

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ANDRÉ LUIZ DO NASCIMENTO

**Avaliação temporal de neurônios Fluoro-Jade B
positivos na formação hipocampal de
camundongos após indução do *status epilepticus*
por pilocarpina**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Francesco Langone

2004

Data da Defesa: 30/11/2004

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francesco Langone (orientador)

Profa. Dra. Margareth Rose Priel

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Dedico este trabalho

Aos meus queridos pais Teles e Agnalda,
ao meu querido irmão Júnior,
aos meus queridos sogros Dejalma e Celeste,
e à minha amada esposa Josi.

Disse Jesus Cristo: “Onde estiver o seu tesouro, aí estará seu coração”.
Os tesouros da minha existência são Deus, minha família e eu. É o Amor que tenho pelos
meus tesouros que me dá a fortaleza interior de vencer todos os desafios da vida.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Francesco Langone, meu orientador, a oportunidade de realização deste trabalho. Foi uma honra ter sido orientando do Prof. Dr. Francesco Langone, e dele ter recebido exemplos de profissionalismo e competência. Ao chegar no seu Laboratório de Neurobiologia, recebi dele a incumbência e a honra de implantar o Modelo de Epilepsia induzido por Pilocarpina em Camundongos. É com grande satisfação e sentimento de dever cumprido, que vejo que implantei este Modelo, e esta tese se constitui numa excelente referência para o estudo do mesmo.

Agradeço à Profa. Dra. Neide Ferreira dos Santos e à Profa. Dra. Margareth Rose Priel pela amizade e pela prontidão em me ensinar o Modelo de Epilepsia induzido por Pilocarpina em Camundongos. É graças ao meu trabalho e aos ensinamentos da Profa. Dra. Neide Ferreira dos Santos, Profa. Dra. Margareth Rose Priel e ao meu orientador Prof. Dr. Francesco Langone que este Modelo de Epilepsia é uma realidade no Laboratório de Neurobiologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Agradeço ao Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro pela sua solicitude em auxiliar quando fosse preciso. Tenho pelo Dr. Esper grande respeito e admiração.

Agradeço à Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito pelo exemplo demonstrado de competência e por defender o curso noturno de Ciências Biológicas da UNICAMP, bem como enaltecer as qualidades profissionais para a pesquisa e o ensino, dos alunos graduados neste curso desta instituição, no qual sou formado.

Sou grato também à Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, à Profa. Dra. Maria Cristina C. G. Marcondes e ao Prof. Dr. Antônio Ari Gonçalves pelas valiosas sugestões no meu exame de qualificação.

Agradeço aos colegas de laboratório Cláudia, Cristiane, Lucas, Aníbal, Carlos, Carol, Alexandre, Rafael, Débora, Fábio, César, Gustavo, Fernanda Pelágio e Fernanda Hussein pela boa convivência.

Agradeço aos funcionários e aos demais colegas da pós-graduação e professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP pela boa convivência.

Expresso também minha gratidão aos funcionários do Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/MA, Campinas): Sr. José Guedes Deak, Dra. Ângela Maciel, Sullivan, Paulinho, Israel e Antônio Carlos, pela solicitude e atenção demonstradas todas as vezes que solicitei e busquei os animais que utilizei nos meus experimentos.

Agradeço aos técnicos de laboratório Martha M. Almeida, Maria I. Petraviere, Dona Geralda, Lea, Washington, à bióloga Marta B. Leonardo e ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada pelas valiosas dicas com relação ao processamento histológico do material da minha tese.

Expresso minha gratidão ao estatístico Eduardo, pelo auxílio nas análises estatísticas deste projeto e pela atenção que dele recebi.

Agradeço ao meu padrasto Teles e a minha mãe Agnalda por todos os ensinamentos que me deram. Desde o primeiro momento que conheci o meu padrasto, dele recebi e senti o afeto e a atenção paterna, tendo eu aprendido muita coisa com ele. À minha querida mãe expresso minha grande gratidão por tudo que ela fez e tem feito por mim. Obrigado a minha querida mãe por ter fornecido para mim uma educação do primário à sétima série do antigo primeiro grau, em um colégio particular de alto nível quando morávamos nós três: eu, meu irmão e ela em Maceió-AL. Isto exigiu que ela empregasse oitenta por cento do seu salário para custear a nossa escola, e ela sabendo o valor da formação educacional de seus filhos nos manteve neste excelente colégio. Todo o meu sucesso profissional e acadêmico encontra-se ligado à esta formação educacional inicial, que ela proporcionou para mim, pois esta formação me deu as bases para o meu desenvolvimento profissional e acadêmico. Obrigado também à minha mãe, por ensinar-me as lições de Jesus Cristo, nosso grande Irmão, e por sempre convivermos em um ambiente com Deus sempre presente.

Agradeço ao meu querido irmão Júnior que sempre me tratou com respeito e puro sentimento de fraternidade torcendo sempre por mim. Tenho por ele grande admiração e respeito.

Agradeço ao meu pai consangüíneo Luiz Roberto, falecido em 1992, por ter me dado juntamente com minha mãe a oportunidade de vir a este mundo, juntamente com o carinho

que sempre teve comigo enquanto estivemos juntos. Seu olhar carinhoso e cheio amor nos seus últimos dias de vida jamais será esquecido por mim e sei que onde ele está, ele torce por mim.

Agradeço aos meus sogros Dejalma e Celeste pelo apoio e conselhos que me deram durante este período de realização do meu mestrado. Nossas conversas sempre foram uma grande alegria, onde eu sempre saía revigorado nas minhas energias e na minha fé.

Sou especialmente grato à minha amada esposa Josi, grande amiga e companheira que, dia após dia, me apoiou nas minhas decisões e sempre me incentivou para que eu realizasse os meus sonhos. Agradeço pelo Amor que minha esposa tem por mim, pelo seu carinho, amizade e compreensão, ao longo da minha trajetória.

Agradeço a todos os outros amigos e amigas que também torceram e torcem pelas minhas vitórias.

Por fim, agradeço a Deus pela Sua presença e proteção em todos os momentos do meu caminho ao longo da realização de todas as atividades relacionadas ao meu mestrado.

Agradecimentos Institucionais

Sou grato à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço ao Laboratório Regional de Apoio Animal - **LARA/MA**, Campinas, pelo fornecimento dos camundongos utilizados no meu projeto de mestrado.

Agradeço à Sub-Comissão de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular - **SCPG-BFM**, da UNICAMP por garantir que a finalidade deste curso seja atingida, que é desenvolver e aprofundar os estudos feitos na Graduação, a fim de habilitar em suas áreas, profissionais de nível superior para desenvolver atividades de pesquisa e docência em Bioquímica e em Fisiologia.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia – **DFB-IB** da UNICAMP por me disponibilizar a infraestrutura dos espaços físicos (laboratórios e biotério), bem como os equipamentos para a realização do meu projeto de mestrado.

Sumário

| | |
|--|------|
| Símbolos, siglas e abreviaturas | xi |
| Resumo | xiii |
| Abstract | xv |
| | |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Histórico da epilepsia..... | 1 |
| 1.2. Epilepsia – conceito e características gerais..... | 2 |
| 1.3. Modelo de epilepsia induzido por pilocarpina..... | 4 |
| 1.4. Anatomia da formação hipocampal do camundongo..... | 6 |
| 1.5. Fisiologia da formação hipocampal do camundongo..... | 7 |
| 1.5.1. Acetilcolina e circuitos colinérgicos..... | 8 |
| 1.5.2. Glutamato e circuitos glutamatérgicos..... | 8 |
| 1.5.3. GABA e circuitos GABAérgicos..... | 9 |
| 1.6. Morte celular..... | 10 |
| 1.6.1. Necrose..... | 10 |
| 1.6.2. Apoptose..... | 11 |
| 1.7. Detecção de dano neuronal por diferentes técnicas histológicas..... | 14 |
| 1.8. Estruturas coradas pelo violeta de cresila..... | 16 |
| 1.9. Moléculas marcadas pelo Fluoro-Jade B..... | 17 |
| 2.0. Técnicas histológicas para a detecção de dano neuronal utilizadas nesta tese..... | 17 |
| | |
| 2. Objetivo | 19 |
| | |
| 3. Material e Métodos | 20 |
| 3.1. Animais e grupos experimentais..... | 20 |
| 3.2. Indução do <i>status epilepticus</i> | 20 |
| 3.3. Monitoramento comportamental..... | 21 |
| 3.4. Análise histológica e quantitativa..... | 21 |
| 3.4.1. Perfusão e obtenção dos cortes histológicos..... | 21 |
| 3.4.2. Coloração de Nissl com violeta de cresila e avaliação da perda neuronal.. | 22 |
| 3.4.3. Fluoro-Jade B..... | 23 |
| 3.5. Testes estatísticos..... | 24 |
| | |
| 4. Resultados | 25 |
| 4.1. Alterações comportamentais..... | 25 |
| 4.2. Análise histológica..... | 25 |
| 4.2.1. Coloração de Nissl e avaliação da perda neuronal..... | 25 |
| 4.2.1.1. Camada granular do giro denteado..... | 25 |
| 4.2.1.2. Hilo do giro denteado..... | 26 |
| 4.2.1.3. Camada piramidal de CA3 hipocampal..... | 26 |
| 4.2.1.4. Camada piramidal de CA1 hipocampal..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.2. Fluoro-Jade B..... | 31 |
| 4.2.2.1. Camada granular do giro denteado..... | 31 |
| 4.2.2.2. Hilo do giro denteado..... | 33 |
| 4.2.2.3. Camada piramidal de CA3 hipocampal..... | 35 |
| 4.2.2.4. Camada piramidal de CA1 hipocampal..... | 37 |
| 5. Discussão..... | 39 |
| 5.1. Avaliação dos resultados comportamentais e padronização da duração do <i>status epilepticus</i> | 39 |
| 5.2. Perda neuronal e excitotoxicidade..... | 40 |
| 5.3. Excitotoxicidade e conteúdos intracelulares de proteínas ligantes de cálcio na formação hipocampal..... | 40 |
| 5.4. Progressão do dano neuronal na formação hipocampal de camundongos após SE induzido pela pilocarpina..... | 43 |
| 5.5. Relação entre a(s) molécula(s) envolvida(s) em processos neurodegenerativos com a(s) sua(s) expressão(ões) em neurônios FJB+ na camada polimórfica do giro denteado..... | 46 |
| 5.6. Putrescina como forte candidata a ser uma das moléculas marcadas com Fluoro-Jade B e mecanismo neuroprotetor associado a esta poliamina no Modelo de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina em Camundongos..... | 47 |
| 5.7. Necrose versus apoptose..... | 50 |
| 5.8. Implicações clínicas dos resultados desta tese..... | 51 |
| 6. Conclusões..... | 53 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 55 |

