos estressantes. A exposição prolongada a altos níveis de corticoesteróides causa a morte de neurônios piramidais na região CA3 (Sapolsky *et al.*, 1985). Além disso, o estresse crônico causado por imobilização diária por três semanas em animais experimentais causou alterações dendríticas em neurônios piramidais. Os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA3 eram mais curtos e com menos ramificações nos animais estressados (Watanabe *et al.*, 1992).

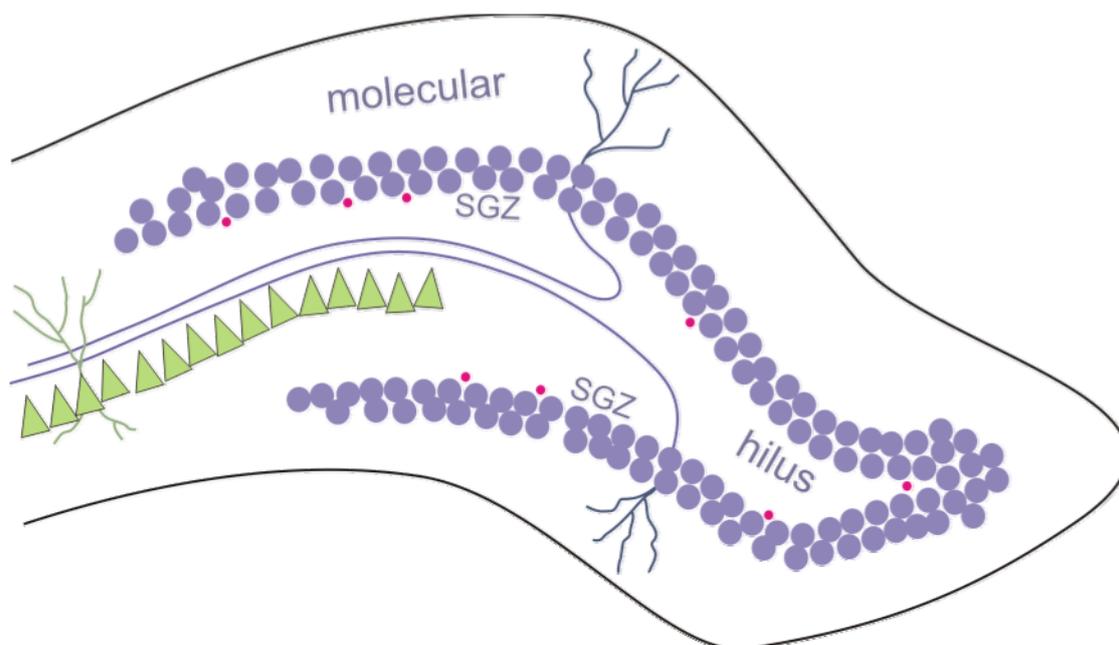
Outra importante característica fisiológica do hipocampo de roedores foi descoberta com estudos eletrofisiológicos que caracterizaram as propriedades intrínsecas da atividade elétrica dos neurônios hipocampais (Storm, 1990) e demonstraram que certos neurônios piramidais (*place cells*) disparam em

resposta a localizações espaciais específicas durante a exploração de um ambiente pelo animal (Wilson & McNaughton, 1993).

Uma observação eletrofisiológica proeminente realizada em neurônios piramidais individuais e em grandes redes neuronais na formação hipocampal, durante a orientação espacial, é a oscilação na frequência de 4-8 Hz, denominada ritmo Teta (Bland, 1986; Kahana *et al.*, 2001). A oscilação teta hipocampal depende fortemente da aferência proveniente do *septum* medial, através da banda diagonal de Broca. A modulação septal é colinérgica; experimentos sugerem que agonistas muscarínicos ativam neurônios GABAérgicos septo-hipocampais que inibem interneurônios hipocampais, desinibindo os neurônios piramidais (Wu *et al.*, 2000).

## **1.2. Neurogênese**

A geração de novos neurônios no cérebro adulto de mamíferos foi demonstrada por Altman e Das em 1965. Utilizando marcação auto-radiográfica pela incorporação de timidina triciada no DNA dos novos neurônios foi possível registrar a ocorrência de neurogênese na zona subgranular (SGZ) do giro denteado do hipocampo de ratos (Fig. 4) três dias após o nascimento do animal. Utilizando a mesma técnica Altman observou neurogênese em outras regiões do sistema nervoso central (SNC) como o bulbo olfatório (Altman, 1969) e o neocortéx (Altman, 1966).



**Figura 4.** Neurogênese hipocampal. As células progenitoras (rosa) dos neurônios granulares estão localizadas na zona subgranular (SGZ) do giro denteado.

Características ultra-estruturais de neurônios maduros como dendritos e espinhas dendríticas foram observadas ao microscópio eletrônico por Kaplan e Hinds (1977). A neurogênese no hipocampo foi detectada em nossa espécie (Eriksson *et al.*, 1998) e quantificada em roedores (Kuhn *et al.*, 1996) e primatas (Gould *et al.*, 1998) utilizando-se marcação imunohistoquímica para bromodeoxiuridina (BrdU).

Um recente estudo eletrofisiológico dos novos neurônios granulares do hipocampo demonstrou que essas células diferenciam-se em neurônios granulares funcionais que se integram à rede neuronal do giro denteado (Van Praag *et al.*, 2002).

É interessante salientar que apesar da neurogênese introduzir milhares de novos neurônios por dia no giro denteado o número de neurônios granulares permanece constante (Rapp & Gallagher, 1996). Isso mostra uma permanente

renovação dos neurônios granulares do giro denteado que pode ter relevância para o aprendizado e a memória (Tashiro *et al.*, 2007).

A neurogênese hipocampal pode ser modulada por estímulos ambientais através de mudanças no número de células precursoras geradas em um determinado período. A neurogênese é diminuída numericamente pelo estresse crônico (Gould *et al.*, 1998) e pelo envelhecimento (Kuhn *et al.*, 1996) e é aumentada por exercício voluntário (Van Praag *et al.*, 1999) e crises epiléticas (Parent *et al.*, 1997; Bengzon *et al.*, 1997). Essa modulação da neurogênese é semelhante a muitas alterações plásticas observadas no hipocampo epilético como a extensão de dendritos basais pelos neurônios granulares (Spigelman *et al.*, 1998), o brotamento das fibras musgosas (Babb *et al.*, 1988) e a esclerose hipocampal (Mathern *et al.*, 1996).

A proteína *doublecortin* (DCX) tem sido utilizada recentemente como um marcador de neurônios novos no giro denteado adulto (Brown *et al.*, 2003; Rao & Shetty, 2004). Sua marcação citoplasmática coincide em neurônios com a marcação nuclear para BrdU, outro reconhecido marcador de neurogênese (Rao & Shetty, 2004). A *doublecortin* é uma proteína que está associada aos microtúbulos (Francis *et al.*, 1999) e é expressa em neurônios pós-mitóticos imaturos, que migram através do sistema nervoso central durante o desenvolvimento (Friocourt *et al.*, 2003). Dados sugerem que a DCX é requerida especificamente nos neuritos em crescimento, onde pode atuar junto à membrana onde regularia receptores ou moléculas de adesão implicadas na migração neuronal e diferenciação (Friocourt *et al.*, 2003).

A proteína *doublecortin* foi descoberta graças a mutações no gene que a codifica, localizado no cromossomo X (Des Portes *et al.*, 1998; Gleeson *et al.*,

1998). Pacientes portadores dessa mutação desenvolvem a síndrome X-SCLH/LIS. As mulheres afetadas desenvolvem uma lâmina subcortical heterotópica (SCLH) de neurônios, já os homens afetados desenvolvem lisencefalia (LIS), ou seja, ausência de sulcos e giros nos hemisférios cerebrais. A síndrome SCLH é também denominada síndrome do *duplo córtex* dando origem ao nome da proteína *doublecortin*. As patologias, como lisencefalia e duplo córtex, advindas da mutação do gene *dcx* demonstram claramente a importância da ação dessa proteína na migração dos neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

A marcação imunohistoquímica da proteína *doublecortin* permitiu a visualização e o estudo da arborização dendrítica dos novos neurônios granulares do giro denteado (Rao e Shetty, 2004). A comparação entre neurônios granulares *doublecortin*-positivos de animais jovens e senescentes demonstrou que a arborização dendrítica apical era menor e com menos ramificações nos últimos (Rao *et al.*, 2005). Também se observaram alterações na morfologia dendrítica dos novos neurônios granulares em animais que praticavam exercício físico espontaneamente. Utilizando a técnica de impregnação por prata de Golgi, foi observado que os neurônios granulares possuíam uma arborização dendrítica maior e com mais ramificações nos animais que praticavam exercício (Redila & Christie, 2006).

### **1.3. Epilepsia**

Epilepsia é a denominação de uma coleção de desordens cerebrais humanas caracterizadas por crises periódicas e espontâneas. Essas podem consistir de convulsões ou perdas de consciência causadas pelo disparo

intenso, sincronizado e rítmico de populações neuronais no sistema nervoso central (McNamara, 1994). Os neurônios principais no tecido epilético são usualmente hiperexcitáveis e os seguintes motivos patofisiológicos não excludentes entre si podem causar isto: aumento da excitação e diminuição da inibição, denominada hipótese química, ou modificações nas conexões de regiões do sistema nervoso, denominada hipótese de rede.

As crises epiléticas podem ser classificadas baseando-se em aspectos clínicos, em focais, onde a crise tem sua origem localizada em uma região cortical, ou generalizadas, com o envolvimento de várias áreas corticais de ambos os hemisférios (*Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy*, 1989). As crises focais são subdivididas em simples, quando há preservação da consciência, e complexas, quando há diminuição ou perda do estado de consciência.

A epilepsia é a doença neurológica paroxística mais comum no mundo, com uma prevalência de aproximadamente 0,8% na população, o que equivale a aproximadamente um milhão e meio de pessoas no Brasil (Organização Mundial da Saúde, 2001).

Comumente, pacientes com epilepsia possuem em sua história médica um episódio de *status epilepticus* (SE), trauma ou convulsão febril, sendo este evento denominado injúria precipitadora inicial (IPI). Este evento pode ser seguido de um período latente que antecede a eclosão de crises espontâneas recorrentes. Entre as diferentes formas de epilepsia a mais freqüente é a epilepsia focal complexa, com aproximadamente 40% dos casos (Gastaut *et al.*, 1975). A maior parte das crises focais complexas tem origem no lobo temporal medial e estão associadas à esclerose hipocampal (Engel, 1996).

Assim como outras doenças e síndromes neurológicas como isquemia global, esclerose lateral amiotrófica e Alzheimer, a esclerose hipocampal possui um padrão seletivo de morte neuronal acompanhada de gliose reativa. Essa esclerose foi descrita por Bratz em 1899 (Mathern *et al.*, 1996). Nas regiões do corno de Amon do hipocampo (Fig. 1) a distribuição da perda neuronal é irregular, com perda massiva de neurônios em CA1, razoável perda em CA3 e relativa preservação dos neurônios piramidais em CA2. Os neurônios granulares do giro denteado não têm redução expressiva em seu número, assim como os neurônios dos córtices subicular e entorrinal (Babb *et al.*, 1984).

Embora condições adversas à sobrevivência dos neurônios que afetam todo o cérebro, como a perda de fluxo sanguíneo na isquemia ou o disparo neuronal sincronizado no SE, são sem sombra de dúvida, causas importantes da perda neuronal, sua seletividade somente pode ser explicada por fatores adicionais que são particulares a cada neurônio e seu microambiente (Weiss & Sensi, 2000).

Em uma surpreendente descoberta em 1969, Olney demonstrou uma ação “excitotóxica” do neurotransmissor glutamato causando morte neuronal. Trabalhos posteriores realizados por Choi e colaboradores relacionaram a excitotoxicidade do glutamato com um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular através da membrana (Choi *et al.*, 1985). A via de entrada do cálcio através de receptores para glutamato sensíveis a  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropionato (AMPA) e ácido caínico foi determinada com o uso de antagonistas dos diferentes grupos de receptores ionotrópicos de glutamato (Gill & Lodge, 1997).

A morte neuronal é seletiva, assim apenas alguns receptores para glutamato dos tipos AMPA e cainato, que normalmente são permeáveis apenas a cátions monovalentes, tornam-se permeáveis também a cálcio, sendo denominados canais Ca-A/K (Weiss & Sensi, 2000). Os canais Ca-A/K são permeáveis também a zinco, e sob condições de grande liberação sináptica deste íon, como ocorre na epilepsia e em isquemias, o  $Zn^{2+}$  pode translocar através da sinapse acumulando-se no neurônio pós-sináptico (Frederickson *et al.*, 1989). O aumento da concentração citoplasmática de  $Zn^{2+}$  e também de  $Ca^{2+}$ , leva a uma despolarização mitocondrial e uma produção intensa de espécies reativas de oxigênio que causam a morte neuronal (Sensi *et al.*, 1999).

### **1.3.1. Modelos Experimentais de Epilepsia**

A epilepsia pode ser modelada através de diferentes estímulos que simulem uma IPI ou estabeleçam um estado de mal epiléptico em animais experimentais. Os estímulos podem ser acústicos, elétricos ou químicos. Os modelos audiogênicos em roedores são baseados em linhagens selecionadas, como *Wistar audiogenic rats* (WAR) e *genetically epilepsy-prone rats* (GEPR), por sua resposta convulsiva ao estímulo sonoro. A iniciação e propagação do estímulo convulsivo dependem da hiperexcitação do sistema auditivo, particularmente do colículo inferior. Sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos desempenham papel fundamental na resposta à estimulação acústica e participam nos sistemas modulatórios e eferentes, incluindo o colículo superior, substância negra, núcleos da base e estruturas da formação reticular.

Catecolaminas e indolamina também influenciam a gravidade das convulsões (Ross & Coleman, 2000; Moraes *et al.*, 2000; Garcia-Cairasco *et al.*, 2002).

O abrasamento (*kindling*) é um modelo de plasticidade sináptica onde repetidos estímulos causam um aumento na suscetibilidade a crises (Goddard, 1967). A estimulação é subliminar para a geração de crises, mas a repetição do mesmo estímulo causa crises motoras. As estruturas do sistema límbico como o hipocampo e a amígdala estão entre as mais suscetíveis ao abrasamento (Gilbert, 2001). Estímulos crônicos auditivos induzem o fenômeno de abrasamento audiogênico em animais sensíveis e induz recrutamento de áreas límbicas. Este protocolo também se constitui em modelo de ELT (Moraes *et al.*, 2000; Romcy-Pereira & Garcia-Cairasco, 2003).

Os modelos experimentais químicos que reproduzem as características patológicas da ELT humana em roedores foram desenvolvidos com a injeção intraperitoneal ou intracerebral de drogas como o ácido caínico e a pilocarpina, que são agonistas de receptores glutamatérgicos e colinérgicos, respectivamente (Ben-Ari, 1985; Turski *et al.*, 1989; Cavalheiro *et al.*, 1991; Leite *et al.*, 1996; Furtado *et al.*, 2002).

O ácido caínico é um análogo químico do glutamato e sua administração sistêmica provoca o SE através da excitação dos neurônios piramidais de CA3, reproduzindo muitas das características histopatológicas e comportamentais da epilepsia do lobo temporal humana (Ben-Ari, 1985). Junto com o modelo da pilocarpina, que foi utilizado nesse trabalho de pesquisa e será detalhado adiante, são os modelos químicos experimentais de epilepsia do lobo temporal mais comumente utilizados (Leite *et al.*, 2002).

### 1.3.1.1. Modelo experimental da pilocarpina

O hidrocloreto de pilocarpina é retirado de extratos de folhas das árvores sul-americanas *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*. A administração sistêmica de pilocarpina em ratos pode causar um estado comportamental crônico que é similar à epilepsia do lobo temporal humana. O modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina foi inicialmente descrito por Waldemar Turski, Éspér Cavalheiro e colaboradores (Turski *et al.*, 1983).

A injeção sistêmica de pilocarpina, um agonista colinérgico do subtipo muscarínico, induz o SE em ratos. Isto é causado, provavelmente, pela ativação dos receptores muscarínicos para acetilcolina do subtipo m1 nos neurônios da camada II do córtex entorrinal. A ativação dos receptores m1 é ampliada por influxo de íons de cálcio. Esta propriedade introduz um mecanismo Hebbiano, onde a ativação do receptor muscarínico causa uma despolarização robusta da membrana e disparo repetitivo dos neurônios somente se acompanhada de atividade da célula pós-sináptica (Klink & Alonso, 1997a; Klink & Alonso, 1997b). Como células de origem da via perforante, os neurônios da camada II do córtex entorrinal estão em uma posição crucial para causar a hiperexcitação dos neurônios da formação hipocampal.

O animal é acometido do SE em torno de trinta minutos após a administração da pilocarpina. Esta condição dita fase aguda, perdura em média doze horas até a regressão do quadro de prostração do animal. O *status epilepticus* pode ser interrompido com o uso de diazepínicos reduzindo sua duração e a mortalidade associada a esse. O uso de antagonistas muscarínicos como a atropina consegue impedir a progressão do SE apenas

se forem administradas menos de uma hora após o tratamento com pilocarpina, mostrando que o mecanismo colinérgico é apenas o iniciador do SE que depois é sustentado por mecanismos sinápticos glutamatérgicos (Morrisett *et al.*, 1987).

O *status epilepticus* mimetiza uma IPI, pois após um período latente que varia de sete a quinze dias o animal é acometido por crises motoras espontâneas com frequência de duas a cinco vezes por semana. Esta é dita fase crônica do modelo que perdura por vários meses, presumivelmente por toda a vida do animal (Cavalheiro *et al.*, 1991).

As crises motoras espontâneas que acometem os animais experimentais são muito semelhantes às crises focais complexas dos pacientes com epilepsia do lobo temporal. As crises possuem uma progressão em sua gravidade, descrita por Racine (1972), de automatismos faciais passando por clonias de cabeça e patas anteriores até crises tônico-clônicas que causam elevação do animal sobre as patas posteriores e quedas dessa posição.

Avaliações histológicas do hipocampo de animais experimentais nos modelos de *kindling* (Cavazos & Sutula, 1990), ácido caínico (Pollard *et al.*, 1994) e pilocarpina (Mello *et al.*, 1993) mostraram o mesmo padrão de morte de neurônios piramidais da esclerose hipocampal humana, com grande perda neuronal em CA1 e razoável perda em CA3 (Mathern *et al.*, 1996).

Hipóteses para as bases celulares e moleculares da epilepsia do lobo temporal proviram desses modelos experimentais. Um exemplo é a hipótese proposta por Sloviter (1991), onde a diminuição da inibição sobre os neurônios granulares ocorreria através da morte dos neurônios musgosos (*mossy cells*) que normalmente excitam interneurônios GABAérgicos em cesto (*basket cell*)

que por sua vez inibem os neurônios granulares. Esta hipótese, chamada *dormant basket cell*, foi suportada posteriormente por resultados de Bekenstein e Lothman (1993), porém registros eletrofisiológicos de interneurônios realizados por outros pesquisadores parecem contrariar a hipótese, defendendo a manutenção do circuito inibitório GABAérgico (Esclapez *et al.*, 1997; Bernard *et al.*, 1998). Recentemente, Sloviter realizou outro estudo (2003) apoiando seus resultados originais com a morte das *mossy cells* e o conseqüente “silenciamento” dos interneurônios em cesto. Porém ele afirma que a grande variabilidade de morte celular entre os animais experimentais impede uma generalização desse princípio (Sloviter *et al.*, 2003).