Símbolos, siglas e abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| Ach | Acetilcolina |
| AMPA | D-L- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalona-propionato |
| CA1 | Região CA1 do hipocampo |
| CA2 | Região CA2 do hipocampo |
| CA3 | Região CA3 do hipocampo |
| CCTIL | Comission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy |
| DG | Camada granular do giro denteado |
| EC | Córtex Entorrinal |
| ELT | Epilepsia do Lobo Temporal |
| EMT | Esclerose Mesial Temporal |
| FJB+ | Fluoro-Jade B positivos |
| GAD | Ácido glutâmico descarboxilase |
| H | Camada polimórfica do giro denteado ou Hilo do giro denteado |
| M | Camada molecular do giro denteado |
| MEIPC | Modelo de Epilepsia Induzida pela Pilocarpina |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| pp | Fibras da via perfurante |
| s.l-m. | stratum lacunosum-moleculare do hipocampo |

| | |
|-------------|---|
| s.p. | stratum piramidale do hipocampo |
| s.r. | stratum radiatum do hipocampo |
| sc | Via colateral de Schaffer |
| SE | <i>Status Epilepticus</i> |
| SEP | <i>Status Epilepticus</i> induzido pela pilocarpina |
| SUB | Subículo |
| WHO | World Health Organization |

Resumo

Status epilepticus induzido pela pilocarpina (SEP) em roedores promove alterações neuropatológicas que levam à epileptogênese. No Modelo de Indução de Epilepsia pela Pilocarpina em camundongos, os efeitos do SEP têm sido menos estudados em camundongos do que em ratos. Nós analisamos o modelo temporal de injúria neuronal na formação hipocampal de camundongos depois do início do SEP utilizando Fluoro-Jade B e coloração de Nissl. Sessenta camundongos Swiss machos (30-45 g) foram utilizados. Metilnitrato de escopolamina (1 mg/Kg s.c.) foi administrado 30 minutos antes da pilocarpina. *Status epilepticus* (SE) foi induzido pelo hidrocloreto de pilocarpina (340 mg/Kg i.p.). Os grupos controles receberam doses equivalentes de NaCl 0,9 % no lugar do metilnitrato de escopolamina e da pilocarpina. A evolução do dano neuronal foi medida 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, uma semana e três semanas após o início do SE. Os animais que exibiram crises convulsivas ininterruptas durante três horas desde o início do SE foram incluídos no grupo 3 horas. Nos outros grupos, somente foram incluídos camundongos que tiveram SE ininterrupto por no mínimo 6 horas. Fluoro-Jade B foi utilizado como um marcador específico para degeneração neuronal. Seções adjacentes foram coradas com violeta de cresila para determinar a distribuição das seções no eixo rostro-caudal e para a avaliação da perda neuronal das mesmas regiões avaliadas pelo uso de Fluoro-Jade B. A contagem de neurônios Fluoro-Jade B positivos (FJB+) foi realizada nas camadas piramidais CA1 e CA3 hipocampais e no hilo e camada granular do giro denteado. Os mais altos valores de neurônios FJB+ nas regiões CA1 e CA3 foram encontrados no grupo 1 semana após o início do SE quando comparado com todos os outros grupos, mostrando diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo 3 h após o início do SE e grupos 3 h e 6 horas após o início do SE, respectivamente. No hilo do giro denteado, o número de neurônios FJB+ encontrado foi significativamente maior no grupo 12 h após o início do SE quando comparado aos grupos 3 h e 3 semanas após o início do SE. Na camada granular do giro denteado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com SE induzido. Os animais controle não apresentaram marcação para Fluoro-Jade B nos neurônios das mesmas regiões avaliadas. A perda neuronal avaliada pelo violeta de cresila

foi realizada, utilizando uma escala em escores de 0 a 4 com intervalos decrescentes de 25 %, comparando-se o número de neurônios saudáveis nos grupos experimentais em relação aos seus respectivos controles. Os mais altos escores alcançados nas regiões CA1 e CA3 foram nos grupos 1 semana após o início do SE, mostrando escores 1 e 4, respectivamente. No hilo do giro denteado, todos os grupos experimentais apresentaram escore 4. Na camada granular do giro denteado, todos os grupos experimentais apresentaram escore 1, com exceção dos grupos 3 h e 12 horas após o início do SE, com escores 0 e 0,5 respectivamente. No presente modelo, a progressão temporal da morte neuronal, evidenciada pela contagem de neurônios Fluoro-Jade B positivos, é similar à observada em ratos. Além disso, nossos dados confirmam o fato de que os neurônios do hilo são mais suscetíveis à injúria excitotóxica produzida pelo SEP. Nossos resultados também reforçam a hipótese de que a propagação da crise convulsiva no SEP requer a ativação do sistema glutamatérgico. Em conclusão, este trabalho provê evidências de que o Modelo de Indução de Epilepsia pela Pilocarpina em camundongos é um modelo confiável e reproduzível para o estudo de eventos fisiopatológicos relacionados à epilepsia do lobo temporal.

Abstract

Pilocarpine-induced *status epilepticus* (PSE) in rodents promotes neuropathological alterations that lead to epileptogenesis. In the Pilocarpine Model of Epilepsy, the effects of PSE have been less studied in mice than in rats. We analyzed the temporal pattern of neuronal injury in the hippocampal formation of mice after the onset of PSE using Fluoro-Jade B and Nissl stain. Sixty adult male Swiss mice (30-45 g) were used. Scopolamine methylnitrate (1 mg/Kg s.c.) was administered 30 min prior to pilocarpine. *Status epilepticus* (SE) was induced by pilocarpine hydrochloride (340 mg/Kg i.p.). Controls groups received equivalent doses of NaCl 0.9 % instead of scopolamine methylnitrate and pilocarpine. The evolution of neuronal damage was quantified at 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, one week and three weeks after the onset of the SE. Animals that exhibited uninterrupted seizures during 3 h from the onset of SE were included in the first time point group. In the other groups, only mice that had uninterrupted SE for at least 6 hours were included. Fluoro-Jade B was used as a specific marker for neuronal degeneration. Adjacent sections were stained with cresyl violet for determine the distribution of the sections within the rostro-caudal axis and for assessment of the neuronal loss of the same regions evaluated by using of Fluoro-Jade B. Fluoro-Jade B positive (FJB+) neurons count was performed in the CA1 and CA3 pyramidal cell layers and in the dentate gyrus (hilus and granular cell layer). The highest numbers of FJB+ neurons in CA1 and CA3 regions were found at 1 week after SE onset when compared with all the other times, showing differences statistically significant with regard to the group 3 h after onset of SE and to groups 3 h and 6 h after SE onset, respectively. In the hilus of the dentate gyrus, FJB+ neurons were found significantly higher 12 h after SE onset when compared to the 3 h and 3 weeks groups. In the granular cell layer of the dentate gyrus, there was no difference statistically significant between all SE groups. Control animals did not show Fluoro-Jade B staining in neurons of the same regions studied. The neuronal loss assessed by cresyl violet was scored on a 0-4 scale, by estimating in 25 % increments the number of healthy neurons remaining relative to control. The highest scores reached at the in CA1 and CA3 regions were at the groups 1 week, showing scores 1 and 4, respectively. In the hilus of the dentate gyrus, all the time

points presented score 4. In the granular cell layer of the dentate gyrus all the groups show score 1, with the exception of the groups 3 h and 12 h after SE onset, with scores 0 and 0.5, respectively. In the present model, the time course of neuronal death evidenced by Fluoro-Jade B based count is similar to that observed in rats. Moreover, our data confirm the fact that neurons of the hilus are more susceptible to the excitotoxic injury produced by the PSE. Our results also reinforce the hypothesis that the spread of seizure in the PSE require activation of glutamatergic system. In conclusion, this work provides evidences that the Pilocarpine Model of Epilepsy in Mice is a reliable and reproducible model to study the physiopathological events underlying temporal lobe epilepsy.