Outra característica patológica relacionada à esclerose hipocampal observada em humanos é o brotamento de terminais sinápticos aberrantes na camada molecular interna do giro denteado (Sutula *et al.*, 1989; Babb *et al.*, 1988). Estes terminais sinápticos aberrantes são ricos em zinco, revelado por autometalografia de Timm-Danscher, resultando do brotamento das colaterais das fibras musgosas normalmente lançadas na camada molecular interna pelos neurônios granulares do giro denteado. As fibras musgosas não são os únicos axônios que “brotam” no hipocampo epiléptico, terminais aberrantes contendo neuropeptídeo Y, somatostatina ou GABA também foram observados na camada molecular (Mathern *et al.*, 1996).

### **1.1.3. Brotamento das fibras musgosas**

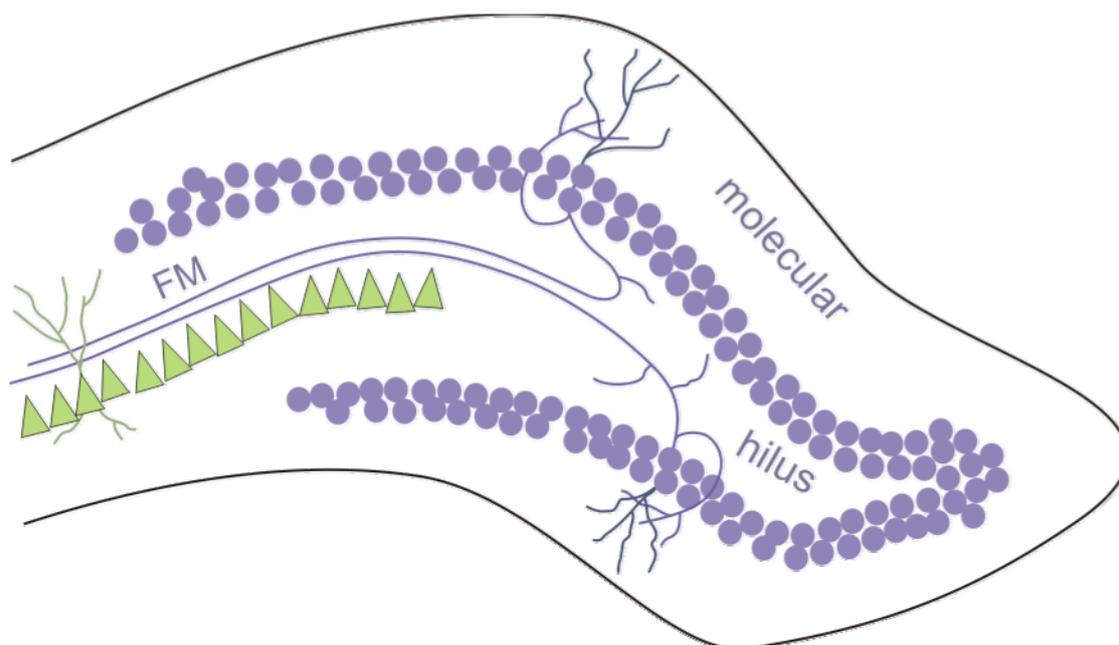
Os axônios dos neurônios granulares, denominados fibras musgosas, percorrem normalmente apenas o *hilus* do GD e o *stratum lucidum* de CA3 formando sinapses com os neurônios piramidais de CA3 e com interneurônios

do *hilus*. No hipocampo esclerótico, terminais das fibras musgosas são observados também sobre os dendritos apicais dos neurônios granulares, ou seja, na camada molecular interna do GD (Fig. 5).

O brotamento das fibras musgosas em hipocampos escleróticos foi identificado graças à coloração de Timm-Danscher (Babb *et al.*, 1988 e Sutula *et al.*, 1989). Essa coloração identifica a presença de íons de zinco acumulados no interior das vesículas sinápticas dos terminais das fibras musgosas pela atividade transportadora de zinco de uma proteína vesicular, denominada ZnT-3 (Palmiter *et al.*, 1996).

O brotamento das fibras musgosas dos neurônios granulares do GD observado em pacientes com epilepsia do lobo temporal, também foi observado na camada molecular interna do GD de roedores que foram tratados com pilocarpina ou ácido caínico e passaram a sofrer crises recorrentes espontâneas (Cavalheiro *et al.*, 1996; Buckmaster & Dudek, 1999).

A morte dos interneurônios musgosos e a perda de suas projeções na camada molecular interna deram base à hipótese de que a liberação de contatos sinápticos sobre os dendritos dos neurônios granulares seria responsável pelo brotamento aberrante das fibras musgosas (Cavazos & Sutula, 1990).



**Figura 5.** Brotamento das fibras musgosas (FM). No hipocampo epiléptico, os axônios dos neurônios granulares do giro denteado, denominados fibras musgosas (FM), brotam colaterais na camada molecular interna e no *hilus*.

O brotamento das fibras musgosas é observado também na camada molecular interna no eixo transversal e septotemporal (Buckmaster & Dudek, 1999) do giro denteado de roedores que sofreram ablação (Sutula *et al.*, 1988), após a injeção de ácido cálcico (Wenzel *et al.*, 2000) ou pilocarpina (Cavalheiro *et al.*, 1996). Isto levou à hipótese de que o brotamento axonal e a resultante reorganização sináptica em redes neuronais do sistema límbico podem contribuir para o desenvolvimento de crises. Se as alterações induzidas por uma IPI aumentam a excitabilidade, vias hipocâmpicas poderiam tornar-se suscetíveis a eventos epileptiformes.

O giro denteado normalmente atua como um filtro de baixa passagem, ou seja, apenas impulsos de baixa frequência da via perfurante são propagados para o corno de Amon através do disparo dos neurônios

granulares (Lothman *et al.*, 1992). Diversas propriedades dos neurônios granulares e de suas conexões parecem contribuir para esta filtragem, incluindo a falta de capacidade intrínseca para disparos de alta frequência, forte inibição por interneurônios GABAérgicos e ausência de um mecanismo sináptico para sincronização do disparo neuronal (Okazaki *et al.*, 1999). Porém, a ampliação da força do circuito recorrente causada pelo brotamento das fibras musgosas na camada molecular interna do GD torna-o intrinsecamente hiperexcitável.

Simulações em modelos computacionais mostram que nesta rede em equilíbrio, o número de neurônios disparando em sincronia é uma função da razão entre inibição e excitação, dependendo do balanço entre estas o sistema pode existir em estados não-oscilatórios estáveis e um estado oscilatório de dois ciclos. O aumento da inibição facilitou a sincronização neuronal se o sistema encontrava-se em um estado oscilatório de dois ciclos. Portanto não existe uma relação linear entre aumento da excitação e sincronização epileptogênica ou aumento da inibição e assincronia, mas sim uma dependência do estado inicial da rede (Manon-Espaillet & Eisen, 2001).

Um brotamento dendrítico também ocorre nos neurônios granulares na epilepsia. Dendritos basais ocorrem normalmente em aproximadamente dez por cento dos neurônios granulares de primatas, mas são muito raros em roedores (Seress & Frotscher, 1990). Em pacientes e animais experimentais epiléticos dendritos basais são mais comuns, sendo encontrados em 30 e 5%, respectivamente, dos neurônios granulares do GD (Ribak *et al.*, 2000).

As observações sobre o brotamento axonal e dendrítico levaram à formulação da hipótese de que a reorganização sináptica, resultante do

brotamento, em vias do GD pode ser determinante para o desenvolvimento de crises epilépticas. As projeções celulares na camada molecular interna e nos dendritos basais que se estendem no *hilus* criariam sinapses recorrentes no giro denteado que o tornariam epileptogênico (Buckmaster & Dudek, 1999; Sutula *et al.*, 1988).

No entanto, nenhum estudo conseguiu estabelecer uma correlação entre a intensidade do brotamento das fibras musgosas e a gravidade ou frequência de crises recorrentes espontâneas. O uso de ciclohexamida concomitante ao tratamento com pilocarpina ou ácido caínico evitou o brotamento das fibras musgosas, mas não as crises recorrentes espontâneas (Longo & Mello, 1997; Longo & Mello, 1998).

Em recente estudo, Longo e colaboradores (2003), propuseram que a ciclohexamida protege os interneurônios musgosos (*mossy cells*) da morte celular e mantém as sinapses desses neurônios na camada molecular interna evitando, dessa forma, o brotamento das fibras musgosas. Porém, a reavaliação dos efeitos da ciclohexamida, por outro grupo de pesquisadores, não encontrou interferência no brotamento das fibras musgosas medido por Timm-Danscher e também não observou nenhum efeito neuroprotetor da ciclohexamida (Williams *et al.*, 2002). A observação da ocorrência de crises recorrentes espontâneas antes do brotamento axonal sugere que este processo seja uma mudança adaptativa em reação ao insulto causado pelo SE e não uma causa da epileptogênese (Sloviter *et al.*, 1996).

O estudo de tecido de pacientes epilépticos por Franck e colaboradores (1995) registrou neurônios granulares que possuíam colaterais axonais na camada molecular interna em hipocampos normais. O mesmo foi observado

em hipocampos de macacos *Rhesus* (Seress, 1992) e o circuito recorrente foi também observado na região temporal do hipocampo de ratos normais (Cavazos *et al.*, 1992).

Estudos utilizando *kindling* elétrico (Elmer *et al.*, 1997) e audiogênico (Galvis-Alonso *et al.*, 2004) observaram ausência de brotamento mesmo com o desenvolvimento de crises límbicas. Portanto, o resultado funcional do brotamento das fibras musgosas ainda não é compreendido em detalhes, persistindo controvérsias sobre seu papel na síndrome da epilepsia do lobo temporal (Okazaki *et al.*, 1999).

#### **1.4. Morfologia de neurônios**

A complexa estrutura tridimensional dos neurônios tem sido objeto de estudos detalhados desde sua primeira descrição, no final do século XIX, com o desenvolvimento da técnica de impregnação por prata de Golgi. Há quase um século, Ramón y Cajal propôs que a grande variedade de morfologias dendríticas apresentada por diferentes famílias de neurônios era causa e consequência de eventos fisiológicos distintos.

Contemporaneamente, o estudo morfológico dos neurônios é realizado com o emprego de corantes celulares fluorescentes como o *lucifer-yellow* ou através de marcações com o emprego de anticorpos específicos corados posteriormente por reação enzimática. Os neurônios corados podem então ser delineados ao microscópio com o auxílio de sistemas computadorizados executando programas desenvolvidos para essa função, como o *NeuroLucida* (MBF Bioscience, EUA).

O programa *NeuroLucida* é baseado no princípio da câmera lúcida, ou seja, a imagem do neurônio ou região do SNC é projetada em uma superfície e assim seus contornos podem ser delineados (Glaser & Glaser, 2000). No programa *NeuroLucida*, a imagem do neurônio é projetada na tela do computador e com a utilização do *mouse* delinea-se a célula identificando o corpo celular e seus prolongamentos com pontos. O programa *NeuroLucida* também possui um módulo de delineamento de regiões que pode ser utilizado para delinear áreas do sistema nervoso representadas em cortes seriados.

A forma tridimensional dos neurônios delineados é mantida em arquivos digitais. A estrutura tridimensional de um neurônio pode ser descrita matematicamente por 10 a 20 mil pontos com coordenadas espaciais X, Y e Z indicando a distância em micrômetros em relação ao ponto de referência central que equivale ao soma do neurônio. Informações adicionais sobre diâmetro dendrítico e axonal em cada ponto e a presença de botões sinápticos permitem a visualização da estrutura tridimensional do neurônio no computador.

A forma e a função neuronal são intimamente relacionadas. O papel da geometria dendrítica é a transformação do padrão espaço-temporal de potenciais excitatórios pós-sinápticos em uma série, estruturada temporalmente, de potenciais de ação. Essa transformação é a base do processamento de informação realizado pelo sistema nervoso (Kaspiřzhny *et al.*, 2002).

Várias das alterações observadas no hipocampo epiléptico, aqui descritas como morte celular, brotamento das fibras musgosas e aumento da neurogênese implicam em mudanças na rede neuronal do hipocampo. A

clássica visão de um desbalanço químico entre excitação e inibição como a causa das crises epilépticas (Moshe, 2000; Colmers & El, 2003) não se sustenta devido à ineficácia do tratamento da epilepsia do lobo temporal com drogas que equilibrem esse desbalanço.

A hipótese de que mudanças na rede neuronal do hipocampo e não um desbalanço químico extracelular seja a principal causa da epilepsia do lobo temporal encontra eco na hipótese de rede para a depressão. Realizando uma ampla revisão de resultados recentes de pesquisas sobre depressão, Castrén propõe que a depressão é causada por falhas no processamento da informação em redes neuronais específicas e também propõe que as drogas antidepressivas agem através de lentas mudanças plásticas nessas redes neuronais (Castrén, 2005).

O mesmo poderia ocorrer na epilepsia onde mudanças plásticas em redes neuronais, especialmente nas regiões límbicas, seriam responsáveis pelo estabelecimento de focos epilépticos. A busca por técnicas ou drogas que inibam essa reorganização após a injúria precipitadora inicial é de grande valia para o tratamento de pacientes. Pesquisas recentes foram realizadas com a aplicação de *grafts* com resultados promissores para a redução da frequência e intensidade de crises epilépticas em animais experimentais (Rao et al., 2007).

O presente trabalho se limitou ao estudo das alterações plásticas na morfologia dos novos neurônios granulares do giro denteado da formação hipocampal de ratos com epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina.

## **2. MATERIAIS & MÉTODOS**

### **2.1. Animais Experimentais**

Ratos Wistar machos adultos (~4-6 semanas, 250-300 g) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, tratados e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia da mesma faculdade foram utilizados nos estudos aqui descritos.

O tratamento dispensado aos animais está de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP (protocolo n° 243/2005, vide Anexo A).

Os animais foram mantidos em grupos de cinco indivíduos em caixas plásticas (33x37x17 cm) forradas com maravalha trocada a cada três dias. Os animais possuíam ração e água *ad libitum*, e foram mantidos em um ciclo claro-escuros de 12 horas (06:00-18:00) e a uma temperatura de 20-24 °C.

### **2.2. Modelo da Pilocarpina**

Para a indução do SE foi utilizada uma dose única de 320 mg/kg de pilocarpina injetada intraperitonealmente (i.p.). *N*-metil-escopolamina i.p. (2 mg/kg) foi administrada trinta minutos antes da pilocarpina para reduzir seus efeitos periféricos. Convulsões tônico-clônicas sustentadas por mais de cinco minutos foram consideradas como o início do SE. Para debelar o SE, os animais foram tratados com diazepam (10 mg/kg i.p.) noventa minutos após o início do mesmo. Os animais receberam injeção subcutânea de solução

fisiológica glicosada para hidratação e receberam suplemento alimentar (Sustagem) por via oral nos dias subseqüentes ao tratamento até retomarem o ganho de peso normal.

Os animais controles sofreram a mesma manipulação que o grupo anterior, porém com injeção intraperitoneal de solução de cloreto de sódio a 0,9% substituindo a pilocarpina.

### **2.3. Monitoramento do comportamento**

Imediatamente após o tratamento os animais foram posicionados em caixas de observação individuais feitas de acrílico transparente (30x30x30 cm). O número de *wet dog shakes* (WDS) e *head shakes* (HS) dos animais controles e tratados com pilocarpina foi contado em janelas de 5 minutos ao longo de 40 minutos.

A partir do segundo dia após o tratamento, os animais foram mantidos por períodos de 8 horas (09:00-17:00) por dia em caixas de acrílico para monitoramento de crises recorrentes espontâneas. As caixas possuíam orifícios de ventilação, ração e água. As crises espontâneas foram classificadas de acordo com a escala de Racine (1972): 1, automatismos faciais; 2, clonias de cabeça; 3, clonias de membros anteriores; 4, elevação do corpo; 5, elevação e queda.

### **2.4. Perfusão**

Um mês após o tratamento os animais dos grupos pilocarpina e controle foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg i.p.) e

mortos por perfusão de solução salina de NaCl 150 mM por 3 min seguido por solução fixadora de formaldeído 4% e glutaraldeído 0,1% diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Todas as soluções foram bombeadas com uma bomba rotatória (*Masterflex 7518-10*, EUA) com uma taxa de vazão de 12,5 ml/min. Os encéfalos foram imediatamente retirados e mergulhados em solução crioprotetora de sacarose a 30% e mantidos em agitação até afundarem na solução de sacarose indicando a saturação do tecido nervoso com o açúcar.

Os encéfalos foram então congelados em álcool isopentano refrigerado com gelo seco e séries de cortes coronais de 60  $\mu$ m de espessura foram realizadas em criostato. Essas séries de cortes foram realizadas entre as coordenadas -1,7 mm e -6 mm a partir do bregma (Paxinos & Watson, 1998) e continham todo o hipocampo ao longo de seu eixo ântero-posterior.

## **2.5. Imunohistoquímica para *doublecortin***

A imunohistoquímica para *doublecortin* identifica neurônios novos. O procedimento imunohistoquímico foi o seguinte: lavagem dos cortes de tecido nervoso em PBS (PB 0,1 M, NaCl 0,15 M; pH 7,4), seguido de banho em metanol com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Nova lavagem em PBS e incubação por 48 horas com o anticorpo primário  $\alpha$ -DCX (1:200, Santa Cruz Labs, EUA) em 3% NDS (*normal donkey serum*) em PBS mantido a temperatura de 5 °C. Foram novamente lavados em PBS e depois mergulhados em 0,05% *Tween* em PBS por 15 minutos. Incubados então com o anticorpo secundário *donkey*  $\alpha$ -goat biotilado (1:500) em 3% NDS em PBS durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a

incubação o tecido foi lavado em PBS e imerso por 1 hora em solução de avidina-peroxidase preparada com meia hora de antecedência (1:50; Elite ABC kit, Vector, EUA). Os cortes foram lavados novamente em PBS e então incubados em DAB (1 mg/ml) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% por 2 minutos. Após última lavagem em PBS os tecidos foram montados em lâminas de vidro, desidratados em série de álcoois e xilol, embebidos em *Entellan* (Merck, Alemanha) e cobertos com lamínulas.

## 2.6. Microscopia e Estereologia

As lâminas contendo os cortes histológicos de hipocampo foram observadas em um microscópio *Olympus BX60*, equipado com platina motorizada (*Ludl Instruments*, EUA) e câmera CCD (3-CCD *Optronics*, EUA), acoplado a um computador. Foram utilizadas objetivas U-Planapo de pequeno aumento (AN 0,16; 10 X) para o delineamento do GD e de grande aumento e imersão em óleo (AN 1,25; 100 X) para a reconstrução do soma e dendritos dos neurônios *doublecortin*-positivos (DCX+).

A contagem do número de células marcadas pela imunohistoquímica foi realizada através de estereologia tridimensional com o método do fracionador óptico (West *et al.*, 1991; Schmitz & Hof, 2005), utilizando o programa *Stereo Investigator* (*MBF Bioscience*, EUA). Os parâmetros para contagem definidos *a priori* foram: análise de conjunto de quatro cortes do hipocampo de cada animal, em intervalos de dezesseis cortes e o tamanho da área de amostra de 40 x 40 μm.

A posição do primeiro corte do conjunto, na seqüência total de cortes hipocampais, era sorteado e os demais três cortes selecionados com o parâmetro definido *a priori*, ou seja, a cada dezesseis cortes. A camada granular (GCL) e a zona subgranular (SGZ) foram delimitadas no computador sobre a imagem proveniente do microscópio, com o uso de uma objetiva de pequeno aumento (10 X).

Uma estimativa populacional preliminar do número de células foi realizada contando todas as células marcadas em um corte de hipocampo. Um retículo foi posicionado aleatoriamente pelo programa sobre o contorno dos limites do giro denteado e suas dimensões definidas pela estimativa populacional preliminar. Os quadros de amostragem foram posicionados nas intersecções desse retículo com a área delimitada do giro denteado. Os neurônios DCX+ presentes dentro dos quadros amostrais de 40 x 40  $\mu\text{m}$  e de profundidades z (foco) de 10  $\mu\text{m}$  foram contados com uma objetiva de grande aumento (100X) com imersão em óleo. Zonas de resguardo de 5  $\mu\text{m}$  foram observadas a partir do topo do corte, para evitar a contagem de células destruídas no processo de corte.

## **2.7. Reconstrução tridimensional**

Vinte neurônios de cada um dos grupos tiveram sua morfologia reconstruída digitalmente utilizando o mesmo sistema de microscopia descrito acima. As células foram escolhidas baseadas nos seguintes critérios: delimitação clara do soma, presença de uma árvore dendrítica desenvolvida e ausência de dendritos seccionados cerca do soma.

```
V3 text file written for MicroBrightField products.  
(Sections)
```

```
("CellBody"  
(Color Blue)  
(CellBody)  
( 0.08 -0.02 -0.08 0.22) ; 1, 1  
( 0.52 0.42 -0.08 0.22) ; 1, 2  
( 0.08 -0.02 -0.98 0.22) ; 1, 79  
) ; End of contour  
  
((Color RGB (255, 1, 255)) ; [10,1]  
(Dendrite)  
( 0.96 -2.25 0.00 3.56) ; Root  
( -0.59 -3.15 0.45 3.56) ; R, 1  
( -2.15 -3.82 1.67 3.56) ; R, 2  
(  
( -10.37 -3.82 1.44 2.89) ; R-1, 1  
( -12.37 -3.37 2.20 2.89) ; R-1, 2  
X Y Z Diâmetro Ramo
```

**Figura 6.** Exemplo de arquivo de coordenadas gerado pelo programa *NeuroLucida*. Cada linha contém as coordenadas X, Y e Z de pontos do soma (*Cell Body*) e de um dendrito (*Dendrite*).

O delineamento é realizado através de cliques com o cursor do *mouse* do computador no programa de reconstrução tridimensional *NeuroLucida* (*MBF Bioscience*, EUA). O soma do neurônio é delimitado primeiro e então os dendritos são delimitados a partir desse. Cada clique do *mouse* gera um ponto com coordenadas X, Y e Z de distância em relação ao ponto de referência (Fig. 6). Além das coordenadas, cada ponto de coordenada dos dendritos possui um diâmetro associado (Fig. 6).

Os arquivos de coordenadas permitiram medir o perímetro e área somática e as ramificações e comprimento dos dendritos. A distância entre o soma do neurônio DCX+ e a transição da GCL para a camada molecular foi medida em cada neurônio reconstruído.

### **2.7.1. Análise de Sholl**

A análise de esferas concêntricas de Sholl (1953) foi utilizada para medir a distribuição da árvore dendrítica a partir do soma. Esferas virtuais são posicionadas pelo programa de análise neuroanatômica *Neuroexplorer* (MBF Bioscience, EUA) tendo como seu centro o soma do neurônio reconstruído.

A primeira esfera tinha o raio igual à espessura da GCL medida para cada célula, as esferas seguintes possuíam raios com incrementos de 50  $\mu\text{m}$  a partir da primeira. Foram contados, o número de bifurcações, intersecções, terminações dendríticas e também o comprimento dendrítico acumulado em cada esfera de análise.

### **2.7.2. Análise de segmentos dendríticos (*branch order analyses*)**

A análise de segmentos dendríticos mede o comprimento de cada segmento entre as bifurcações dendríticas (*dendritic nodes*). Cada segmento é classificado conforme sua posição em relação às bifurcações: o segmento presente entre o soma e a primeira bifurcação é dito de primeira ordem, o segmento presente entre a primeira e a segunda bifurcação é dito de segunda ordem, o segmento presente entre a segunda e a terceira bifurcação é dito de terceira ordem, e assim subseqüentemente. A classificação e medição dos segmentos dendríticos foram realizadas com o programa de análise neuroanatômica *Neuroexplorer*.

Foi realizada então a comparação do comprimento dos segmentos dendríticos de cada ordem entre o grupo de animais controles e o grupo de animais tratados com pilocarpina.

### **2.7.3. Histograma polar**

Para a análise do crescimento vetorial dos neurônios positivos para *doublecortin*, os dendritos foram subdivididos em uma série de segmentos retilíneos de ~10 µm. Esses segmentos foram agrupados em intervalos de 10 ° de acordo com sua orientação espacial e dispostos em um histograma polar.

O comprimento total dendrítico em cada janela de 10° foi dividido pelo número de neurônios reconstruídos ( $n=20$  por grupo) fornecendo o valor médio de dendritos com essa orientação espacial. Os histogramas polares dos grupos controle e pilocarpina foram então comparados.

### **2.8. Autometalografia de Timm-Danscher**

A AMG de Timm-Danscher foi realizada de acordo com Danscher e colaboradores (2004). Essa técnica deposita grânulos de prata que permitem visualizar a distribuição do íon zinco presente nos terminais sinápticos, ou seja, fibras musgosas, dos neurônios granulares do GD. As secções foram imersas em sulfeto de sódio 0,1% em PBS 50 mM por 48 h a 4 °C antes de serem mergulhadas na solução de revelação por 1,5 h. A solução de revelação consistia de 80 ml de goma arábica 50%, 15 ml de tampão citrato de sódio 2 M (pH 3,5), 20 ml de hidroquinona 0,38 M e 0,5 ml de nitrato de prata 1 M.

Após a revelação as secções foram lavadas em água de torneira seguida por água destilada. Após a lavagem as secções foram desidratadas em álcool com concentração crescente, imersas em xileno e montadas em lâminas seladas com bálsamo do Canadá. A escala de Cavazos e colaboradores (1991) foi utilizada para medir o brotamento das fibras musgosas na camada molecular interna do giro denteado. A escala varia de 0:

ausência de grânulos de prata entre as extremidades e a crista do GD, à 5: densa banda de grânulos na região supragranular que se estende até a camada molecular interna . Dois observadores independentes avaliaram o brotamento das fibras musgosas em duas secções de cada animal nas posições -2,5 e -5 mm em relação ao bregma.

## 2.9. Imunohistoquímica para BDNF

A imunohistoquímica para a neurotrofina BDNF foi realizada no tecido dos animais experimentais em nosso laboratório pelo mestrando Artur Fernandes da seguinte forma: lavagem dos cortes de tecido nervoso em PBS (PB 0,1 M, NaCl 0,15 M; pH 7,4) seguido por banho em metanol com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por meia hora. Os cortes foram novamente lavados em PBS e depois mergulhados em 0,05% *Tween* em PBS por 10 minutos e incubados por 48 horas com o anticorpo primário  $\alpha$ -BDNF (1:500, Santa Cruz Labs, EUA) diluído em PBS com 5% NGS (*normal goat serum*) mantido a temperatura de 5 °C. Após banhos em PBS os cortes foram Incubados então com o anticorpo secundário *goat  $\alpha$ -rabbitt* biotilado (1:500) diluido em PBS com 5% NGS durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação o tecido foi lavado em PBS e imerso por 1 hora em solução de avidina-peroxidase preparada com meia hora de antecedência (1:50; Elite ABC kit, Vector, EUA). Os cortes foram lavados novamente em PBS e então incubados em DAB (1 mg/ml) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% por 2 minutos. Após última lavagem em PBS os tecidos foram montados em lâminas de vidro, desidratados em série de álcoois e xilol, embebidos em *Entellan* (Merck, Alemanha) e cobertos com lamínulas.

## 2.10. Imunohistoquímica para *doublecortin* em tecido humano

A imunohistoquímica para *doublecortin* foi realizada em tecido de hipocampo de humanos. Esse tecido foi gentilmente fornecido pelo Prof Dr João Pereira Leite e a imunohistoquímica foi realizada em seu laboratório em conjunto com Renata C. Scandiuzzi.

A reação imunohistoquímica foi realizada em cortes histológicos de hipocampo humano proveniente de necropsia realizada no Hospital das Clínicas da FMRP. O protocolo utilizado foi o seguinte: os cortes foram mantidos em estufa a 58 °C por 10 min, foram então mergulhados em xilol por 5 min duas vezes e em uma solução de álcool/xilol 1:1 por 3 min e hidratados em seqüência decrescente de concentração de álcool em água. Após vários banhos com água microfiltrada os cortes foram mergulhados em uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em PBS por 10 min.

Para recuperação antigênica dos epitopos os cortes foram mergulhados em tampão Tris-HCl 50mM, pH 9,5, e aquecidos em microondas por 8 min, seguidos de 1 min de intervalo e mais 4 min de aquecimento. Os cortes foram resfriados em banho-maria e mergulhados em solução de glicina 100 mM em tampão Tris.

Os cortes foram então mergulhados em tampão PBS-T (fosfato anidro 20 mM, NaCl 450 mM e 0,3% Triton-X, pH 7,4) com leite em pó diluído a 5% por 4 horas e incubados com o anticorpo primário  $\alpha$ -DCX (nas diluições de 1:200 e 1:400, Santa Cruz Labs) diluído em PBS-T com 3% *normal donkey serum* (NDS) por 48 horas a 5 °C.

Após a incubação com o anticorpo primário os cortes foram lavados em quatro banhos de 5 min PBS-T e incubados com o anticorpo secundário

*donkey α-goat* biotilado (1:500) com 3% NDS em PBS-T por 2 horas em temperatura ambiente. Os cortes foram então lavados em quatro banhos de 5 min de PBS-T e dois banhos de 5 min de PBS e imersos por 1 hora em solução de avidina-peroxidase preparada com meia hora de antecedência (1:50; Elite ABC kit, Vector Laboratories). Os cortes foram lavados novamente em quatro banhos de 5 min em PBS e incubados com o *kit* de coloração VIP *vectastain* (Vector Laboratories).

### **2.11. Estatística**

Os resultados numéricos dos diferentes grupos experimentais foram comparados utilizando-se o teste t de *Student* ou o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, com os valores expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Tratamento com Pilocarpina**

Trinta e quatro animais foram utilizados nesse experimento. Sete animais foram tratados com solução de NaCl a 0,9%. Dos vinte e sete animais tratados com pilocarpina dezessete animais (63%) desenvolveram SE. Dez desses animais morreram na fase aguda do tratamento.

### **3.2. Monitoramento do comportamento**

#### **3.2.1. Comportamentos de sacudir o corpo e a cabeça**

A observação e quantificação dos comportamentos de sacudir o corpo (*wet dog shake*) e a cabeça (*head shake*) demonstraram que esses comportamentos são muito raros imediatamente após o tratamento com pilocarpina intraperitoneal. A comparação com os modelos experimentais de crises com injeção intracerebral de pilocarpina, extrato de carambola ou bicuculina e o *kindling* elétrico da amígdala utilizados em nosso laboratório resultou em uma publicação no periódico *Epilepsy & Behavior* volume 6 páginas 328-336 (Rodrigues *et al.*, 2005, Anexo B).

#### **3.2.2. Crises espontâneas**

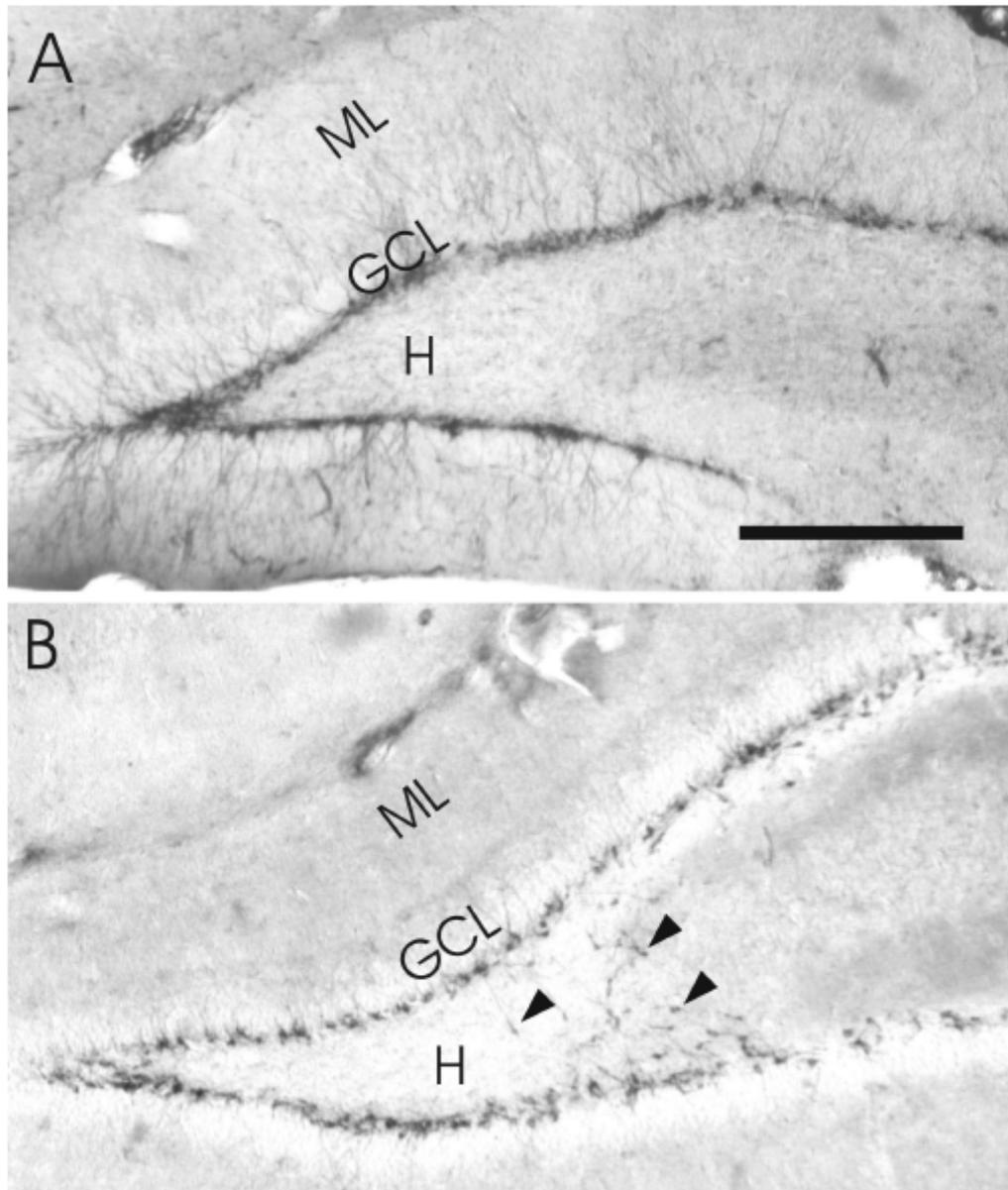
Foram observadas cinquenta e nove crises recorrentes espontâneas nos sete animais tratados com pilocarpina que sobreviveram, ou seja, uma média de 8,4 crises por animal, com no mínimo 2 e no máximo 15 crises observadas por animal. A latência para a primeira crise espontânea foi de 14 a 20 dias após o tratamento.

Os animais controles não sofreram nenhuma crise. A crise de classe 5 na escala de Racine, com queda e elevação do animal, foi a de maior frequência, com um valor médio na escala de Racine de 3,4 no total de crises observadas. Um animal sofria normalmente uma ou duas crises em um dia, porém uma seqüência de onze crises em um dia foi observada em um animal.

### **3.3. Imunohistoquímica para *doublecortin***

A imunohistoquímica para a proteína *doublecortin* revelou a presença dos neurônios granulares novos presentes na camada granular (GCL) e na zona subgranular (SGZ) do giro denteado do hipocampo nos animais controles (Figs. 7A e 8A; n=7 ratos) e nos animais epiléticos (Fig. 7B; n=7 ratos).

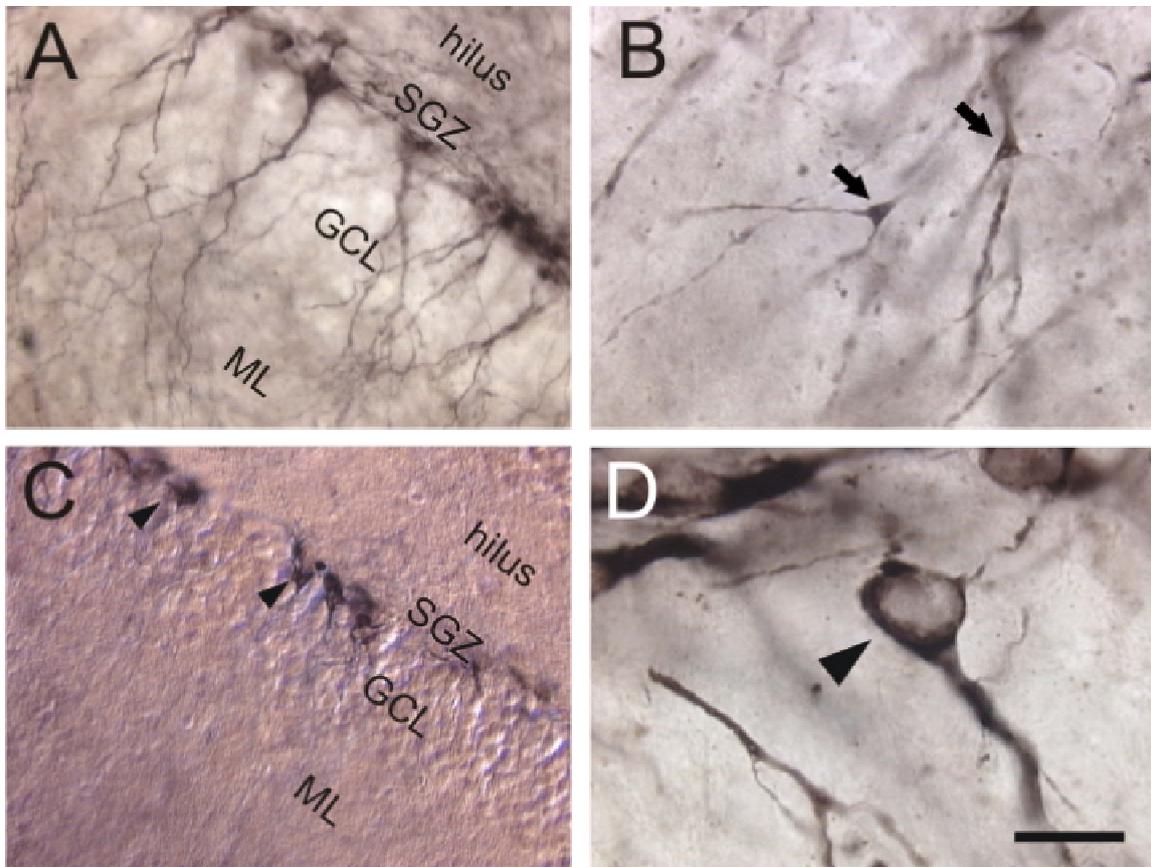
Os neurônios *doublecortin*-positivos (DCX+) não estavam presentes na camada granular suprapiramidal do GD por 600 µm da porção septal do hipocampo. Nas outras áreas do hipocampo os neurônios DCX+ tinham distribuição homogênea com pequenos aglomerados de células ocorrendo nas cristas do GD em fatias caudais.