1. Introdução

1.1. Histórico da epilepsia

A palavra “epilepsia” foi criada pelos gregos para significar algo que pudesse assaltar, tomar de surpresa (derivado de epilambanein; epi + lambanein + ia), algo que vindo de fora atacasse subitamente, originando assim o termo “ataque epiléptico” (JÚNIOR et al., 1998).

A história da epilepsia como entidade clínica começou com Hipócrates (460-357 a.C.), o primeiro a tentar explicar suas causas e mecanismos (cerca de 400 a.C.). Hipócrates escreveu: “os homens deveriam saber que de nenhum outro lugar senão do cérebro vêm as alegrias, delícias, risos e divertimento, tristezas, afeições, desespero e lamentações. E através dele, de maneira especial, adquirimos sabedoria e conhecimento, vemos e ouvimos, sabemos o que é certo ou errado, o que é bom ou mau, o que é doce e o que é insípido... E pelo mesmo órgão tornamo-nos loucos e delirantes, medos e temores nos assaltam, alguns à noite, outros durante o dia, sonhos e inoportunos transvios, preocupações inadequadas, ignorância das circunstâncias, desabituação e inabilidade. Todas essas coisas nós sofremos através do cérebro, quando ele não é sadio...” (apud JÚNIOR et al., 1998). Para Hipócrates, a epilepsia era uma desordem do cérebro. Ele recomendou tratamentos físicos e afirmou que se a doença se tornasse crônica, ela seria incurável (WHO, 2001).

Galeno (129-199 d.C), considerado o pai da fisiologia experimental, também reconheceu o cérebro como a sede das epilepsias, dividindo-as em três grupos: “idiopáticas” àquelas em que a causa é uma discrasia dos humores do cérebro ocasionada pelo frio; um segundo grupo denominado epilepsia “simpática” o qual o cérebro seria estimulado por substâncias irritantes originadas do corpo, e a convulsão deste evento seria o esforço do cérebro para repelir o irritante, e um terceiro grupo chamado “focal” onde um humor patológico se formaria na extremidade e se estenderia para a cabeça (JÚNIOR et al., 1998).

Durante dois mil anos os autores médicos repetiram, com pequenas diferenças, as idéias de Hipócrates e Galeno, apenas comentando-as, interpretando-as e raramente

trazendo uma nova contribuição, imputando três causas para as epilepsias: forças sobrenaturais, flegmas ou humores e substâncias tóxicas ou irritantes (JÚNIOR et al., 1998).

Em 1617, Vicentius Alsárius afirmou: “enquanto alteração cerebral, a epilepsia é uma doença, mas se considerada apenas quanto à convulsão, ela é um sintoma” (JÚNIOR et al., 1998).

Em 1870, Jackson escreveu: “A convulsão é carga ocasional, excessiva e desordenada do tecido nervoso sobre os músculos”. Esse grande neurologista foi também o fundador da moderna era do estudo das epilepsias. Para ele, o estudo das epilepsias focais tornou-se o ponto de partida para a compreensão de todos os tipos de epilepsias, e o conhecimento das mesmas tornou-se também a base para os estudos sobre a localização das funções do sistema nervoso central (JÚNIOR et al., 1998).

As demonstrações experimentais clássicas da localização de funções no córtex cerebral foram feitas por Fritsch e Hitzig em 1879, por Ferrier em 1873 e por Luciani em 1878, que obtiveram respostas motoras no hemicorpo contralateral de animais através de estimulação elétrica de áreas corticais específicas da zona motora. Em seguida, obtiveram crises motoras, através de estimulação mais intensa, as quais progrediam para um ataque generalizado. Esses experimentos trouxeram a confirmação das teorias de Jackson e introduziram importantes modificações nas concepções neurofisiológicas a respeito das funções cerebrais (JÚNIOR et al., 1998).

1.2. Epilepsia – conceito e características gerais

A epilepsia não é uma doença específica, ou mesmo uma única síndrome. Ela se constitui em um grupo de doenças que têm em comum crises epiléticas que ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril. Tais crises são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo (crises focais) ou de área mais extensa envolvendo simultaneamente os dois hemisférios do cérebro (crises generalizadas). Os sintomas das crises dependem de quais regiões cerebrais estão envolvidas. A crise epilética é causada por descargas elétricas anormais excessivas e

transitórias das células nervosas, como resultado de correntes elétricas que são fruto da movimentação iônica através da membrana celular (GUERREIRO et al., 2000).

A classificação das epilepsias e síndromes epiléticas baseia-se nas semelhanças no tipo de crise, idade de início, sinais clínicos associados, histórico familiar, achados neurológicos e prognóstico. Assim, são descritos no mínimo dezoito tipos diferentes de epilepsias e síndromes epiléticas, que constam do quadro de classificação internacional (CCTIL, 1989). Destaque-se que nos últimos anos, graças a melhor caracterização clínico-vídeo-eletrencefalográfica e ao conhecimento da história natural de muitas formas clínicas, a identificação de síndromes e subsíndromes como as epilepsias de lobo temporal (ELT), frontal, parietal e occipital se tornaram possíveis (GUERREIRO et al., 2000).

A ELT possui alta prevalência e, embora na maioria dos casos se inicie na infância, pode manifestar-se em qualquer idade, sendo relativamente resistente ao tratamento medicamentoso. Aproximadamente 50% dos adultos epiléticos apresentam ELT e o controle completo das crises com tratamento clínico ocorre em menos da metade desses pacientes. Manifesta-se, geralmente, por crises parciais simples e complexas recorrentes, sendo pouco frequentes as crises com generalização secundária (crises tônico-clônicas). A forma mais comum de ELT é aquela cujos principais sintomas são gerados predominantemente pelo acometimento de estruturas mesiais do lobo temporal. Histórico familiar de epilepsia e antecedente de convulsão febril prolongada na infância são relativamente frequentes nos pacientes com ELT. É comum existir um período “silencioso” ou de fácil controle entre o início das manifestações e o período de crises frequentes ou refratárias à medicação (ENGEL, 1989; GUERREIRO et al., 2000).

Com relação às características clínicas das crises epiléticas mesiais do lobo temporal, a aura geralmente está presente e costuma durar vários segundos, sendo a epigástrica a mais comum, ocorrendo com outros sintomas autonômicos ou psíquicos, incluindo emoção (por exemplo, o medo). Podem ocorrer sensações olfatórias ou gustativas. As crises parciais complexas geralmente iniciam-se com parada de atividade e olhar fixo; automatismos oroalimentares e complexos são comuns. Postura anormal de um membro superior pode ocorrer contralateral à descarga ictal. A crise dura geralmente de 1 a 2 minutos. A fase pós-ictal inclui desorientação, déficit de memória recente, amnésia do evento, e afasia se as

crises começam no hemisfério dominante. Essa fase pode durar vários minutos (ENGEL, 1993; GUERREIRO et al., 2000).

A ELT associada à esclerose mesial temporal (EMT) se constitui na síndrome epiléptica estudada com mais detalhes tanto no aspecto clínico quanto no experimental. A importância clínica da ELT deve-se ao fato de sua alta prevalência e elevada proporção de pacientes que não respondem aos diferentes esquemas terapêuticos, e que têm um bom prognóstico com o tratamento cirúrgico, com 80% a 90% de probabilidade de controle de crises. A maior parte dos pacientes com ELT apresenta sinais indicativos de EMT apesar da existência de casos cuja ressonância magnética se encontra normal. A EMT é caracterizada por esclerose hipocampal associada a um grau variável de gliose e perda neuronal na amígdala, uncus e giro parahipocampal (GLOOR, 1991; MEENCKE e VEITH, 1991; CENDES e KOBAYASHI, 2000). A esclerose hipocampal consiste na redução da densidade neuronal com um padrão característico, predominantemente envolvendo a região dos setores CA4, CA1, CA3 e giro denteado, com relativa preservação do setor CA2 (BABB e BROWN, 1987; GLOOR, 1991; MEENCKE e VEITH, 1991; CENDES e KOBAYASHI, 2000).