**Figura 7.** A imunohistoquímica para DCX revelou a presença de novos neurônios granulares no GD de animais controles (A) e epiléticos (B). Alguns neurônios ectópicos (setas) podem ser observados no *hilus* próximos à extremidade de CA3 nos animais epiléticos. H, *hilus*; GCL, camada granular; ML, camada molecular. Barra = 400  $\mu$ m.

Alguns neurônios DCX+ ectópicos podiam ser observados próximos da região CA3 do hipocampo nos animais epiléticos (Fig. 7B, setas). A marcação da proteína DCX permitiu a visualização da árvore dendrítica (Figs. 8A e B) e

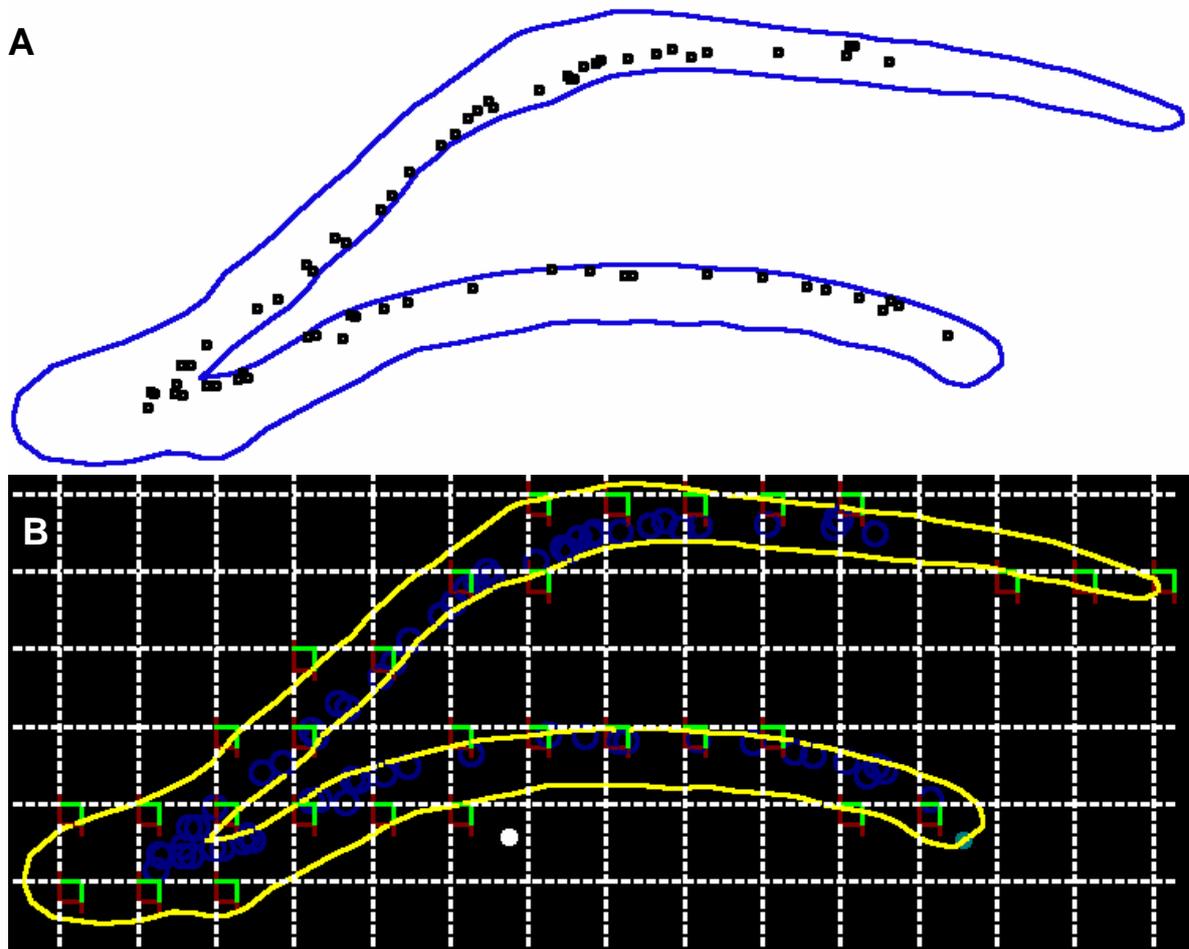
do soma (Figs. 8C e D) dos novos neurônios granulares em diferenciação e migração.



**Figura 8.** Soma e dendritos de neurônios DCX+. Em A, os neurônios DCX+ espriam suas árvores dendríticas nas camadas granular (GCL) e molecular (ML) do GD em um animal controle. Em B, bifurcações dendríticas (flechas) em grande aumento. Em C, contraste por interferência de fase mostrando a localização dos somas (setas) dos neurônios DCX+ na zona subgranular (SGZ) próximos aos neurônios granulares maduros do GD que não expressam DCX. Em D, neurônio DCX+ mostrando a distribuição citoplasmática da proteína e sua ausência no núcleo celular. Barra=25  $\mu\text{m}$  em A, 10  $\mu\text{m}$  em B e D, 40  $\mu\text{m}$  em C.

### 3.4. Contagem Estereológica

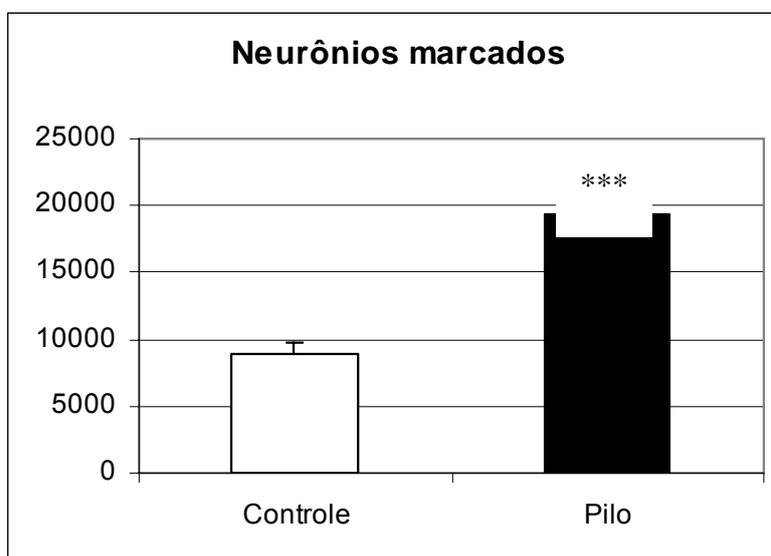
A contagem dos neurônios positivos para a imunohistoquímica da proteína DCX foi realizada com o método do fracionador óptico. O giro denteado do hipocampo foi delimitado com uma objetiva de baixo aumento, 10 X (Fig. 9A). Uma estimativa preliminar da população foi realizada, com a contagem de todos os neurônios marcados em um corte, ilustrados pelos pontos na Figura 9A.



**Figura 9.** Contagem estereológica. Em A, contorno do giro denteado (azul) e contagem do número total de neurônios marcados (pontos). Em B, posicionamento dos campos amostrais (quadrados verde e vermelho) do fracionador óptico.

Os parâmetros para a estereologia foram então ajustados para uma região amostral de 40 x 40  $\mu\text{m}$ , distribuídos em um retículo de 150 x 150  $\mu\text{m}$ , posicionado aleatoriamente pelo programa em cada um dos quatro cortes amostrados em cada animal (Fig. 9B).

A contagem estereológica indicou a presença de  $8.987 \pm 751$  (média  $\pm$  EPM) neurônios novos no giro denteado dos animais controles ( $n=7$ ) e  $19.337 \pm 1.782$  (média  $\pm$  EPM) neurônios novos no giro denteado dos animais tratados com pilocarpina ( $n=7$ ; Fig. 10).



**Figura 10.** Número de neurônios DCX+ em cada hipocampo dos animais controles (branco) e animais tratados com pilocarpina (preto). Pode-se observar que os animais tratados com pilocarpina possuíam o dobro de neurônios DCX positivos que os animais controles. Teste *t* de Student (\*\**p* < 0,001).

Os valores apresentam distribuição normal e o teste-t de *Student* indicou diferença significativa entre os grupos com  $p < 0,001$ . Portanto, os animais epiléticos apresentavam aproximadamente o dobro de neurônios DCX+ do que os animais controles. O coeficiente de erro de Gundersen (Schmitz & Hof,

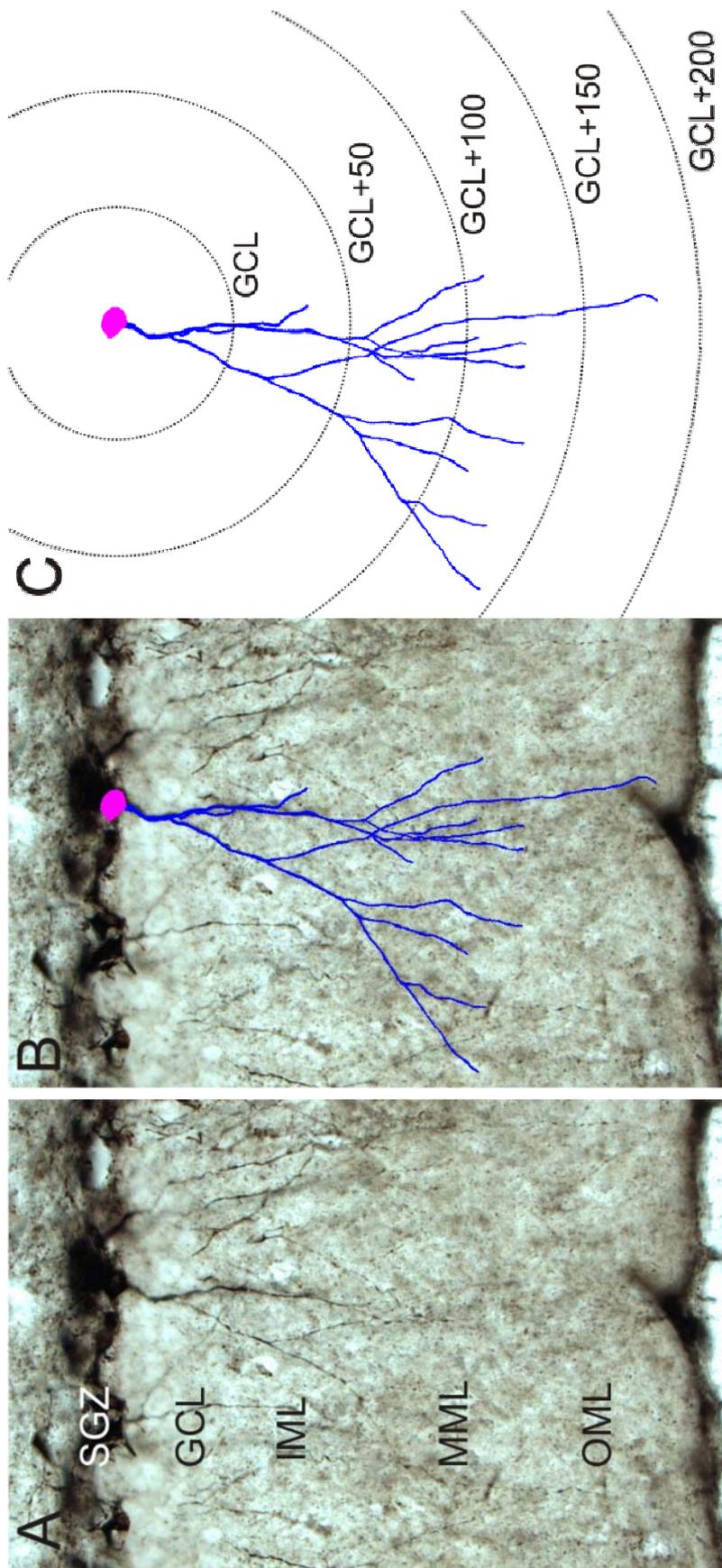
2005) para esse estudo foi de 0,19, uma média de 99 campos de contagem foram utilizados em cada animal.

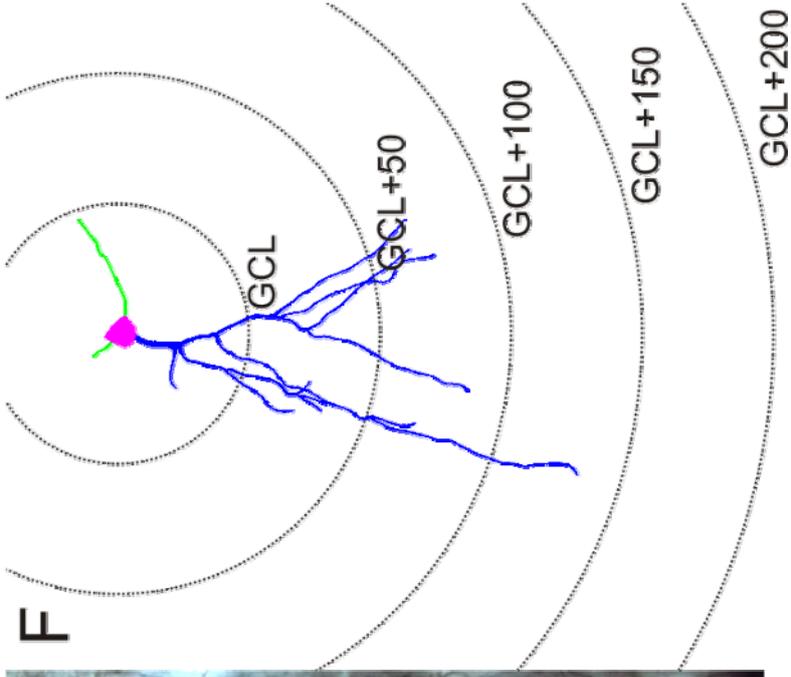
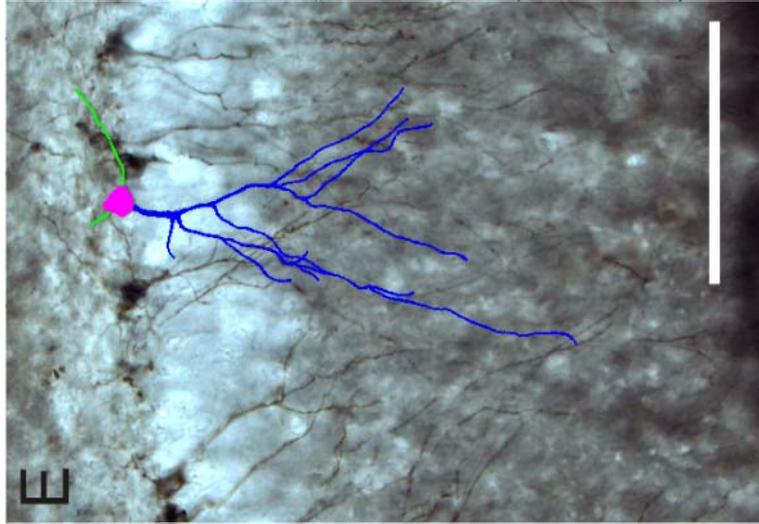
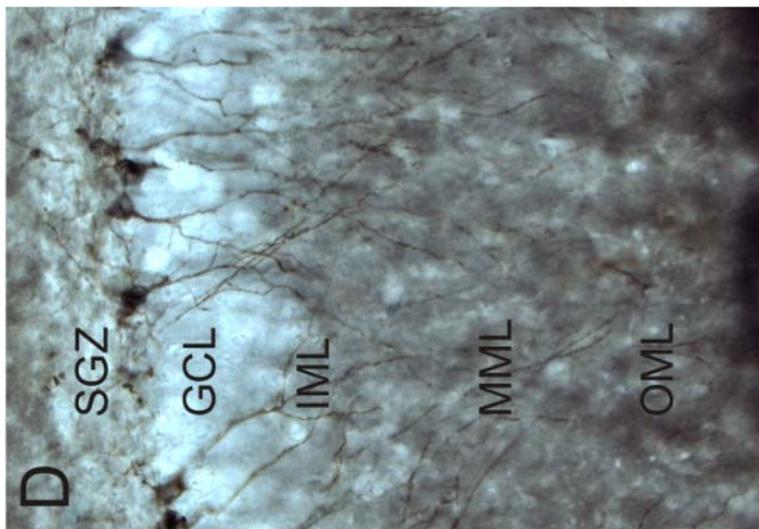
### 3.5. Reconstrução tridimensional

Os neurônios granulares marcados com a imunohistoquímica para DCX tiveram seus corpos celulares e suas árvores dendríticas digitalizados (Fig. 11) com o programa *Neurolucida*. A comparação entre as características morfológicas dos neurônios DCX+ dos animais controles (Fig. 11B) e epiléticos (Fig. 11E) ilustradas na Tabela 1 revelou similaridades de perímetro e área somática, número de bifurcações dendríticas e também o comprimento total da árvore dendrítica apical. Mesmo com essas similaridades, os dendritos basais estavam presentes em 30% (6 de 20) dos neurônios DCX+ em animais controles e em 85% (17 de 20) dos neurônios DCX+ em animais epiléticos (Fig. 11E). Além de sua maior frequência, o comprimento dos dendritos basais era bastante diferente nos dois grupos, com apenas  $19,8 \pm 5,3 \mu\text{m}$  nos controles e  $63,9 \pm 9,7 \mu\text{m}$  nos animais epiléticos ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 1. Medidas morfológicas dos neurônios DCX+ (n=20 em cada grupo)**