1.3. Modelo de epilepsia induzido por pilocarpina

Os modelos experimentais de epilepsia têm propiciado um melhor entendimento da fisiopatologia das epilepsias. Os modelos que reproduzem a ELT humana fornecem diversos dados comportamentais, eletrencefalográficos, assim como apontam a presença de lesões hipocampais compatíveis com a EMT em humanos (LOTHMAN et al., 1995; AVANZINI e FARIELLO, 1997; ENGEL, 1996; ISOKAWA, 1997; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000). Muitos modelos de ELT apresentam como denominador comum a indução de uma condição inicial de *status epilepticus* (SE). O insulto excitotóxico secundário à hiperatividade neuronal induzida por um tempo prolongado, além de provocar morte de neurônios em áreas susceptíveis, induz uma cascata de eventos moleculares e estruturais que levam a modificações nas propriedades intrínsecas neuronais, bem como das redes neuronais, tornando-as epileptogênicas. Nesses modelos, o tempo de latência até a

aparição da primeira crise epiléptica espontânea é denominado de período silencioso (SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

O modelo induzido pela administração da pilocarpina (agonista colinérgico muscarínico) em ratos e camundongos reproduz com grande fidelidade a ELT humana (CAVALHEIRO, 1995; CAVALHEIRO et al., 1996). Após um pré-tratamento com metilescopolamina para diminuição dos efeitos colinérgicos periféricos, uma injeção intraperitoneal de 300-380 mg/kg de pilocarpina nesses animais induz uma série de alterações comportamentais e eletrencefalográfica que evolui para um estado de crises contínuas (clônicas) que caracterizam o *status epilepticus* (SE) que pode durar 24 horas (fase aguda). Após o período de SE, os animais não apresentam sintomatologia comportamental convulsiva e a análise do EEG não revela anormalidades. Este período não sintomático, denominado de período silencioso ou fase silenciosa, dura de 4 a 44 dias. Finalmente, com a ocorrência da primeira crise epiléptica espontânea inicia-se a fase crônica, durante a qual esta crise recorre com uma freqüência de 2 a 15 por mês, por toda a vida do animal (CAVALHEIRO, 1995; CAVALHEIRO et al., 1996; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

Acredita-se que o efeito epileptogênico agudo da pilocarpina seja inicialmente decorrente do bloqueio de correntes de potássio, promovido pela ativação de receptores muscarínicos, que leva à facilitação de descargas tipo *burst* pelos neurônios hipocampais (BERNADO e PRINCE, 1981). Secundariamente, este mecanismo pode levar à ativação do sistema glutamatérgico e, conseqüentemente a uma excitotoxicidade no hipocampo e em outras estruturas (CAVALHEIRO, 1995).

Diversos estudos anatomopatológicos desse modelo têm evidenciado importantes alterações do tecido nervoso similares ao que se observa em humanos, sendo que diferentes estruturas neurais são atingidas, tais como hipocampo, complexo amígdaloide, córtex entorrinal e neocórtex (TURSKI et al., 1983a). Tais alterações correspondem a anormalidades dendríticas e axonais, acompanhadas da perda de neurônios e de reação gliótica (CLIFFORD et al., 1987). A perda neuronal é principalmente evidente na região hipocampal CA1 e CA3 e no hilo do giro denteado, embora também ocorra em outras regiões encefálicas (TURSKI et al., 1983a). Outros estudos têm demonstrado a existência de reorganização sináptica no giro denteado. O método de Neo-Timm ajudou a estabelecer

um padrão de brotamento (sprouting) de fibras musgosas nas células granulares do giro denteado (na camada supragranular), assim como dispersão de células granulares (MELLO et al., 1992; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000). Essas observações (morte neuronal, atrofia, gliose e reorganização de fibras axonais) são compatíveis com a esclerose hipocampal (CAVALHEIRO 1995; SANABRIA e CAVALHEIRO 2000).

1.4. Anatomia da formação hipocampal do camundongo

A formação hipocampal consiste do hipocampo, giro denteado e subículo (figura 1). O hipocampo, também denominado de Corno de Amon, é composto por três áreas ou regiões (CA1, CA2 e CA3) e seis camadas: stratum alveus; stratum oriens (s.o.); stratum pyramidale (s.p.), stratum radiatum (s.r.), stratum lacunosum-moleculare (s.l-m.). O hipocampo é constituído principalmente pelas células piramidais, dispostas em conjunto, formando a camada piramidal. Os dendritos destas células encontram-se localizados nas camadas acima e abaixo. Nessas outras camadas há uma presença mínima de neurônios e seus principais constituintes são dendritos, axônios e células gliais. No final da região CA3, no sentido do giro denteado, encontra-se a camada polimórfica do giro denteado, também denominada hilo (SANTOS, 1995; FRANKLIN e PAXINOS, 1997).

O giro denteado é dividido em três camadas. A principal, denominada camada granular (DG), constitui-se por células granulares. Acima desta, encontra-se a camada molecular (M) e abaixo a camada polimórfica do giro denteado ou hilo (H), na qual as células musgosas se constituem dos principais neurônios, cuja zona supragranular é uma zona alvo bem conhecida de seus axônios (SANTOS, 1995; FUJISE et al., 1998).

O subículo (SUB) é formado pela continuação de CA1 em direção ao córtex entorrinal (EC). A fissura hipocampal separa a camada molecular das regiões CA1, CA2 e subículo. Fibras da via perfurante (pp) incidem diretamente sobre as células granulares, neurônios hilares e piramidais (CA3 e CA1). As fibras musgosas (mf), axônios das células granulares da camada granular do giro denteado (MÁTYAS et al., 2004), se projetam para os neurônios de CA3. A via colateral de Schaffer (sc) é formada pela projeção dos neurônios de CA3 para CA1 (SANTOS, 1995).

As terminações dos axônios e colaterais axônicos das células granulares situam-se em três lugares diferentes na formação hipocampal. Os colaterais axônicos terminam dentro dos limites do hilo do giro denteado e para uma menor extensão para dentro ou acima da camada granular do giro denteado. Os axônios principais estendem-se ao hipocampo para inervar a camada piramidal de CA3. O maior e mais claro campo de terminação das fibras musgosas no hipocampo localiza-se acima da camada piramidal e por esta razão, esta região é denominada de zona das fibras musgosas suprapiramidais (SP-MF). Fibras musgosas, as quais seus axônios terminam dentro ou abaixo da camada piramidal, são freqüentemente agrupadas juntas como fibras musgosas intrapiramidais e infrapiramidais (IIP-MF) (SLOMIANKA e DONOVAN, 1996).

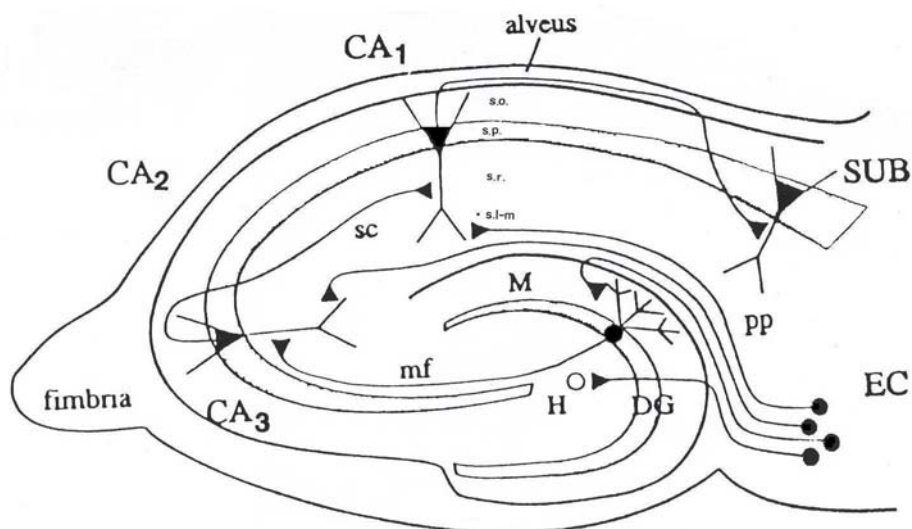


Figura 1. Esquema dos circuitos neuronais da formação hipocampal de camundongo.
Adaptado de Santos (1995).

1.5. Fisiologia da formação hipocampal do camundongo

Para compreender os mecanismos neuropatológicos envolvidos nos processos de injúria neuronal que acometem as regiões cerebrais, no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina em camundongos, é imprescindível conhecer além da anatomia, a fisiologia destas regiões nesta espécie de animal. Uma vez que este trabalho focou estudar especificamente as lesões encontradas na região do hipocampo e do giro denteado, seguem

nos próximos parágrafos uma descrição das circuitarias cerebrais destas regiões em camundongos, incluindo seus principais neurotransmissores e neuromoduladores.

1.5.1. Acetilcolina e circuitos colinérgicos

O neurotransmissor/modulador acetilcolina (ACh) exerce seus efeitos via receptores muscarínicos e nicotínicos que estão amplamente distribuídos no hipocampo (van der ZEE e LUITEN, 1999). A acetilcolina tem mostrado despolarizar a maioria dos neurônios piramidais (COLE e NICOLL, 1984; MADISON et al., 1987; BENSON et al., 1988; AZNAVOUR et al., 2002) e interneurônios GABAérgicos (McQUISTON e MADISON, 1999a; McQUISTON e MADISON, 1999b; JI e DANI, 2000), e modular a liberação de GABA e glutamato (RADCLIFFE e DANI, 1998; RADCLIFFE et al., 1999; ALKONDON et al., 1999).

As inervações colinérgicas hipocampais originam-se principalmente de corpos celulares neuronais localizados no núcleo septal medial e núcleo da borda vertical da banda diagonal de Broca (Mc KINNEY et al., 1983; RYE et al., 1984; AMARAL e KURZ, 1985; NYAKAS et al., 1987; WOOLF, 1991; AZNAVOUR et al., 2002). Um segundo, componente intrínseco, resulta de interneurônios bipolares, ao menos em roedores (HOUSER et al., 1983; FROTSCHER et al., 1986; BLAKER et al., 1988; AZNAVOUR et al., 2002).

Em uma análise comparativa da inervação colinérgica no hipocampo dorsal de camundongos machos C57BL/6 e ratos Sprague-Dawley, as densidades axonais mais altas foram encontradas no stratum lacunosum moleculare de CA3, stratum pyramidale de CA1 e CA3 e stratum moleculare do giro dentado, em ambas as espécies (AZNAVOUR et al., 2002).

1.5.2. Glutamato e circuitos glutamatérgicos

O glutamato é o neurotransmissor da via trissináptica que compreende desde o córtex entorrinal passando pelo giro dentado e CA3 para CA1 e o subículo. Há três famílias de receptores ionotrópicos para glutamato: receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), o qual

intermedia lenta excitação voltagem-dependente e é de maior importância para a potenciação a longo prazo (COLLINGRIDGE e SINGER, 1990; BLISS e COLLINGRIDGE, 1993; ZILLES et al., 2000); receptor D-L- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalona-propionato (AMPA), para excitação rápida; e o receptor cainato, cuja função ainda não é clara em detalhes (BETTLER e MULLE, 1995; LERMA et al., 1997; ZILLES et al., 2000).

Cada tipo de receptor ionotrópico para o glutamato é composto de no mínimo cinco subunidades que formam um canal iônico funcional e a permeabilidade é determinada, em parte, pelas subunidades que formam cada tipo de receptor. Seis subunidades de receptores NMDA (NR1, NR2, NR2B, NR2C, NR2D e NR3A), quatro subunidades de receptores AMPA (GluR1, GluR2, GluR3, e GluR4) e cinco subunidades de receptores cainato (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2) têm sido caracterizadas até o momento (OZAWA et al., 1998; SCHAWHECKER, 2003).

Além dos receptores ionotrópicos para glutamato acima citados, há também três famílias de receptores metabotrópicos para o mesmo, e cada um, com as suas respectivas subunidades: Grupo I (mGlu1, mGlu5), Grupo II (mGlu2 e mGlu3) e Grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) (MELDRUM et al., 1999).

Em um estudo em camundongos C57BL/6J, foi encontrada imunoreatividade positiva para as subunidades 2 e 3 do receptor para glutamato tipo AMPA (GluR2/3) em células musgosas na parte ventral do hilo e em células hilares dorsais (FUJISE et al., 1998).

1.5.3. GABA e circuitos GABAérgicos

O ácido γ -aminobutírico (GABA) atua como neurotransmissor inibitório. Os receptores para GABA são canais de Cl^- ligante-dependentes, mediadores do influxo de Cl^- para os neurônios. Dois tipos principais de receptor para o GABA já foram identificados: os receptores GABA_A e GABA_B . O receptor GABA_A é um canal de Cl^- mediado pelo GABA e o receptor GABA_B não é um canal iônico propriamente dito, mas modula o funcionamento do canal iônico de outra proteína (KUTCHAI, 2000). Conexões GABAérgicas no hipocampo originam-se de ambos neurônios intrínsecos (interneurônios) e extrínsecos (projeções) (FREUND e BUZSÁKI, 1996).

Neurônios contendo o GABA se constituem nos principais neurônios inibitórios no cérebro e são a vasta maioria dos interneurônios na formação hipocampal. Enquanto que os neurônios das camadas piramidais hipocampais são relativamente uniformes, os interneurônios GABAérgicos são caracterizados por sua diversidade nas características morfológicas, químicas e fisiológicas. Neurônios GABAérgicos contêm ácido glutâmico descarboxilase (GAD), a enzima que sintetiza GABA (RIBAK et al., 1978; SERESS e RIBAK, 1983; MUGNAINI e OERTEL, 1985; FUKUDA et al., 1998). Recentes estudos têm mostrado que GAD consiste de duas isoformas: GAD67 e GAD65 (ERLANDER e TOBIN, 1991; MARTIN e RIMVALL, 1993; FUKUDA et al., 1998). Em um trabalho para a avaliação quantitativa para a imunoreatividade para as duas isoformas de GAD em corpos de neurônios GABAérgicos no hipocampo de camundongos machos DDY, foi encontrado que, embora todos os corpos de neurônios apresentavam ambas isoformas, as imunoreatividades apresentaram-se variáveis. Os corpos celulares dos neurônios que apresentaram fraca imunoreatividade para GAD65, mas moderada a intensa imunoreatividade para GAD67 estavam freqüentemente localizados nas camadas piramidais de CA1 e CA3 e foram principalmente neurônios que continham a proteína ligante de cálcio parvalbumina, uma subpopulação particular de neurônios GABAérgicos hipocampais (FUKUDA et al., 1997).

1.6. Morte celular

1.6.1. Necrose

Depois de um episódio severo de isquemia, traumatismo craniano ou epilepsia, é comum encontrar-se morte celular por necrose dentro dos limites do centro da injúria. Além disso, um número substancial de neurônios em torno deste centro morre por vias de morte celular programada (LIOU et al., 2003).

Células que sofrem morte por necrose não mostram as características macroscópicas, ultraestruturais e sinais fisiológicos de apoptose, como compactação do núcleo, clivagem internucleossomal do DNA, enrugamento da membrana plasmática e desintegração celular em múltiplas vesículas (WILLIE et al., 1972; WALKER et al., 1988).

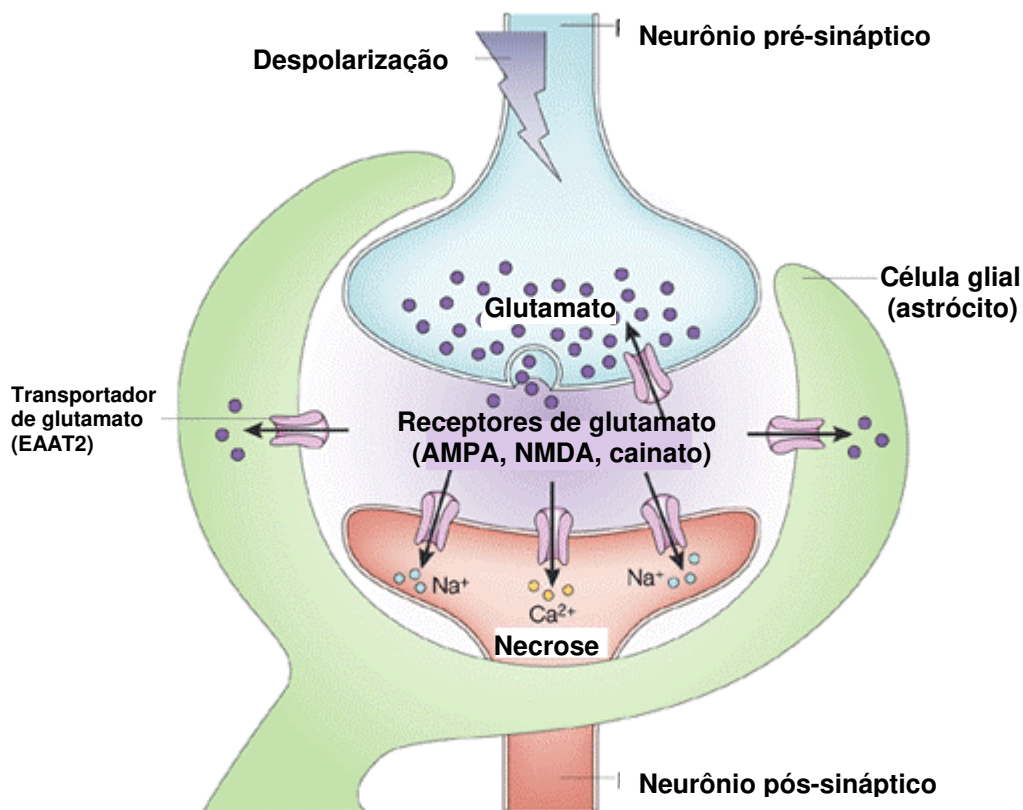
A necrose é caracterizada por dilatação das mitocôndrias e do retículo endoplasmático e por extensa vacuolização do citoplasma (VITALE et al., 1997). Não há amplo enrugamento da membrana plasmática, há desintegração do núcleo, as células incham e lisam sem a formação de vesículas e o conteúdo celular é liberado no espaço intercelular, freqüentemente danificando as células da vizinhança e induzindo respostas inflamatórias (LEIST e JAATELA, 2001; MAJNO e JORIS, 1995).

Quando não há energia necessária para manter os gradientes iônicos, o potencial de membrana dos neurônios entra em colapso. A despolarização decorrente resulta na liberação de uma quantidade maciça do neurotransmissor excitatório glutamato nas fendas sinápticas (KAUPPINEN et al., 1988a; KAUPPINEN et al., 1988b). A deficiência energética também prejudica a recaptura do glutamato por transportadores de alta afinidade das proximidades das células gliais e neurônios. O aumento excessivo de glutamato nas sinapses induz hiperexcitação e, finalmente, a morte por necrose destes neurônios hiperexcitados, fenômeno este conhecido como excitotoxicidade (MARTIN et al., 1998; CHOI, 1992) (Quadro 1). Durante episódios convulsivos, prolongada hiperexcitação de neurônios causam a morte por excitotoxicidade (CHEN et al., 2002; FUJIKAWA et al., 2000a).