<b>Grupo de animais</b>	Perímetro do soma ( $\mu\text{m}$ )	Área do soma ( $\mu\text{m}^2$ )	Bifurcações dendríticas (n)	Dendritos apicais ( $\mu\text{m}$ )
<b>Controle</b>	$32.9 \pm 1.1$	$73.8 \pm 4.8$	$6.1 \pm 0.6$	$542.1 \pm 54.0$
<b>Pilocarpina</b>	$32.0 \pm 0.8$	$68.8 \pm 2.7$	$7.6 \pm 0.6$	$515.3 \pm 39.2$





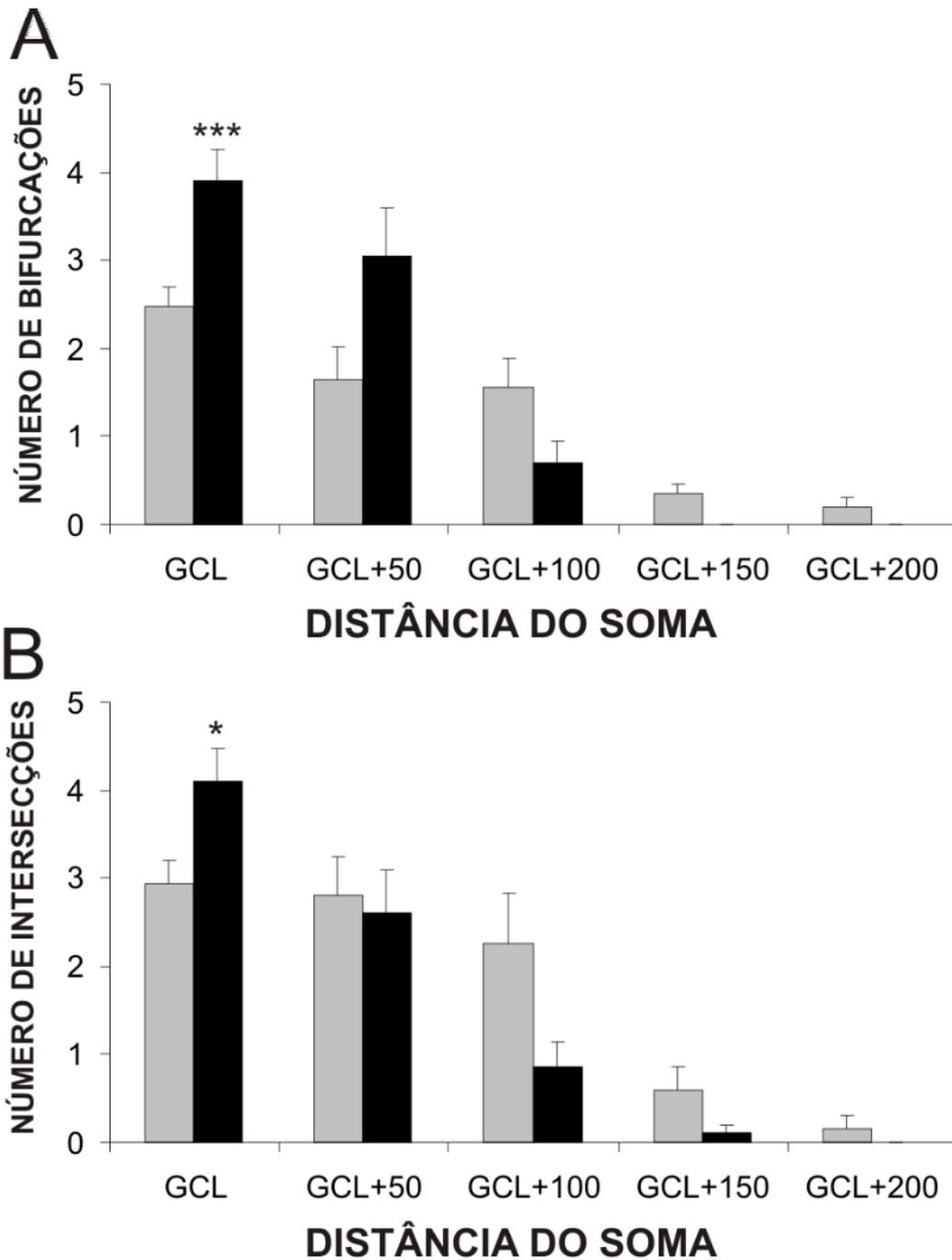
**Figura 11. (págs anteriores)** Neurônios DCX+ de animais controles (A, B e C) e epiléptico (D, E e F). Sobreposição das microfotografias com as reconstruções digitais dos neurônios, em B e E, ilustrando o soma (rosa), dendritos apicais (azul) e dendritos basais (verde). Esquema da análise de Sholl em C e F. GCL, camada granular; IML, camada molecular interna; MML, camada molecular média; OML, camada molecular externa; SGZ, zona subgranular. Barra= 100  $\mu$ m.

### 3.5.1. Análise de Sholl

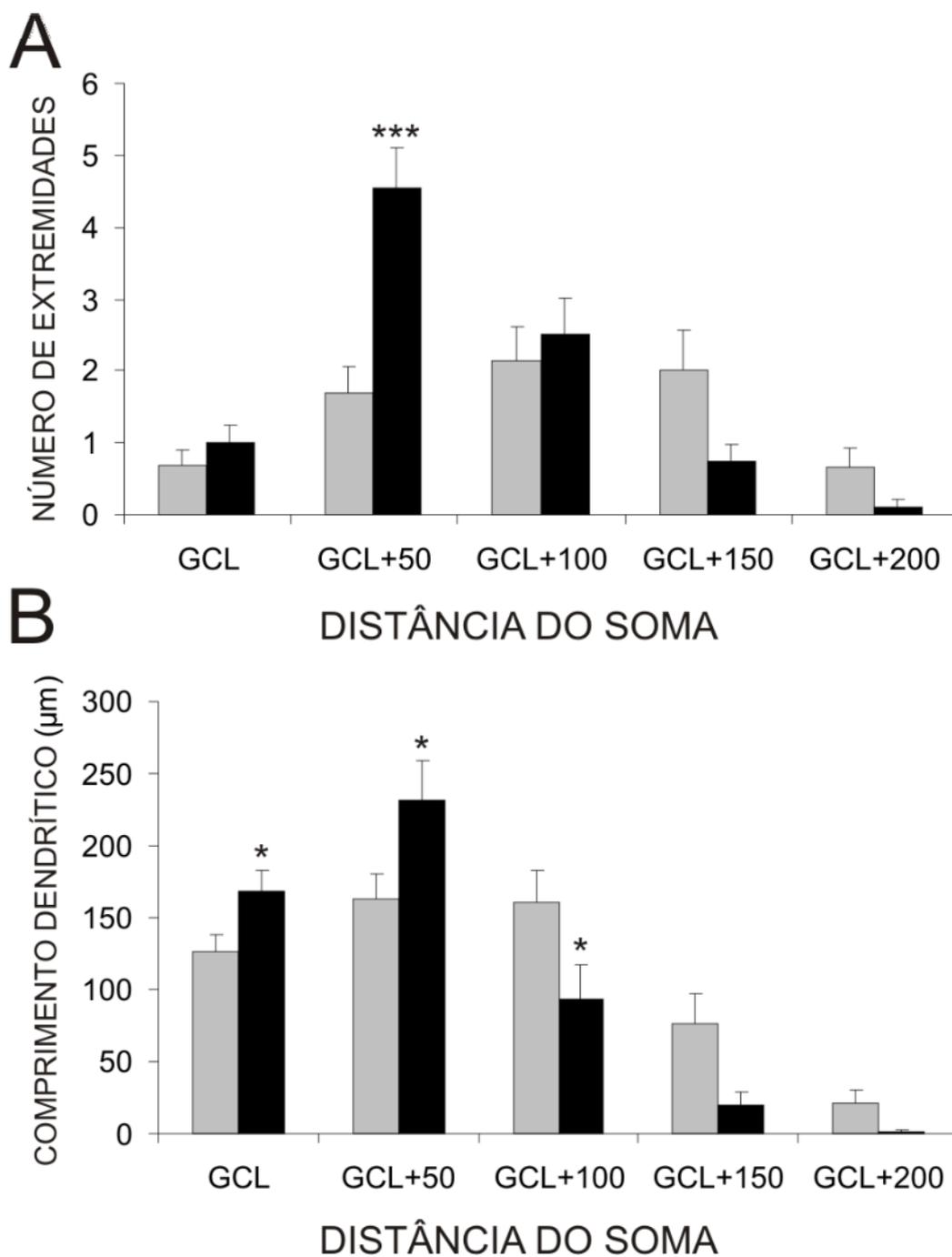
Apenas a análise de Sholl, realizada com o posicionamento de esferas concêntricas em torno do soma revelou uma grande diferença na distribuição espacial da arborização dendrítica apical dos neurônios granulares DCX+. Havia mais bifurcações dendríticas no interior da camada granular (GCL) nos animais epilépticos (Fig. 12A) o que resultou em mais intersecções dendríticas emergindo da camada granular (Fig. 12B).

A maior parte desses dendritos terminou nos primeiros 50  $\mu$ m da camada molecular, i.e., na camada molecular interna (Fig. 13A). Como consequência desse padrão de ramificação e terminação o comprimento dendrítico acumulado na GCL e na molecular interna (GCL + 50) era maior nos animais epilépticos e o contrário ocorreu nos 50  $\mu$ m seguintes da camada molecular (GCL + 100; Fig. 13B).

Esses resultados foram publicados no periódico *Brain Research* volume 1165 páginas 126 a 134 (Arisi & Garcia-Cairasco, 2007; vide Anexo C).



**Figura 12.** Resultados da análise de Sholl da arborização dendrítica apical dos neurônios DCX+ dos animais controles (cinza) e epiléticos (preto). Em A, número de bifurcações dentro de cada esfera. Em B, número de dendritos que intersectaram cada esfera. GCL, camada granular. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



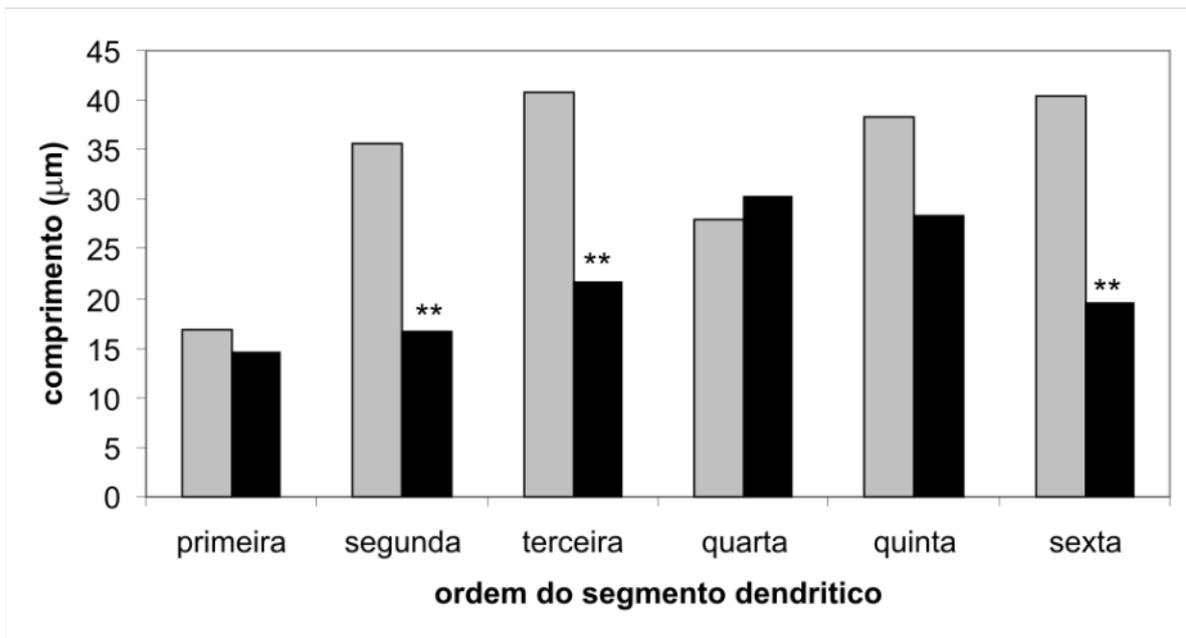
**Figura 13.** Em A, número de terminações dendríticas dentro de cada esfera de análise. Em B, comprimento dendrítico acumulado em cada esfera. GCL, camada granular. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.5.2. Análise dos segmentos dendríticos (*branch order analyses*)

A medição dos segmentos dendríticos, ou *branch order analyses* (Tabela 2), revelou que dendritos de segunda, terceira e sexta ordem eram mais curtos nos animais tratados com pilocarpina (Fig. 14). Os segmentos de segunda e terceira ordem se localizavam nas margens de contato entre a camada granular e a camada molecular do giro denteado em ambos os grupos experimentais. Já a maioria dos segmentos de sexta ordem localizava-se na camada molecular externa nos animais controles e na camada molecular média nos animais epiléticos.

**Tabela 2. Análise dos segmentos dendríticos (valor mediano)**

<b>Ordem</b>	<b>Controle</b>	<b>Pilocarpina</b>
<b>1<sup>a</sup></b>	16,8 µm	14,5 µm
<b>2<sup>a</sup></b>	35,55 µm	16,6 µm
<b>3<sup>a</sup></b>	40,7 µm	21,65 µm
<b>4<sup>a</sup></b>	28,05 µm	30,3 µm
<b>5<sup>a</sup></b>	38,25 µm	28,4 µm
<b>6<sup>a</sup></b>	40,40 µm	19,45 µm

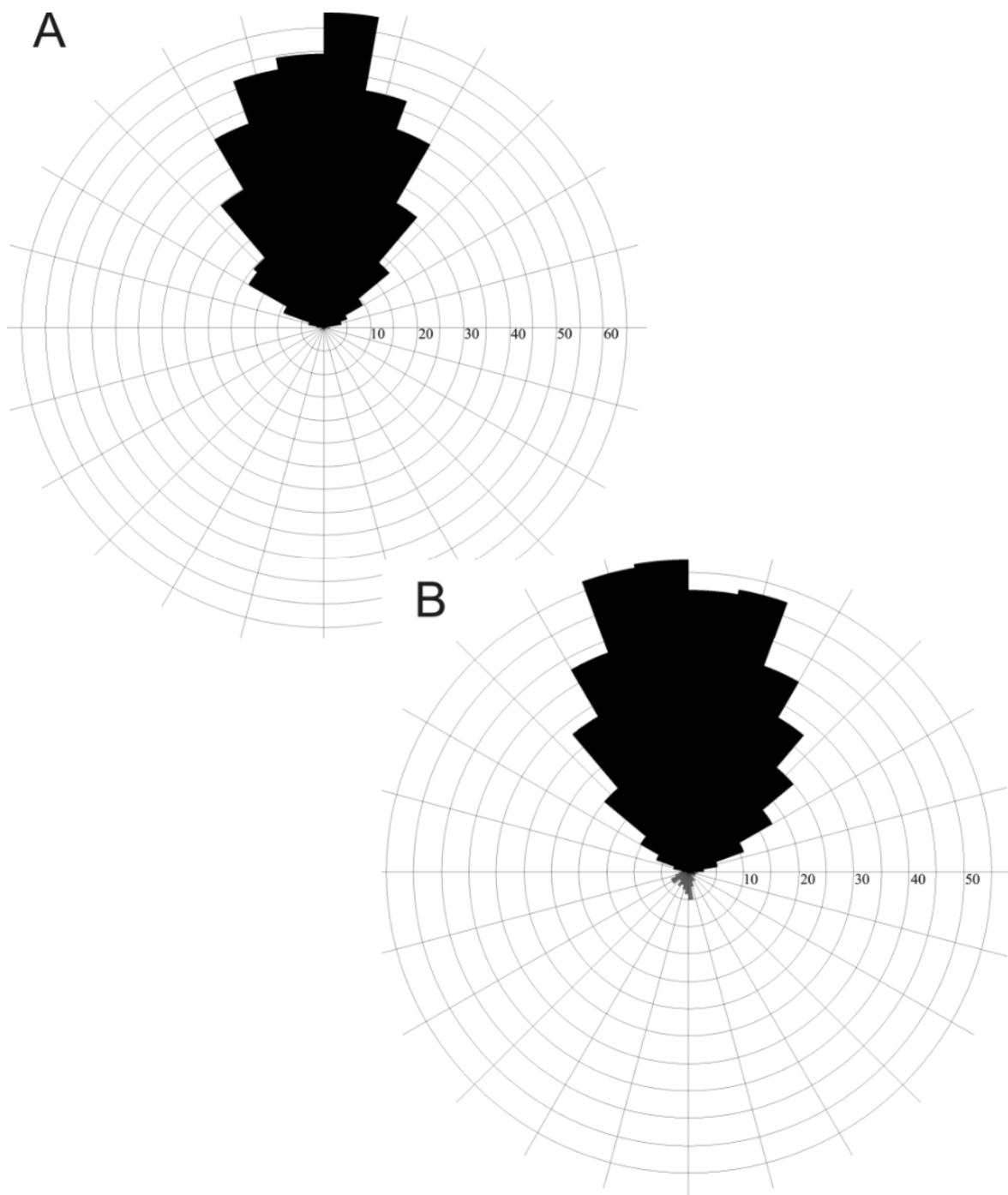


**Figura 14.** Valor mediano do comprimento dos segmentos dendríticos classificados por ordem de posição na árvore dendrítica dos animais controles (cinza) e epiléticos (preto). \*\* $p < 0,01$ , Mann-Whitney.

### 3.5.3. Histograma polar

Os histogramas polares revelaram a direção em graus e a quantidade de dendritos em cada janela de medição (Fig. 15). A arborização dendrítica apical está representada em preto e a arborização dendrítica basal, em cinza.

A comparação estatística revelou não haver diferenças entre as arborizações apicais dos novos neurônios granulares dos animais controles (Fig. 15A) e epiléticos (Fig. 15B).

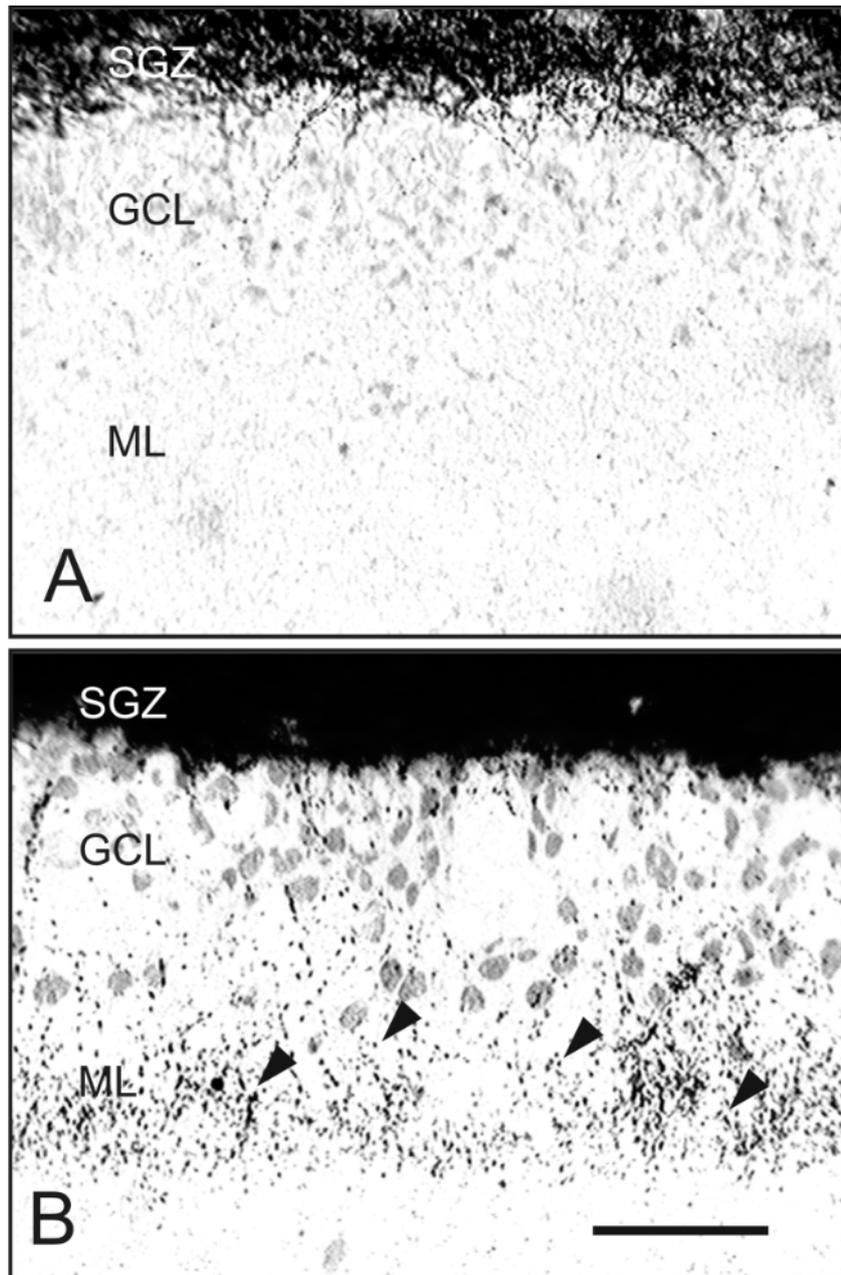


**Figura 15.** Histogramas polares das árvores dendríticas dos neurônios granulares DCX+. Em A, média dos animais controles, em B, média dos animais epiléticos. Em preto, arborização dendrítica apical, em cinza, arborização dendrítica basal. Escala em  $\mu\text{m}$ .

### 3.6. Autometalografia de Timm-Danscher

A coloração autometalográfica de Timm-Danscher revelou a distribuição dos terminais sinápticos ricos em zinco do hipocampo (Fig. 16). Como esperado, os animais controles ( $n=5$ ) não possuíam marcação na camada molecular do GD e os animais epiléticos ( $n=7$ ) apresentavam terminais sinápticos aberrantes na camada molecular e também na GCL.

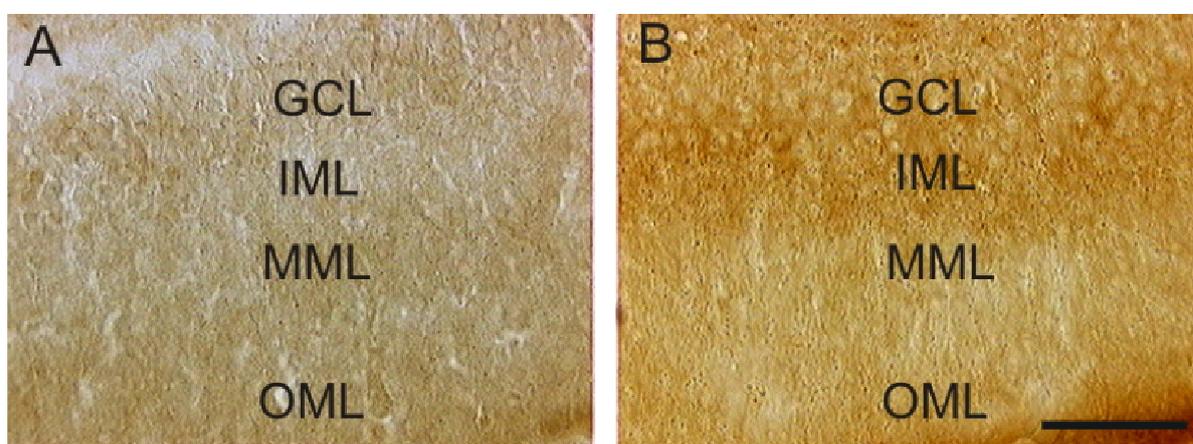
O escore dos animais controles na escala de Cavazos foi 0, com ausência de grânulos entre as extremidades e a crista do GD (Fig. 16A), e nos animais epiléticos o escore variou entre 3, com um proeminente número de grânulos em um padrão contínuo com aglomerados esparsos, e 4, com um proeminente número de grânulos formando uma lâmina confluyente (Fig. 16B). A espessura média da banda de brotamento foi de  $48 \pm 4 \mu\text{m}$ , medidos com o programa *Stereo Investigator*.



**Figura 16.** Autometalografia de Timm-Danscher para terminais sinápticos ricos em zinco. Em A, animal controle com marcação apenas na zona subgranular. Em B, animal epiléptico com marcação também na camada molecular interna (setas). SGZ, zona subgranular; GCL, camada granular; ML, camada molecular. Barra= 50  $\mu$ m.

### 3.7. Imunohistoquímica para BDNF

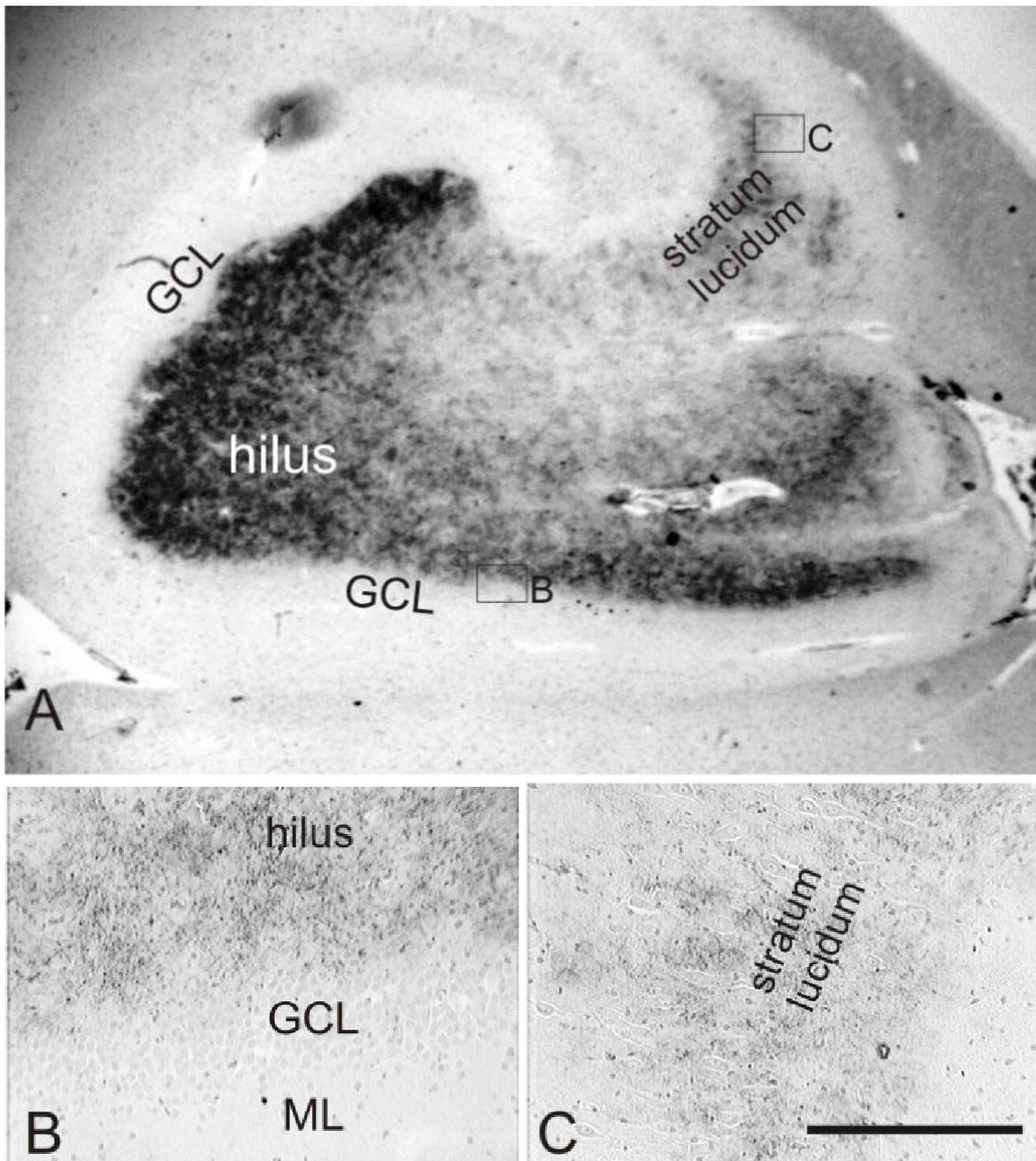
O resultado da reação imunohistoquímica para a neurotrofina *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) no tecido dos animais controles e epiléticos pode ser visualizado na Figura 17. Embora possa ser observada uma banda de marcação na camada molecular interna a heterogeneidade dos resultados entre os animais do mesmo grupo experimental e entre as diferentes realizações da imunohistoquímica impediu uma quantificação dos resultados.



**Figura 17.** Imunohistoquímica para BDNF. Em A, animal controle e em B, animal epilético. GCL, camada granular; IML, camada molecular interna; MML, camada molecular média; OML, camada molecular externa. Barra= 75  $\mu$ m.

### 3.8. Imunohistoquímica para *doublecortin* em tecido humano

A imunohistoquímica para a proteína DCX realizada em tecido humano revelou um padrão de marcação muito distinto do observado no tecido dos animais experimentais (Fig. 18).



**Figura 18.** Imunohistoquímica para *doublecortin* em tecido humano. Em A vista panorâmica da formação hipocampal apresentando marcação no *hilus* e no *stratum lucidum*. Em B, visualização das camadas granular (GCL) e molecular (ML) do giro denteado apresentando grânulos de marcação apenas no *hilus*. Em C, grânulos de marcação no *stratum lucidum* em torno dos somas dos neurônios piramidais de CA3. Barra= 1 mm em A e 250  $\mu$ m em B e C.

Surpreendentemente a marcação para DCX no tecido humano ficou restrita ao *hilus* do giro denteado e ao *stratum lucidum* de CA3, com uma sobreposição do percurso normal das fibras musgosas (Fig 18A). Não foi possível distinguir somas ou dendritos, com uma marcação em pontos discretos distribuídos pelo *hilus* (Fig. 18B) e *stratum lucidum* (Fig. 18C), porém ausentes nas camadas granular e molecular do giro denteado (Fig. 18B).

## 4. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi demonstrado que animais epiléticos possuíam novos neurônios granulares com morfologia dendrítica alterada (Arisi & Garcia-Cairasco, 2007; Anexo C). Os neurônios marcados com imunohistoquímica para *doublecortin* possuíam mais bifurcações no interior da camada granular e mais terminações na camada molecular do GD dos animais epiléticos. Os dendritos dos novos neurônios granulares estavam concentrados em regiões onde ocorreu brotamento das fibras musgosas como a camada molecular interna e o *hilus*.

Os neurônios granulares novos eram duas vezes mais numerosos nos animais epiléticos do que nos animais controles, confirmando resultados prévios (Parent *et al.*, 1997; Bengzon *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2000; Sankar *et al.*, 2000). Também foi demonstrado que os dendritos basais dos neurônios granulares novos eram mais freqüentes no GD dos animais epiléticos (Spigelman *et al.*, 1998; Buckmaster & Dudek, 1999; Ribak *et al.*, 2000; Dashtipour *et al.*, 2002; Ribak *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2005).

O estudo da morfologia dendrítica dos novos neurônios granulares gerados no SNC adulto foi possível graças ao advento da imunohistoquímica para a proteína *doublecortin* (DCX), um marcador endógeno de neurogênese (Des Portes *et al.*, 1998; Gleeson *et al.*, 1998). A DCX é expressa no SNC em desenvolvimento por neurônios em diferenciação e migração. Foi demonstrado recentemente, em trabalhos que combinavam marcação para DCX e BrdU, que a imunohistoquímica de DCX é uma ferramenta confiável para a avaliação da neurogênese no animal adulto (Rao & Shetty, 2004; Couillard-Després *et al.*, 2005).

#### 4.1. Aumento da neurogênese nos animais epiléticos

O uso de métodos estereológicos permitiu observar que o número de células granulares novas, ou seja, que expressam *doublecortin*, era o dobro nos animais epiléticos do que nos controles, um mês após o tratamento com pilocarpina. Essa diferença, apesar de grande, não era facilmente observada com uma avaliação histológica qualitativa. Os métodos estereológicos como o fracionador óptico, possuem características sistemáticas, como o intervalo fixo entre os cortes avaliados, e características aleatórias, como a distribuição do retículo que determina a posição e número de áreas de amostragem em cada corte. Essa mistura de características evita qualquer viés de quem realiza a contagem estereológica (*unbiased stereology*), tornando os resultados altamente confiáveis.

A marcação de um antígeno endógeno como a *doublecortin* mostrou-se mais eficiente para quantificar a neurogênese do que uma substância exógena como a bromo-deoxiuridina (BrdU). No estudo comparativo entre *doublecortin* e BrdU realizado por Rao e Shetty (2004), foi demonstrado que 90% das células marcadas para *doublecortin* também apresentavam marcação para BrdU. Porém, o número absoluto de neurônios marcados para *doublecortin* mostrava-se até 20% maior do que com o uso de BrdU, mostrando uma subavaliação da neurogênese pelo método da BrdU. Entretanto, a injeção de BrdU é uma ótima ferramenta para o acompanhamento temporal da neurogênese, pois permite identificar neurônios novos gerados logo após a injeção.

Um aumento da neurogênese em modelos experimentais de epilepsia foi registrado pela primeira vez com SE induzido pela injeção de pilocarpina

(Parent *et al.*, 1997). O mesmo fenômeno foi observado nos modelos experimentais de epilepsia de abrasamento elétrico e ácido caínico no mesmo ano (Bengzon *et al.*, 1997). Desde esses trabalhos seminais, o papel do aumento da neurogênese na epileptogênese está sendo investigado.

Radley e Jacobs (2003) propuseram um mecanismo serotoninérgico através do qual as crises epiléticas aumentariam a neurogênese. Eles trataram animais epiléticos com um antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub> para serotonina. Esse tratamento bloqueou o aumento da neurogênese e as crises recorrentes espontâneas apresentavam tendência de diminuição nos animais tratados, porém sem diferença significativa.

Por outro lado, a inibição da enzima ciclooxigenase-2 da via de inflamação também evitou o aumento da neurogênese na epilepsia e diminuiu a frequência e duração das crises recorrentes espontâneas (Jung *et al.*, 2006). Esses estudos, como o nosso, foram realizados em modelos de epilepsia não-crônicos; em um estudo crônico de epilepsia Hattiangady e colaboradores (2004) observaram um decréscimo em relação aos controles na taxa de neurogênese observada em animais epiléticos cinco meses após o tratamento com ácido caínico.

Esses resultados sugerem que o aumento da neurogênese poderia ser uma resposta inflamatória inicial, do tecido nervoso, mediada por distintas vias bioquímicas. Também sugerem um papel deletério na epileptogênese para os novos neurônios granulares gerados após o insulto inicial. Na fase latente da epileptogênese a produção ampliada de novos neurônios granulares que crescem em um meio trófico alterado poderia contribuir para a formação do circuito epilético. Na fase crônica da epileptogênese, uma diminuição na

produção de novos neurônios granulares poderia contribuir para os déficits de memória e aprendizado observados na epilepsia (Hattiangady *et al.* 2004).

#### **4.2. Arborização dendrítica apical e brotamento das fibras musgosas**

Descrições detalhadas da morfologia dendrítica de neurônios granulares maduros foram realizadas com impregnação de Golgi (Desmond & Levy, 1982) e com injeção intracelular de peroxidase (Claiborne *et al.*, 1990).

Alterações na morfologia dos dendritos dos neurônios granulares foram observadas na epilepsia do lobo temporal. Isokawa e Mello (1991) utilizando preenchimento celular com biocitina ou *lucifer-yellow*, em animais tratados com pilocarpina, observaram grande perda de espinhas dendríticas nos dendritos apicais. Isso ocorreu nas porções proximais e distais da arborização dendrítica, porém com uma distribuição desigual existindo regiões de preservação das espinhas dendríticas. Houve também a formação de nódulos (*beads*) ao longo dos dendritos e uma diminuição no número de ramificações dendríticas, embora isso não tenha sido quantificado. Observações semelhantes foram realizadas em neurônios granulares de tecido do hipocampo retirado de pacientes com epilepsia do lobo temporal (Isokawa & Levesque, 1991).

Somente com a introdução da imunohistoquímica para *doublecortin* tornou-se possível estudar a arborização dendrítica dos novos neurônios granulares gerados no giro denteado de um animal adulto (Hattiangady *et al.*, 2004; Rao & Shetty, 2004; Ribak *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2005). Porém, a imunohistoquímica para *doublecortin* não permite visualizar as espinhas dendríticas.