1.6.2. Apoptose

O termo apoptose foi introduzido por KEER et al. (1972). A definição original de apoptose foi baseada em critérios morfológicos incluindo encolhimento, condensação, formação de bolhas das membranas citoplasmáticas e nucleares, e brotamento de fragmentos celulares. Apoptose é freqüentemente denominada de morte celular programada. Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, neurônios que morrem por morte celular programada mostram critérios morfológicos de apoptose. As técnicas mais usadas para o estudo da apoptose são *in situ* terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) de DNA fragmentado, algumas vezes em combinação com uma coloração para DNA, em seções de tecido e eletroforese em gel de agarose de DNA fragmentado de amostras de tecido homogeneizadas (BENGZON et al., 2002).

O mecanismo de ativação da morte celular programada pode ser disparado através de



Quadro 1. **Morte celular por excitotoxicidade.** Neurotransmissores excitatórios como o glutamato são liberados de sinapses em despolarização após o advento de um potencial de ação. Esta liberação é um processo controlado e um aumento excessivo de neurotransmissores nas sinapses é prevenido pela ação de transportadores que retiram os neurotransmissores da fenda sináptica. Entretanto, muitas condições deletérias podem convergir para induzir um desenfreada liberação de glutamato nas sinapses, iniciando uma cascata de eventos que levam à morte da célula pós-sináptica (CHOI, 1992). Glutamato se liga em receptores de canais ionotrópicos específicos de neurônios pós-sinápticos (AMPA, ácido propriônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole; NMDA, N-metil-D-aspartato). Abertura destes canais provoca um influxo de íons cálcio para dentro dos limites da célula diretamente (através de receptores de glutamato que conduzem cálcio e sódio) ou indiretamente (através da ativação secundária de canais de cálcio voltagem-dependentes) (FERN e MOLLER, 2000). O severo aumento da concentração de cálcio intracelular é o principal evento sinalizador de morte que está envolvido na necrose e na apoptose. A contribuição de cada tipo de morte para excitotoxicidade correlaciona-se com a severidade e o quão abrupto foi este aumento da concentração de cálcio intracelular (SATTLER e TYMIANSKI, 2000). Alterações mais profundas iniciam a necrose, enquanto que relativamente aumentos moderados preferencialmente induzem a apoptose (MARTIN et al., 1998; MATTSON, 2000).
 Legenda: EAAT2 = Transportador 2 para aminoácido excitatório. Quadro adaptado de SYNTICHAKI e TAVERNARAKIS (2003).

ativação de receptor de membrana, injúria neuronal, ou por dano direto ao DNA (GRAHAN e CHEN, 2001).

A ativação do receptor 6 tipo cainato (GluR6) leva à via sinalizante apoptótica da família c-Jun N-terminal cinase (Jnk) (SAVINAIMEN et al., 2001). Uma outra evidência de que a apoptose induzida por crises convulsivas implicam a participação da família Jnk vem de achados onde crises evocadas por ácido caínico em ratos levaram à ativação de Jnk1 e fosforilação de c-Jun (MIELKE et al., 1999).

Outro receptor candidato a estar envolvido no disparo de degeneração celular após convulsões poderia incluir o receptor para a neurotrofina p75 (p75NTR). Numerosas células TUNEL positivas duplamente marcadas para p75NTR foram encontradas no hipocampo, córtex entorinal e córtex piriforme depois de crises induzidas por pilocarpina, sugerindo que a perda neuronal induzida pela crise dentro dos limites do SNC poderia ocorrer através de cascatas sinalizantes apoptóticas envolvendo o p75NTR (ROUX et al., 1999).

Estresse mitocondrial produzido por prolongada despolarização, estresse oxidativo, e abertura do poro de transição de permeabilidade são poderosos disparadores para a apoptose (REED, 1998). Os genes da família Bcl-2 são determinantes na regulação da permeabilidade mitocondrial. A função de Bcl-2 é bloquear as liberações mitocondriais de citocromo *c* em resposta a estímulos estressores na mitocôndria. Além do gene Bcl-2 anti-apoptótico, esta família consiste de mais de 20 genes incluindo os genes anti-apoptótico Bcl-sl, Bcl-w e o gene pró-apoptótico Bax. Após estímulos de abrasamento na amígdala, a proporção de Bax/Bcl-2 aumentou no hipocampo (ZHANG et al., 1998; BENGZON et al., 2002). Após crises convulsivas, foi detectado em hipocampo de rato, aumento dos níveis de Bcl-w (HENSHALL et al., 2001).

A liberação do citocromo *c* da mitocôndria dispara morte celular por intermédio da ativação de proteinase aspartato-específica cisteinil (caspase). As caspases compreendem uma família de 14 proteases que, em seu estado proteolísado ativo, funcionam como iniciadores e efetores de apoptose. Claras evidências apontam para degeneração neuronal dependente de caspases após crises convulsivas. Em um trabalho com duas linhagens de camundongos, uma sensível e a outra resistente a degeneração neuronal induzida por ácido caínico, os níveis de caspase-3 ativada após as crises induzidas por ácido caínico foram

analisados. Caspase-3, cataliticamente ativa foi detectada 30 h após o ácido caínico na linhagem sensível antes do aparecimento de picnose e da marcação para TUNEL. Esta expressão de caspase-3 ativada continuou até 4 dias após a injeção. A imunoreatividade para caspase-3 não foi detectada na linhagem resistente e não houve evidência de picnose ou marcação para TUNEL (FAHERTY et al., 1999; BENGZON et al., 2002).

1.7. Detecção de dano neuronal por diferentes técnicas histológicas

A detecção de neurônios em degeneração é um passo muito importante para a compreensão dos fenômenos associados aos insultos mecânicos ou provenientes de diversos tipos de eventos patológicos tais como isquemia, hipoglicemia e *status epilepticus*.

Técnicas convencionais, tais como H & E (hematoxilina e eosina) ou Coloração de Nissl (pelo emprego de corantes tais como violeta de cresila ou tionina) possibilitam a inferência do estado de degeneração dos neurônios baseando-se em suas alterações morfológicas tais como encolhimento, vacuolização e hipercromatismo (CHASSAN, 1977; GARCIA e KAMIJIYO, 1974; SIESJO, 1981). Estas mudanças, no entanto, não necessariamente indicam um estado garantido de degeneração neuronal, devido à possibilidade de representarem artefatos de processamento ou estas alterações morfológicas celulares não culminarem em morte celular. Os artefatos de processamento podem resultar em células encolhidas e hipercromáticas (CAMMERMEYER, 1961; STENSAAS et al., 1972). Não somente tais técnicas podem produzir falsos positivos, mas também as interpretações podem falhar na detecção de neurônios em degeneração, uma vez que todas as células coram-se com estes corantes enquanto que as diferenças morfológicas existentes entre neurônios em degeneração e normais são relativamente sutis (SCHMUED, 1997).

Técnicas de supressão de prata apresentam uma vantagem em relação às técnicas acima mencionadas, pois não coram neurônios normais, enquanto neurônios em degeneração são corados em preto (de OLMOS et al., 1994; FINK e HEIMER, 1967; GALLYAS et al., 1980; NAUTA e GYGAX, 1954).

SCHMUED et al. (1997) consideraram o trabalho intensivo requerido e a natureza inconstante destas técnicas de prata como principais obstáculos para seu uso, e propuseram a utilização de um traçador histoquímico, no qual apresentasse simplicidade na realização, confiabilidade, fosse altamente sensível e possuísse fácil interpretação do resultados. Neste

mesmo trabalho, estes autores apresentaram o Fluoro-Jade, descrevendo-o como um composto mais sensível e um marcador definitivo de degeneração neuronal do que H & E ou Coloração de Nissl, e com a mesma sensibilidade, considerável maior simplicidade e maior confiabilidade quando comparado às técnicas de supressão de prata. O exato mecanismo pelo qual Fluoro-Jade cora neurônios em degeneração não é conhecido. Entretanto, algumas inferências podem ser feitas concernentes à especificidade histoquímica de Fluoro-Jade baseadas em suas propriedades químicas. Um neurônio em degeneração presumivelmente expressa uma molécula fortemente básica, uma vez que ele tem uma afinidade para o fortemente ácido Fluoro-Jade, e uma aversão para os corantes básicos usados em contracoloração de Nissl (SCHMUED et al, 1997). Do mesmo modo, uma interação eletrostática seria consistente com as observações (AUER et al., 1984) as quais a fucsina ácida pode servir como uma coloração de corpos neuronais em degeneração em tecido processado com parafina, e também as observações de SCHMUED et al. (1997) as quais vários corantes ácidos podem corar neurônios em degeneração (embora a baixa resolução, altos níveis de “background”, ou rápida perda da coloração limitem as aplicações práticas). Uma propriedade desta suposta "molécula da degeneração" é que ela é resistente à extração de solvente e à forte oxidação por permanganato de potássio. O pré-tratamento com permanganato de potássio não somente suprime o background da coloração, mas também aumenta significativamente o tempo que o fluorocromo leva para perder a sua fluorescência. Entretanto, um obstáculo associado ao procedimento de pré-tratamento pode ocorrer durante estudos de dupla marcação, uma vez que a exposição ao permanganato de potássio pode eliminar ou degradar contracolorações fluorescentes, expressões imunofluorescentes ou fluorocromos transportados axonalmente (SCHMUED et al, 1997).