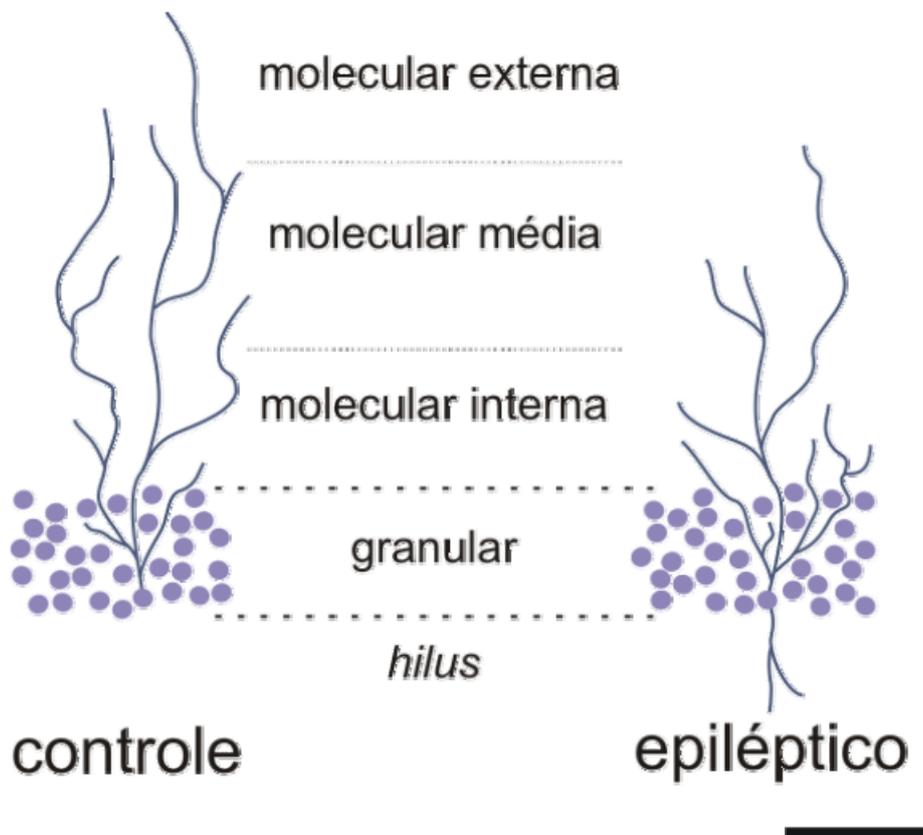
A primeira reconstrução digital com uma minuciosa descrição morfológica dos neurônios granulares *doublecortin*-positivos foi feita por Rao e Shetty (2004). Esses pesquisadores demonstraram que os neurônios granulares *doublecortin*-positivos de animais senescentes possuíam árvores dendríticas apicais menores e com menos ramificações do que em animais jovens (Rao *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2006).

Recentemente também foi observado, utilizando a técnica de impregnação por prata de Golgi, que os novos neurônios granulares possuíam uma arborização dendrítica maior e com mais ramificações nos animais que praticavam exercício espontaneamente (Redila & Christie, 2006).

Em nosso estudo observamos um comprimento total da árvore dendrítica apical semelhante em controles, com  $542,1 \pm 54 \mu\text{m}$ , e animais epiléticos, com  $515,3 \pm 39,2 \mu\text{m}$ . Esses valores, por sua vez, são muito similares aos  $518,3 \pm 43,9 \mu\text{m}$  observados por Rao e Shetty (2004). Isso é contrastante com o comprimento dendrítico apical de  $2800 \mu\text{m}$  observado em neurônios granulares maduros da lâmina infrapiramidal do GD (Claiborne *et al.*, 1990). Isso sugere que os novos neurônios granulares gerados no sistema nervoso adulto possuem arborizações dendríticas muito menores que os neurônios granulares gerados durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

Em nosso estudo, a distribuição dos dendritos apicais estava radicalmente alterada nos animais epiléticos (Fig. 19). Os dendritos possuíam mais bifurcações na camada granular e mais terminações na camada molecular do GD. Os dendritos dos neurônios *doublecortin*-positivos estavam concentrados nas camadas granular e molecular interna e eram mais raros nas camadas molecular média e externa do GD nos animais epiléticos.

É como se durante o crescimento da arborização dendrítica no tecido epiléptico os dendritos ramificassem e terminassem próximos do soma e, como o comprimento dendrítico total foi mantido, não atingissem as camadas molecular média e externa (Fig. 19).



**Figura 19.** Arborização dendrítica dos neurônios DCX+ de um animal controle (esquerda) e epiléptico (direita). Os desenhos foram baseados nos resultados numéricos mostrados nas Figuras 12 e 13. Barra= 50  $\mu\text{m}$ .

Uma importante característica da morfologia dendrítica aberrante dos novos neurônios granulares registrada em nosso estudo é a concentração desses dendritos em regiões onde ocorreu o brotamento das fibras musgosas. A camada molecular interna e a camada granular possuíam muitos terminais sinápticos aberrantes, ricos em zinco, como demonstrado em nosso e outros estudos (Tauck & Nadler, 1985; Sutula *et al.*, 1989; Wuarin & Dudek, 1996).

### 4.3. O papel do BDNF

Neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), poderiam causar o padrão de crescimento dos neurônios *doublecortin*-positivos observado nos animais epilépticos. O acúmulo de RNA mensageiro para BDNF em dendritos apicais de neurônios granulares foi observado após o tratamento com pilocarpina (Tongiorgi *et al.*, 2004). A expressão aumentada de BDNF por transferência de genes promoveu a ramificação de dendritos apicais próximos do soma e a formação de dendritos basais em neurônios granulares do giro denteado (Danzer *et al.*, 2002). É interessante salientar que essas alterações morfológicas se assemelham às observadas em nosso estudo, sugerindo a sinalização do BDNF para sua ocorrência.

Outro exemplo de reorganização dendrítica após o SE e sua correlação com BDNF foi fornecido recentemente pelo estudo de Ampuero e colaboradores (2007). Utilizando ácido caínico para a indução de SE foi estudada a morfologia dendrítica dos neurônios dos córtices retrosplenial e auditivo e também os níveis da proteína tirosina-quinase B (TrkB) que age como receptora da neurotrofina BDNF. Foi observada uma redução na expressão do receptor TrkB e no comprimento total dos dendritos basais no córtex retrosplenial setenta e duas horas após o SE (Ampuero *et al.*, 2007).

Infelizmente não foi possível tornar os resultados da imunohistoquímica para BDNF nos animais experimentais homogêneos o bastante para que uma quantificação das mudanças nos níveis dessa neurotrofina fosse realizada.

#### 4.4. Dendritos basais

A vasta maioria dos neurônios granulares maduros do GD possui apenas dendritos apicais. Neurônios granulares imaturos também possuem dendritos basais em uma conformação bipolar que, durante o desenvolvimento, é gradualmente transformada na forma madura (Seress, 1992; Spigelman *et al.*, 1998). No entanto, dendritos basais são mantidos por 10% dos neurônios granulares maduros do GD nos primatas, mas são raros no GD de roedores (Seress & Frotscher, 1990).

Mesmo entre primatas existem diferenças: a frequência de dendritos basais em neurônios granulares de humanos é o dobro daquela observada nos macacos *Rhesus* (Seress & Mrzljak, 1987). Os dendritos basais dos neurônios granulares maduros podem estar restritos ao *hilus*, sendo então denominados dendritos basais hilares, ou podem estender-se para a camada molecular, sendo então denominados dendritos basais recorrentes (Dashtipour *et al.*, 2002).

Um achado comum na epilepsia do lobo temporal é um aumento na frequência de dendritos basais nos neurônios granulares. Esses dendritos estão presentes em 30% dos neurônios granulares de pacientes epiléticos e entre 5% (Ribak *et al.*, 2000) e 12% (Buckmaster & Dudek, 1999) dos neurônios granulares de animais experimentais. Nos animais controles de nosso estudo, foram observados dendritos basais em 30% dos neurônios *doublecortin*-positivos reconstruídos, exatamente a mesma proporção observada por Rao e Shetty (2004), mas menos que os 55% registrados por Ribak e colaboradores (2004).

O comprimento dos dendritos basais nos animais epiléticos e controles de nosso estudo foram muito similares aos observados por Shapiro *et al.* (2005). Nos animais epiléticos, dendritos basais hilares estavam presentes em 85% dos neurônios *doublecortin*-positivos reconstruídos digitalmente. Portanto, o mesmo aumento na frequência de dendritos basais, observado na população de neurônios granulares na ELT, também é observado nos novos neurônios granulares.

O brotamento das fibras musgosas também foi observado no *hilus* do GD de animais experimentais epiléticos (Sutula *et al.*, 1998; Wenzel *et al.*, 2000). Dendritos basais dos novos neurônios granulares poderiam receber aferências sinápticas dos terminais aberrantes das fibras musgosas (Spigelman *et al.*, 1998; Ribak *et al.*, 2000). A formação de sinapses entre os terminais aberrantes das fibras musgosas e os dendritos *doublecortin*-positivos no *hilus* e nas camadas granular e molecular interna é apenas sugerida pelos nossos resultados, mas é um evento altamente provável.

#### **4.5. Arquivos digitais dos neurônios DCX+**

Os arquivos de coordenadas resultantes da reconstrução no programa *Neurolucida* serão depositados em arquivos públicos como o *NeuronDB* da Universidade Yale ou o *NeuroMorpho.org* do Instituto Krasnow.

Os arquivos de coordenadas poderão servir como base para a realização de simulação computacional com o programa *NEURON*, desenvolvido por Michael Hines. A distribuição de canais iônicos e conexões sinápticas seriam providas por trabalhos com registro eletrofisiológico (van

Praag *et al.*, 2002) e simulações de atividade do giro denteado (Santhakumar *et al.*, 2005).

#### **4.6. *Doublecortin* em tecido humano**

Embora o resultado aqui apresentado seja apenas preliminar, pois a imunohistoquímica para *doublecortin* foi realizada em tecido de apenas um paciente, sua marcante distribuição coincidente com o esperado para as fibras musgosas levanta interessantes questões. Talvez a explicação para o resultado observado seja a existência de inúmeras isoformas de *doublecortin* em humanos (Reiner *et al.*, 2006).

Poucas pesquisas sobre neurogênese foram realizadas em humanos. Isso se deve tanto a limitações éticas quanto a limitações técnicas. A neurogênese hipocampal foi detectada em nossa espécie apenas porque pacientes receberam uma injeção de BrdU para diagnóstico de câncer (Eriksson *et al.*, 1998). De maneira interessante Pereira e colaboradores (2006) acabam de apresentar resultados onde o volume sanguíneo cerebral do giro denteado pode ser utilizado como um correlato de imagem por ressonância magnética da neurogênese induzida pelo exercício físico em voluntários humanos.

A imunohistoquímica de *doublecortin* para detectar neurogênese em humanos foi raramente empregada. Qin e colaboradores (2000) a utilizaram em cérebros de adultos, crianças e fetos para comparar o perfil histoquímico da *doublecortin* entre pessoas saudáveis e pessoas com desordens de migração neuronal. Embora seja possível visualizar os neurônios DCX+ nas imagens do

neocórtex desse trabalho não há nenhuma imagem do hipocampo. Tampouco é possível distinguir as árvores dendríticas dos neurônios DCX+.

Bedard e Parent (2004) utilizaram a imunohistoquímica para DCX para demonstrar a existência da corrente migratória rostral de novos neurônios gerados na zona subventricular para o bulbo olfatório em humanos. Seus resultados comprovam claramente a existência dessa corrente em nossa espécie. Entretanto, não é possível visualizar as árvores dendríticas dos neurônios DCX+ em suas imagens.

Jin e colaboradores (2004) utilizaram o mesmo anticorpo para *doublecortin* empregado no presente estudo para quantificar a neurogênese no cérebro de quatorze pacientes com Alzheimer. Em seu estudo apresentam imagens com neurônios DCX+ no hipocampo de humanos. Novamente apenas o soma dos neurônios DCX+ é visível e não sua arborização dendrítica. Esses resultados contrastam com os obtidos no presente estudo, mas apenas a repetição do protocolo experimental pode trazer resultados conclusivos.

## 5. CONCLUSÕES

- Os comportamentos de *wet dog shake* e *head shake* são muito raros na fase aguda do tratamento com pilocarpina.
- A neurogênese no hipocampo é aumentada após um insulto epileptogênico
- Os novos neurônios granulares possuem uma morfologia dendrítica alterada.
- Os dendritos apicais dos novos neurônios granulares são mais ramificados dentro da camada granular e suas terminações se concentram na camada molecular interna no hipocampo dos animais epiléticos.
- Os dendritos basais dos novos neurônios granulares são mais freqüentes e longos no hipocampo dos animais epiléticos.
- Nos animais epiléticos, os dendritos dos novos neurônios granulares se concentram em regiões onde ocorre o brotamento das fibras musgosas.

## 6. Resumos apresentados em congressos

6.1. **ARISI, G. M.**; GARCIA-CAIRASCO, N. Hippocampal doublecortin-positive granular neurons have abnormal dendritic morphology in the temporal lobe epilepsy pilocarpine model. In: Society for Neuroscience Annual Meeting 2006. Atlanta, EUA.

6.2. FORESTI M. L., **ARISI G. M.**, FERNANDES A., TILELLI C. Q., GARCIA-CAIRASCO N. Effects of zinc chelation in amygdala rapid kindling-induced epileptogenesis. In: Society for Neuroscience Annual Meeting 2006. Atlanta, EUA.

6.3. ZUCCHI O. L. A. D., SALVADOR M. J., RODRIGUES M. C. A., ROSSETTI F., **ARISI G. M.**, GARCIA-CAIRASCO N. Detecção de microelementos em fatias cerebrais de ratos sensíveis às crises convulsivas audiogênicas empregando-se a fluorescência de raios-X. In: Congresso de Microfluorescência, 2006. Santiago, Chile.

6.4. **ARISI, G. M.**; GARCIA-CAIRASCO, N. A proliferação de neurônios granulares hipocâmpais aumenta e os dendritos dos novos neurônios são anormais no modelo experimental de ELT induzida por pilocarpina. In: XXXI Congresso Brasileiro de Epilepsia, 2006, Bento Gonçalves. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*. Porto Alegre, 2006. v. 12. p. 8-9.

6.5. FORESTI, M. L.; **ARISI, G. M.** ; FERNANDES, A. ; TILELLI, C. Q. ; GARCIA-CAIRASCO, N. Efeito da quelatação de zinco no desenvolvimento de crises comportamentais e eletrencefalográficas no modelo de abrasamento elétrico rápido da amígdala. In: XXXI Congresso Brasileiro de Epilepsia, 2006, Bento Gonçalves. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*. Porto Alegre, 2006. v. 12. p. 11-12.

6.6. FORESTI, M. L. ; **ARISI, G. M.** ; TILELLI, C. Q. ; GARCIA-CAIRASCO, N. . Behavioral and electroencephalographic seizures in the amygdala rapid electrical kindling model is accompanied by neither neuronal degeneration nor mossy fiber sprouting. In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2005, Águas de Lindóia, SP. Livro de Resumos e Programa da XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2005.

6.7. CAIRRÃO, M. A. R. ; ROSSETTI, F. ; FORESTI, M. L. ; **ARISI, G. M.** ; DAL-COL, M. L. C. ; FURTADO, M. de A. ; BERTTI, P. ; FERNANDES, A. ; OLIVEIRA, J. A. C. ; GARCIA-CAIRASCO, N. . Estudo dos comportamentos de sacudir o corpo (Wet Dog Shakes) e cabeça em modelos experimentais de crises convulsivas em ratos. In: XXIX Congresso Brasileiro de Epilepsia, 2004, Ribeirão Preto. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*. Porto Alegre, 2004. v. 10. p. 21-21.

6.8. **ARISI, G. M.** ; OLIVEIRA, J. A. C. ; SANTOS, A. A. ; GUEDES, R. C. A. ; GARCIA-CAIRASCO, N. . Estudo morfométrico preliminar com o programa Neurolucida de neurônios NADPH-diaforase positivos no hipocampo de ratos.. In: XXIX Congresso Brasileiro de Epilepsia, 2004, Ribeirão Preto. Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology. Porto Alegre, 2004. v. 20. p. 20-20.

6.9. SERAFINI, L. N. ; **ARISI, G. M.** ; CARLOTTI JUNIOR, C. G. ; LEITE, J. P. ; MOREIRA, J. E. . EM crio-immunolabeling of synaptic profiles in the fascia dentata inner molecular layer (IML) of human hippocampus. In: Anais do IX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular e XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2004.

6.10. **ARISI, G. M.** ; NEDER, L. ; GARCIA-CAIRASCO, N. ; LEITE, J. P. ; MOREIRA, J. E. . Immunolocalization of GluR2 subunit in aberrant hippocampal synapses in experimental rat epilepsy. In: Anais do IX congresso da Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular e XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2004.

6.11. NEDER, L. ; CARLOTTI JUNIOR, C. G. ; ASSIRATI Jr, J. A. ; **ARISI, G. M.** ; MOREIRA, J. E. ; LEITE, J. P. . Expression of GluR1 and NMDAR1 receptor subunits and ultrastructure of fascia dentata inner molecular layer synapses in temporal lobe epilepsy. In: 56th American Epilepsy Society Annual Meeting, 2003, Boston, EUA. Epilepsia, 2003. v. 44. p. 303-304.

## 7. Distinções

O resumo apresentado em 2006 no XXXI Congresso Brasileiro de Epilepsia recebeu o prêmio **Aristides Leão** de melhor trabalho de pesquisa básica. Esse prêmio é oferecido bianualmente pela Liga Brasileira de Epilepsia.

Imagem mostrando os neurônios reconstruídos associada ao trabalho Arisi & Garcia-Cairasco (2007) foi escolhida como capa do volume 1165 da revista *Brain Research*.

## 8. Bibliografia

- Acsády L, Kamondi A, Sík A, Freund T & Buzsáki G (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. **Journal of Neuroscience** **18**, 3386-3403.
- Affifi AK & Bergman RA (1998). **Functional Neuroanatomy, Text and Atlas**, Nova Iorque, EUA, McGraw-Hill.
- Altman J (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 2. A longitudinal investigation of kinetics migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **Journal of Comparative Neurology** **128**, 431-474.
- Altman J (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis .4. Cell proliferation and migration in anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in olfactory bulb. **Journal of Comparative Neurology** **137**, 433-457.
- Altman J & Das GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **Journal of Comparative Neurology** **124**, 319-335.
- Amaral DG, Scharfman HE & Lavenex P (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). In: Scharfman H E (ed.) The dentate gyrus: a comprehensive guide to structure, function, and clinical implications. **Progress in Brain Research** **163**, 3-22; 788-790.
- Amaral DG (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. **Journal of Comparative Neurology** **182**, 851-914.
- Amaral DG (1999). Introduction: What is where in the medial temporal lobe? **Hippocampus** **9**, 1-6.

- Amaral DG & Witter MP (1989). The 3-dimensional organization of the hippocampal-formation: a review of anatomical data. **Neuroscience** **31**, 571-591.
- Ampuero E, Dagnino-Subiabre A, Sandoval R, Zepeda-Carreño R, Sandoval S, Viedma A, Aboitiz F, Orrego F & Wyneken U (2007). Status epilepticus induces region-specific changes in dendritic spines, dendritic length and TrkB protein content of rat brain cortex. **Brain Research** **1150**, 225-238.
- Andersen P, Bliss TVP & Skrede KK (1971). Lamellar Organization of Hippocampal Excitatory Pathways. **Experimental Brain Research** **13**, 222-238.
- Arisi GM & Garcia-Cairasco N (2007). Doublecortin-positive newly born granule cells of hippocampus have abnormal apical dendritic morphology in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Research** **1165**, 126-134.
- Babb TL, Lieb JP, Brown JW, Pretorius J & Crandall PH (1984). Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. **Epilepsia** **25**, 721–728.
- Babb TL, Kupfer WR & Pretorius JK (1988). Recurrent excitatory circuits by sprouted mossy fibers into the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. **Epilepsia** **29**, 674.
- Beckenstein J & Lothman E (1993). Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. **Science** **259**, 97-100.
- Bedard A & Parent A (2004). Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. **Developmental Brain Research** **151**, 159-168.
- 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, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M & Lindvall O (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **94**, 10432-10437.

- Bernard C, Esclapez M, Hirsch JC & Bernard C (1998). Interneurons are not so dormant in temporal lobe epilepsy: a critical reappraisal of the dormant basket cell hypothesis. **Epilepsy Research** **32**, 93-103.
- Bland BH (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. **Progress in Neurobiology** **26**, 1-54.
- Bliss TVP & Lømo T (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in dentate area of anesthetized rabbit following stimulation of perforant path. **Journal of Physiology-London** **232**, 331-356.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L & Kuhn HG (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology** **467**, 1-10.
- Buckmaster PS & Dudek FE (1999). In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. **Journal of Neurophysiology** **81**, 712-721.
- Buzsáki G (1989). Two-stage model of memory trace formation: a role for noisy brain states. **Neuroscience** **31**, 551-570.
- Castrén E (2005). Opinion - Is mood chemistry? **Nature Reviews Neuroscience** **6**, 241-246.
- 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**, 778-782.
- Cavalheiro EA, Santos NF & Priel MR (1996). The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia** **37**, 1015-1019.
- 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**, 778-782.
- Cavazos JE & Sutula TP (1990). Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. **Brain Research** **527**, 1-6.

- Cavazos JE, Golarai G & Sutula TP (1991). Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. **Journal of Neuroscience** **11**, 2795-2803.
- Cavazos JE, Golarai G & Sutula TP (1992). Septotemporal variation of the supragranular projection of the mossy fiber pathway in the dentate gyrus of normal and kindled rats. **Hippocampus** **2**, 363-372.
- Choi DW, Mauluccigedde M & Kriegstein AR (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **Journal of Neuroscience** **7**, 357-368.
- Claiborne BJ, Amaral DG & Cowan WM (1990). Quantitative, 3-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. **Journal of Comparative Neurology** **302**, 206-219.
- Colmers WF & El Bahh B (2003). Neuropeptide Y and epilepsy. **Epilepsy Currents** **3**, 53-58.
- Comission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1991). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. **Epilepsia** **32**, 778-782.
- Corkin S (2002). What's new with the amnesic patient HM? **Nature Reviews Neuroscience** **3**, 153-160.
- Couillard-Després S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG & Aigner L (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. **European Journal of Neuroscience** **21**, 1-14.
- Danscher G, Stoltenberg M, Bruhn M, Sondergaard C & Jensen D (2004). Immersion autometallography: histochemical in situ capturing of zinc ions in catalytic zinc-sulfur nanocrystals. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry** **52**, 1619-1625.
- Danzer SC, Crooks KRC, Lo DC & McNamara JO (2002). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures. **Journal of Neuroscience** **22**, 9754-9763.

- Dashtipour K, Yan XX, Dinh TT, Okazaki MM, Nadler JV & Ribak CE (2002). Quantitative and morphological analysis of dentate granule cells with recurrent basal dendrites from normal and epileptic rats. **Hippocampus** **12**, 235-244.
- Des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C & Chelly J (1998). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. **Cell** **92**, 51-61.
- Desmond NL & Levy WB (1982). A quantitative anatomical study of the granule cell dendritic fields of the rat dentate gyrus using a novel probabilistic method. **Journal of Comparative Neurology** **212**, 131-145.
- Elmer E, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O, McIntyre DC (1997). Mossy fibre sprouting: evidence against a facilitatory role in epileptogenesis. **Neuroreport** **8**, 1193-6.
- Engel J (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research** **26**, 141-150.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA & Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine** **4**, 1313-1317.
- Esclapez M, Hirsch JC, Khazipov R, Ben-Ari Y & Bernard C (1997). Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. **Proceedings National Academy of Sciences of United States of America** **94**, 12151-12156.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P & Chelly J (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. **Neuron** **23**, 247-256.

- Franck JE, Pokorny J, Kunkel DD & Schwartzkroin PA (1995). Physiological and Morphologic Characteristics of Granule Cell Circuitry in Human Epileptic Hippocampus. **Epilepsia** **36**, 543-558.
- Frederickson CJ, Hernandez MD & Mcginty JF (1989). Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. **Brain Research** **480**, 317-321.
- Freund TF & Buzsáki G (1996). Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus** **6**, 347-470.
- Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J & Francis F (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. **Cerebral Cortex** **13**, 620-626.
- Furtado MA, Braga GK, Oliveira JAC, Del Vecchio F & Garcia-Cairasco N (2002). Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia** **43 (Suppl 5)**, 37-39.
- Galvis-Alonso OY, Oliveira JAC e Garcia-Cairasco N (2004). Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in Wistar audiogenic rats (WAR strain). **Neuroscience** **125**, 787-802.
- Garcia-Cairasco N (2002). A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. **Hearing Research** **168**, 208-222.
- Gastaut H, Gastaut JL, Gonçalves e Silva GE & Sanchez GRF (1975). Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the ILEA. **Epilepsia** **16**, 457-461.
- Gilbert ME (2001). Does the kindling model of epilepsy contribute to our understanding of multiple chemical sensitivity? **Annals of New York Academy of Sciences** **933**, 68-91.

- Gill R & Lodge D (1997). Pharmacology of AMPA antagonists and their role in neuroprotection. **Neuroprotective Agents and Cerebral Ischaemia** **40**, 197-232.
- Glaser JR & Glaser EM (2000). Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. **Journal of Chemical Neuroanatomy** **20**, 115-126.
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME & Walsh CA (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. **Cell** **92**, 63-72.
- Goddard GV (1967). Development of Epileptic Seizures Through Brain Stimulation at Low Intensity. **Nature** **214**, 1020-1021.
- Golgi C (1886). On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII–XXIII) In: On the fine structure of the central organs of the nervous system, Milano, Hoepli. Traduzido por Bentivoglio M & Swanson L W (2001). **Brain Research Bulletin**, **54**: 461–483.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G & Fuchs E (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **95**, 3168-3171.
- Hattiangady B, Rao MS & Shetty AK (2004). Chronic temporal lobe epilepsy is dentate neurogenesis in the adult associated with severely declined hippocampus. **Neurobiology of Disease** **17**, 473-490.
- Hebb DO (1949). **The Organization of Behaviour**. New York, Wiley & sons.
- Hermann BP, Seidenberg M, Schoenfeld J & Davies K (1997). Neuropsychological characteristics of the syndrome of mesial temporal lobe epilepsy. **Archives of Neurology** **54**, 369-376.
- Ishizuka N, Weber J & Amaral DG (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. **Journal of Comparative Neurology** **295**, 580-623.

- Isokawa M & Levesque MF (1991). Increased NMDA responses and dendritic degeneration in human epileptic hippocampal-neurons in slices. **Neuroscience Letters** **132**, 212-216.
- Isokawa M & Mello LEAM (1991). NMDA receptor-mediated excitability in dendritically deformed dentate granule cells in pilocarpine-treated rats. **Neuroscience Letters** **129**, 69-73.
- Jin KL, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC & Greenberg DA (2004). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **101**, 343-347.
- Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim J, Sinn DI, Kim JM, Park DK, Lee JJ, Kim SU, Kim M, Lee S & Roh JK (2006). Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of Disease** **23**, 237-246.
- Kahana MJ, Seelig D & Madsen JR (2001). Theta returns. **Current Opinion in Neurobiology** **11**, 739-744.
- Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T & Nagao M (2002). Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. **Journal of Biological Chemistry** **277**, 19049-19055.
- Kaplan MS & Hinds JW (1977). Neurogenesis in adult rat: electron-microscopic analysis of light autoradiographs. **Science** **197**, 1092-1094.
- Kaspirzhny AV, Gogan P, Horcholle-Bossavit G & Tyc-Dumont S (2002). Neuronal morphology data bases: morphological noise and assessment of data quality. **Network-Computation in Neural Systems** **13**, 357-380.
- Klink R & Alonso A (1997a). Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. **Journal of Neurophysiology** **77**, 1829-1843.

- Klink R & Alonso A (1997b). Muscarinic modulation of the oscillatory and repetitive firing properties of entorhinal cortex layer II neurons. **Journal of Neurophysiology** **77**, 1813-1828.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H & Gage FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **Journal of Neuroscience** **16**, 2027-2033.
- Leite JP, Garcia-Cairasco N & Cavalheiro EA (2002). New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Research** **50**, 93-103.
- Leite JP, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Yeoman KM & Mathern GW (1996) Neuron loss, mossy fiber sprouting, and interictal spikes after intrahippocampal kainate in developing rats. **Epilepsy Research** **26**, 219-231.
- Liberson WT & Cadilhac JG (1954). Hippocampal responses to sensory stimulation in the guinea pig. **Electroencephalography & Clinical Neurophysiology** **6**, 710-711.
- Longo BM, Covolan L, Chadi G & Mello LEAM (2003). Sprouting of mossy fibers and the vacating of postsynaptic targets in the inner molecular layer of the dentate gyrus. **Experimental Neurology** **181**, 57-67.
- Longo BM & Mello LEAM (1998). Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. **Epilepsy Research** **32**, 172-182.
- Longo BM & Mello LEAM (1997). Blockade of pilocarpine- or kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. **Neuroscience Letters** **226**, 163-166.
- Lothman EW, Stringer JL & Bertram EH (1992). The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. **Epilepsy Research (Suppl. 7)**, 301-313.
- Maccaferri G & McBain CJ (1995). Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. **Neuron** **15**, 137-145.

- Manon-Espaillet R & Eisen M (2001). An analysis of recurrent excitation based on non-linear discrete dynamical system theory and its relevance to epileptogenesis. **International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation** **2**, 321-328
- Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius JK, Yeoman KM & Kuhlman PA (1996). The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. **Epilepsy Research** **26**, 151-161.
- McNamara JO (1994). Cellular and molecular basis of epilepsy. **Journal of Neuroscience** **14**, 3413-3425.
- Mello LEAM, 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**, 985-995.
- Moraes MFD, Galvis-Alonso OY & Garcia-Cairasco N (2000). Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research** **39**, 251-259.
- Morrisett RA, Jope RS & Snead OC (1987). Effects of drugs on the initiation and maintenance of *status epilepticus* induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. **Experimental Neurology** **97**, 193-200.
- Moshé SL (2000). Mechanisms of action of anticonvulsant agents. **Neurology** **55**, S32-S40.
- Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Shimada M, Mcgeer PL & Kimura H (2000). Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. **Epilepsia** **41**, 10-18.
- Okazaki MM, Molnár P & Nadler JV (1999). Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: Synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth. **Journal of Neurophysiology** **81**, 1645-1660.
- Olney JW (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science** **164**, 719-721.

- Organização Mundial da Saúde (2001), página na Internet: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/en/).
- Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ & Findley SD (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **93**, 14934-14939.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS & Lowenstein DH (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **Journal of Neuroscience** **17**, 3727-3738.
- Paxinos G & Watson C (1998). **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego, Academic Press.
- Penfield W & Rasmussen T (1952) **The Cerebral Cortex of Man**. Londres, MacMillan.
- Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR & Small SA (2007) An *in vivo* correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **104**, 5638–5643.
- Pollard H, Charriaut-Marlangue C, Cantagrel S, Represa A, Robain O, Moreau J & Ben-Ari Y (1994). Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. **Neuroscience** **63**, 7-18.
- Qin J, Mizuguchi M, Itoh M & Takashima S (2000). Immunohistochemical expression of doublecortin in the human cerebrum: comparison of normal development and neuronal migration disorders. **Brain Research** **863**, 225-232.
- Racine RJ (1972). Modification of Seizure Activity by Electrical Stimulation .2. Motor Seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology** **32**, 281-294.

- Radley JJ & Jacobs BL (2003). Pilocarpine-induced status epilepticus increases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats via a 5-HT<sub>1A</sub> receptor-dependent mechanism. **Brain Research** **966**, 1-12.
- Rao MS, Hattiangady B, Rai KS & Shetty AK (2007). Strategies for promoting anti-seizure effects of hippocampal fetal cells grafted into the hippocampus of rats exhibiting chronic temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease** **27**, 117-132.
- Rao MS, Hattiangady B & Shetty AK (2006). The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. **Aging Cell** **5**, 545-558.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP & Shetty AK (2005). Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. **European Journal of Neuroscience** **21**, 464-476.
- Rao MS & Shetty AK (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience** **19**, 234-246.
- Rapp PR & Gallagher M (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **93**, 9926-9930.
- Redila VA & Christie BR (2006). Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. **Neuroscience** **137**, 1299-1307.
- Reiner O, Coquelle FM, Peter B, Levy T, Kaplan A, Sapir T, Orr I, Barkai N, Eichele G & Bergmann S (2006). The evolving doublecortin (DCX) superfamily. **BMC Genomics** **7**, 188-204
- Ribak CE, Korn MJ, Shan ZY & Obenaus A (2004). Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. **Brain Research** **1000**, 195-199.

- Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM & Nadler JV (2000). Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. **Journal of Comparative Neurology** **428**, 240-253.
- Rodrigues MC, Rossetti F, Foresti ML, Arisi GM, Furtado MA, Dal-Cól ML, Bertti P, Fernandes A, Santos FL, Del Vecchio F & Garcia-Cairasco N (2005). Correlation between shaking behaviors and seizure severity in five animal models of convulsive seizures. **Epilepsy & Behavior** **6**, 328-336.
- Romcy-Pereira RN & Garcia-Cairasco N (2003). Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. **Neuroscience** **119**, 533-546.
- Ross KC & Coleman JR (2000). Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** **24**, 639-653.
- Salmenperä T (2001). **Damage in the hippocampus, amygdala, entorhinal and perirhinal cortex of adults with partial epilepsy**. Tese de doutorado. 92p. Kuopio, Finlândia.
- Sankar R, Shin D, Liu HT, Katsumori H & Wasterlain CG (2000). Granule cell neurogenesis after status epilepticus in the immature rat brain. **Epilepsia** **41**, S53-S56.
- Santhakumar V, Aradi I & Soltesz I (2005). Role of mossy fiber sprouting and mossy cell loss in hyperexcitability: a network model of the dentate gyrus incorporating cell types and axonal topography. **Journal of Neurophysiology** **93**, 437-453.
- Sapolsky RM, Krey LC & Mcewen BS (1985). Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number - implications for aging. **Journal of Neuroscience** **5**, 1222-1227.
- Schmitz C & Hof PR (2005). Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience** **130**, 813-831.

- Scott BW, Wang S, Burnham WM, De Boni U, Wojtowicz JM (1998). Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. **Neuroscience Letters** **248**, 73-76.
- Scoville WB (1954). The limbic lobe in man. **Journal of Neurosurgery** **11**, 64-66.
- Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D & Baulac M (1998). Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? **Neurology** **51**, 1256-1262.
- Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, Rao SS & Weiss JH (1999). Preferential Zn<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA/kainate triggers prolonged mitochondrial superoxide production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **96**, 2414-2419.
- Seress L (1992). Morphological variability and developmental aspects of monkey and human granule cells - differences between the rodent and primate dentate gyrus. **Epilepsy Research (Suppl. 7)**, 3-28.
- Seress L & Frotscher M (1990). Morphological variability is a characteristic feature of granule cells in the primate fascia-dentata - a combined golgi electron-microscope study. **Journal of Comparative Neurology** **293**, 253-267.
- Seress L & Mrzljak L (1987). Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations. **Brain Research** **405**, 169-174.
- Shapiro LA, Korn MJ & Ribak CE (2005). Newly generated dentate granule cells from epileptic rats exhibit elongated hilar basal dendrites that align along GFAP-immunolabeled processes. **Neuroscience** **136**, 823-831.
- Shepherd GM (2003). **The synaptic organization of the brain**. 5<sup>th</sup> ed, Oxford University Press, EUA.
- Sholl DA (1953). dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. **Journal of Anatomy** **87**, 387-406.

- Sloviter RS, Zappone CA, Harvey BD, Bumanglag AV, Bender RA & Frotscher M (2003). "Dormant basket cell" hypothesis revisited: Relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory Interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. **Journal of Comparative Neurology** **459**, 44-76.
- Sloviter RS (1991). Permanently altered hippocampal structure, excitability and inhibition after experimental status epilepticus in the rat; the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. **Hippocampus** **1**, 41-66.
- Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL & Martin DL (1996). Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. **Journal of Comparative Neurology** **373**, 593-618.
- Spigelman I, Yan XX, Obenaus A, Lee EYS, Wasterlain CG & Ribak CE (1998). Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience** **86**, 109-120.
- Storm JF (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. **Progress in Brain Research** **83**, 161-187.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I & Ramirez L (1989). Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal-lobe. **Annals of Neurology** **26**, 321-330.
- Sutula T, He XX, Cavazos J & Scott G (1988). Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional-activity. **Science** **239**, 1147-1150.
- Tashiro A, Makino H & Gage FH (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. **Journal of Neuroscience** **27**, 3252-3259.

- Tauck DL & Nadler JV (1985). evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal-formation of kainic acid-treated rats. **Journal of Neuroscience** **5**, 1016-1022.
- Timm F (1958). Zur histochemie der schwermetalle, das sulfid-silber-verfahren. **Dtsche Z Gesamte Gerichtl Med**, **46**: 706-711.
- Tongiorgi E, Armellin M, Giulianini PG, Bregola G, Zucchini S, Paradiso B, Steward O, Cattaneo A, & Simonato M (2004). Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. **Journal of Neuroscience** **24**, 6842-6852.
- Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1989). Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel model of intractable epilepsy. **Synapse** **3**, 154–171.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z & Turski L (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioral Brain Research** **9**, 315-335.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD & Gage FH (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature** **415**, 1030-1034.
- van Praag H, Kempermann G & Gage FH (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience** **2**, 266-270.
- Watanabe Y, Gould E & McEwen BS (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal ca3 pyramidal neurons. **Brain Research** **588**, 341-345.
- Weiss JH & Sensi SL (2000). Ca<sup>2+</sup>-Zn<sup>2+</sup> permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. **Trends in Neurosciences** **23**, 365-371.

- Wenzel HJ, Woolley CS, Robbins CA & Schwartzkroin PA (2000). Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. **Hippocampus** **10**, 244-260.
- Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, Schwartzkroin PA & Palmiter RD (1997). Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **94**, 12676-12681.
- West MJ, Slomianka L & Gundersen HJG (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anatomical Record** **231**, 482-497.
- Williams PA, Wuarin JP, Dou P, Ferraro DJ & Dudek FE (2002). Reassessment of the effects of cycloheximide on mossy fiber sprouting and epileptogenesis in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neurophysiology** **88**, 2075-2087.
- Wilson MA & McNaughton BL (1993). Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. **Science** **261**, 1055-1058.
- Witter MP, Naber PA, van Haeften T, Machielsen WCM, Rombouts SARB, Barkhof F, Scheltens P & da Silva FHL (2000). Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. **Hippocampus** **10**, 398-410.
- Wu M, Shanabrough M, Leranth C & Alreja M (2000). Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. **Journal of Neuroscience** **20**, 3900-3908.
- Wuarin JP & Dudek FE (1996). Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. **Journal of Neuroscience** **16**, 4438-4448.
- Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL & Squire LR (1999). **Fundamental Neuroscience**. San Diego, Academic Press.

## ANEXO A

## ANEXO B

## ANEXO C

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)