SCHMUED e HOPKINS (2000) desenvolveram o Fluoro-Jade B, que como o seu predecessor Fluoro-Jade, é um derivado de fluoresceína aniônica útil para a marcação de neurônios que estão sendo submetidos à degeneração. Como o Fluoro-Jade, o Fluoro-Jade B tem a vantagem de ser tão confiável e tecnicamente simples como uma coloração convencional de Nissl e ao mesmo tempo específico para neurônios em degeneração como uma coloração de supressão de prata ideal. Fluoro-Jade B tem, assim

como o Fluoro-Jade, uma afinidade para os neurônios em degeneração incluindo corpo celular, dendritos, axônio e terminais axônicos. Então, em neurônios em degeneração, parece que estes dois corantes compartilham uma afinidade para a mesma(s) biomolécula(s), mas diferem no grau da afinidade (SCHMUED e HOPKINS, 2000). A diferença observada nas respectivas características de suas marcações estaria consistente com a idéia de que Fluoro-Jade B tem uma maior afinidade para componentes de tecido em degeneração do que Fluoro-Jade. Também consistente com este pensamento é a observação de que Fluoro-Jade B é utilizado em menos da metade do que a concentração requerida pelo Fluoro-Jade. A aumentada afinidade específica não somente permite a marcação ser feita mais rápida e com menos fluorocromo, mas, mais importante, ela confere uma mais apurada e maior definição da marcação (SCHMUED e HOPKINS, 2000).

FERNANDES et al. (2004) observaram que Fluoro-Jade, mas não Fluoro-Jade B, marca além de neurônios em degeneração, neurônios em desenvolvimento, o que levou estes autores a recomendarem a utilização de Fluoro-Jade B para a detecção de neurônios em degeneração no lugar de Fluoro-Jade, quando forem realizados estudos durante fases embrionárias e neonatais e também quando ocorre neurogênese no cérebro adulto no sistema nervoso central.

1.8. Estruturas coradas pelo violeta de cresila

O violeta de cresila é um corante básico utilizado para evidenciar o citoplasma e o nucléolo de neurônios (SANTOS, 1995; ONISHI, 1999). O retículo endoplasmático rugoso é muito abundante nas células nervosas e forma agregados de cisternas paralelas, entre as quais ocorrem numerosos polirribosomas livres. Esses conjuntos de cisternas e ribosomas, quando corados pelo violeta de cresila, apresentam-se ao microscópio óptico como manchas basófilas espalhadas pelo citoplasma, os corpúsculos de Nissl (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995a). Os nucléolos são estruturas basófilas, localizadas no interior do núcleo celular, constituídas por cromatina e grandes quantidades de RNA, nas quais ocorrem a síntese de RNAr e a formação dos ribosomas. Os núcleos contêm um ou mais

nucléolos, que podem ter tamanhos variáveis (DE ROBERTIS e DE ROBERTIS JÚNIOR, 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995b).

1.9. Moléculas marcadas pelo Fluoro-Jade B

Segundo SCHMUED e HOPKINS (2000), a exata identidade química de Fluoro-Jade B ainda não é conhecida. A análise cromatográfica revelou a presença de uma banda fluorescente e três bandas moderadamente fluorescentes. Como previamente postulado (SCHMUED et al., 1998), a síntese estequiométrica sugere que o homólogo de fluoro-jade bis-6'-hidroxi-3'-isoxantenona e também o homólogo carboxi abrange ao menos dois componentes de Fluoro-Jade B. Ambos os compostos podem teoricamente existir como dois isômeros, os quais poderiam justificar a presença das outras duas bandas cromatográficas fluorescentes. Estes homólogos são, como Fluoro-Jade, derivados de fluoresceína poli-aniônica. Baseado neste fato, poder-se-ia especular a identidade de alguns dos candidatos bioquímicos moleculares mais prováveis que Fluoro-Jade B poderia ligar-se. Isto incluiria moléculas com múltiplos grupos com cargas positivas tais como as poliaminas. Observações pessoais de SCHMUED e HOPKINS (2000), revelaram que moléculas com uma forte atração eletrostática para Fluoro-Jade B *in vitro* incluem aminopropil-butanodiamina (espermidina), diaminobutano (putrescina) e diaminopentano (cadaverina). Ainda segundo os autores, se Fluoro-Jade B se liga a algumas destas poliaminas em neurônios em degeneração, esta é uma questão a ser resolvida.

2.0. Técnicas histológicas para a detecção de dano neuronal utilizadas nesta tese

Os efeitos do SE induzido pela pilocarpina têm sido menos estudados em camundongos do que em ratos, resultando em uma clara necessidade de informações que permitam maiores avanços no estudo dos processos neurodegenerativos e epileptogênicos utilizando-se o Modelo de Epilepsia induzido pela Pilocarpina em Camundongos. Colaborando para diminuir esta carência de informações, o presente trabalho é dedicado à avaliação da progressão do dano neuronal após o SE induzido pela pilocarpina em

camundongos utilizando-se o composto Fluoro-Jade B como marcador de neurônios em degeneração.

No trabalho desta tese, o Fluoro-Jade B foi utilizado para a avaliação quantitativa da lesão neuronal nas camadas piramidais das regiões CA1 e CA3 do hipocampo dorsal, no hilo e camada granular do giro dentado dorsal dos camundongos. Além do Fluoro-Jade B, o violeta de cresila foi empregado para a avaliação da perda neuronal nestas mesmas regiões em cortes histológicos imediatamente adjacentes aos submetidos à técnica de marcação com Fluoro-Jade B.

2. Objetivo

Avaliar o perfil temporal da progressão do dano neuronal após o SE induzido pela pilocarpina em camundongos. Sendo esta avaliação realizada nas camadas piramidais das regiões CA1 e CA3 do hipocampo dorsal, no hilo e camada granular do giro denteado dorsal com a utilização de violeta de cresila e o composto Fluoro-Jade B.

3. Material e Métodos

3.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, com idade de dez a doze semanas, pesando entre 30 e 45 gramas, fornecidos pelo Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/MA, Campinas). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (21°C), recebendo água e ração *ad libitum*.

Os camundongos foram divididos em 12 grupos (n=5) sendo 6 grupos correspondentes aos diferentes tempos de sacrifício em relação ao início do *status epilepticus* (SE): 3 horas (3 HP), 6 horas (6 HP), 12 horas (12 HP), 24 horas (24 HP), 1 semana (1 SP) e 3 semanas (3 SP). Os outros 6 grupos corresponderam aos controles para cada um dos grupos acima. Os animais dos grupos controle receberam duas doses de solução salina (NaCl 0,9%) em intervalos de tempo iguais aos animais dos grupos experimentais.

3.2. Indução do *status epilepticus*

Para a indução do *status epilepticus* (SE), os camundongos receberam inicialmente metilescopolamina 0,01% na dose de 1 mg/kg (s.c.), visando minimizar os efeitos colinérgicos periféricos da pilocarpina. Após trinta minutos foi administrada pilocarpina 4%, em dose única de 340 mg/kg (i.p.) e monitorada a ocorrência do *status epilepticus* em cada animal. O SE é definido como crises clônicas generalizadas e ininterruptas persistindo por um período mínimo de 30 minutos antes de seu término espontâneo (OLNEY et al., 1983; TURSKI et al., 1983b; CAVALHEIRO et al., 1991; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

3.3. Monitoramento comportamental

Depois da administração das drogas os camundongos foram continuamente observados. Imediatamente após o início do SE eles continuaram a ser monitorados por 3 ou 6 horas, segundo o grupo ao qual pertenciam. Somente animais que apresentaram SE ininterrupto durante 3 horas foram incluídos no grupo 3 HP e durante 6 horas nos demais grupos.

3.4. Análise histológica e quantitativa

3.4.1. Perfusão e obtenção dos cortes histológicos

Ao final do período pré-determinado para o grupo experimental, os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico 3% (0,1 ml/20 g, i.p.), submetidos à toracotomia e perfundidos transcardiacamente com 100 ml de solução heparinizada (0,2 ml/ 500 ml de salina) de cloreto de sódio 0,9%, seguido de 120 ml de solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,40), tendo sido a infusão realizada com auxílio de uma bomba de perfusão (Masterflex). Após esse procedimento, os encéfalos foram mantidos em geladeira dentro dos respectivos crânios, sendo retirados após 24 horas e mergulhados em uma solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,40), onde permaneceram no máximo por 72 horas, até o processamento de inclusão em parafina.

Foram obtidos cortes histológicos (7 μ m) coronais da região do encéfalo entre 0,94 mm e 3,64 mm posterior ao bregma (Franklin e Paxinos, 1997), empregando-se micrótomo Leica (modelo RM2125RT). Os cortes foram recolhidos diretamente sobre lâminas gelatinizadas, coletado-se cinco cortes seqüenciais, dispostos cada um em uma lâmina diferente, e desprezando-se os quinze cortes subseqüentes. Este procedimento foi repetido ao longo de toda a formação hipocampal delimitada pelas coordenadas estereotáticas citadas acima. Os cortes histológicos foram submetidos a duas diferentes técnicas histoquímicas, de modo que para cada série de cinco cortes seqüenciais coletados, o

segundo corte foi submetido à coloração de Nissl com violeta de cresila e o terceiro corte à reação com Fluoro-Jade B.

3.4.2. Coloração de Nissl com violeta de cresila e avaliação da perda neuronal

Para coloração de Nissl com violeta de cresila seguiu-se o protocolo descrito por ONISHI (1999), com algumas adaptações. Inicialmente os cortes foram desparafinizados através de duas passagens em xilol por 3 minutos cada. A seguir foram hidratados em uma série de álcoois: etanol 100 %, 95 % e 70 %, por 3 minutos cada, e finalmente deixadas em água destilada por 3 minutos. Os cortes foram então imersos em uma solução de violeta de cresila, mantida a 45° C, por 9 minutos. Após a etapa de coloração, os cortes foram desidratados através de passagens rápidas em água destilada seguida de outra em etanol 70 % e transferidas para etanol 95 % por 3 minutos e logo depois em três passagens de etanol 100 % por 3 minutos cada passagem. Os cortes foram então diafanizados em xilol, através de duas passagens de 5 minutos cada, e logo em seguida as lâminas foram montadas com Entellan (Merck).

A coloração de Nissl foi utilizada para a avaliação do grau de perda neuronal nas camadas piramidais CA1 (CA1cp) e CA3 (CA3cp), no hilo (H) e camada granular do giro denteado (CG). Essa avaliação foi feita ao nível do hipocampo dorsal direito e esquerdo compreendido entre 1,58 e 1,94 mm posterior ao bregma. Foram utilizados três cortes seriais para cada animal, distanciados 140 µm entre eles, da região mencionada acima. Atribuiu-se um escore para cada uma das regiões (CA1cp, CA3cp, H e CG) de cada hemisfério direito e esquerdo dos três cortes, segundo a tabela 1. Os valores dos escores de cada região foram ordenados para o cálculo da mediana, a qual correspondeu ao escore final da região analisada em cada animal. A avaliação do grau de perda neuronal foi feita utilizando-se um microscópio Nikon Optiphot 2, com a objetiva de 40 x, sendo que a identificação do grupo ao qual pertenciam os espécimes analisados não era do conhecimento do experimentador. A(s) lâmina(s) contendo os cortes submetidos ao SE foram agrupadas com a(s) sua(s) respectiva(s) lâmina(s) controle e logo após, as identificações de todas as lâminas foram ocultadas, sendo mantido somente o dizer “controle” nas lâminas controle para que o experimentador soubesse quais eram as lâminas

controle. Imediatamente antes da análise das lâminas dos animais submetidos ao SE, para cada grupo experimental submetido ao SE, os respectivos cortes correspondentes aos animais controle foram utilizados para caracterizar o padrão de 100% de neurônios saudáveis (escore 0).

| Escore | Percentual de neurônios saudáveis (núcleo e nucléolo evidentes) |
|---------------|--|
| 0 | 100 % |
| 1 | > 75 % e < 100 % |
| 2 | > 50 % a 75 % |
| 3 | > 25 % a 50 % |
| 4 | ≤ 25 % |

Tabela 1. Escores utilizados na avaliação do grau de lesão neuronal.

3.4.3. Fluoro-Jade B

Para a marcação para neurônios com Fluoro-Jade B seguiu-se o protocolo descrito por SCHMUED e HOPKINS (2000), com algumas adaptações. Os cortes foram desparafinizados em xilol conforme descrito acima e foram sequencialmente imersos em NaOH 1 % em etanol 80 % (5 minutos), etanol 70 % (2 minutos). A seguir foram transferidos para uma solução de permanganato de potássio 0,06 % e mantidos por 10 minutos sob agitação constante. Após este procedimento, os cortes foram mergulhados em água destilada (2 minutos) e transferidos para uma solução de Fluoro-Jade B 0,0004 % (20 minutos). Após esta etapa de marcação, os cortes foram mergulhados por 3 vezes em água destilada, durante 1 minuto cada. Logo após imersão da última água destilada, o excesso de água da lâmina foi retirado com o auxílio de papel absorvente, tomando-se o cuidado de não tocar os cortes. Imediatamente depois, as lâminas foram transferidas para estufa a 50° C, onde permaneceram por 40 minutos. Finalmente, após este tempo os cortes foram imersos em xilol durante 1 minuto e logo em seguida as lâminas foram montadas com Entellan (Merck).

O marcador Fluoro-Jade B foi utilizado para a avaliação quantitativa da lesão neuronal nas camadas piramidais das regiões CA1 e CA3 hipocâmpais, no hilo e camada granular do giro denteado. Os cortes utilizados para esta avaliação eram imediatamente adjacentes àqueles corados com violeta de cresila, empregados para avaliação da perda neuronal (item 3.4.1).

O número de neurônios Fluoro-Jade B positivos (FJB+) foi contado duas vezes em cada espécime, sem o conhecimento do grupo experimental ao qual o mesmo pertencia. Os neurônios foram contados em ambos hemisférios e a média das duas contagens correspondeu ao número total de neurônios amostrados em cada uma das regiões acima mencionadas. Para isso foi utilizado um microscópio Nikon Optiphot 2, equipado com um conjunto de filtros para fluoresceína (Nikon B-2A) e uma vídeo câmera (Leica DC 300F) para a captura e digitalização das imagens. As imagens foram capturadas sob objetiva de 40 vezes e sobre as mesmas foram adicionados, aleatoriamente, 36 quadrados de 30 x 30 micrômetros cada um, em cada região de interesse (CA1cp, CA3cp, H e CG) em cada animal.

Foram contados todos os neurônios FJB+ cujos corpos celulares ocupavam o interior do quadrado e aqueles tocados pelas linhas: horizontal superior e/ou vertical direita do quadrado que delimitava o campo amostrado (GUNDERSEN, 1978; GUNDERSEN et al., 1988). Para esses procedimentos foi utilizado o programa Image Tool para Windows (Versão 3.0).

3.4.2. Testes estatísticos

Os valores obtidos na avaliação da perda neuronal e na contagem do número de neurônios FJB+ foram processados estatisticamente através dos testes Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, assumindo-se grau de significância para $p < 0,05$. Para a realização de todos os testes estatísticos foi utilizado o programa GraphPad InStat® (versão 3.00) e o programa GraphPad Prism® (versão 3.00) para a confecção dos gráficos.

4. Resultados

4.1. Alterações comportamentais

Os resultados comportamentais encontrados na fase aguda deste modelo foram similares aos previamente descritos em camundongos (TURSKI et al., 1984; SANTOS, 1995; CAVALHEIRO et al., 1996) e em ratos (TURSKI et al.; 1983a; CAVALHEIRO et al., 1991; CAVALHEIRO, 1995).

Após a administração da pilocarpina, os animais apresentaram as seguintes alterações comportamentais: acinesia inicial, *wet dog shakes*, movimentos atáxicos e automatismos mastigatórios com salivação. Este tipo de comportamento progrediu para tremores generalizados, clônias localizadas nas extremidades, breves crises convulsivas motoras e *rearing* (o camundongo fica em pé, apresentando clônias dos membros anteriores apoiado sobre as patas posteriores) seguido de queda. Finalmente, os animais apresentaram crises clônicas generalizadas e ininterruptas culminando no *status epilepticus*.

O intervalo de tempo entre a aplicação da pilocarpina e o início do *status epilepticus* foi de $43,33 \pm 3,46$ minutos (média \pm E.P.M.; n = 30).

Após os trinta minutos iniciais do início do SE, os animais foram gradativamente diminuindo a intensidade das crises clônicas passando de generalizadas para parciais, sem deixar de serem ininterruptas.

4.2. Análise histológica

4.2.1. Coloração de Nissl e avaliação da perda neuronal

4.2.1.1. Camada granular do giro denteado

A camada granular do giro denteado apresentou alterações (figuras 1A à 1D) na sua organização celular desde 3 horas (3 HP) até 3 semanas após SE (3 SP). Nas regiões lesadas desta camada havia neurônios com o núcleo escuro e denso (picnótico), sendo que

nos animais dos grupos 1 SP e 3 SP ocorreu um maior grau de comprometimento da sua citoarquitetura comparada com os demais grupos. Com exceção dos grupos 3 HP (mediana = 0) e 12 HP (mediana = 0,5), todos os demais grupos apresentaram mediana igual a 1 (figura 1E). Quando esta camada se apresentou lesada, havia neurônios com o núcleo escuro e denso (picnótico), sendo que nos grupos 1 SP e 3 SP foram encontrados animais apresentando um maior grau de comprometimento da citoarquitetura desta camada quando comparada com os demais grupos para esta região.

4.2.1.2. Hilo do giro denteado

Os neurônios hilares apresentaram uma maior sensibilidade ao SE quando comparados com os neurônios das outras regiões deste trabalho. Diferentemente das outras regiões, já no tempo de 3 horas após o início do SE, a lesão no hilo alcançou o escore máximo (mediana = 4), sendo encontrado este mesmo valor nos demais tempos (figura 2E). Em todos os grupos submetidos ao SE, os neurônios hilares com morfologia normal estavam ausentes ou raramente foram encontrados (figuras 2A à 2D).

4.2.1.3. Camada piramidal de CA3 hipocampal

A progressão da lesão na camada piramidal da região CA3 (figuras 3A à 3D) apresentou uma tendência de aumento ao longo do tempo atingindo o escore máximo (mediana = 4) nos grupos de maiores tempos 1SP e 3 SP (figura 3E).

4.2.1.4. Camada piramidal de CA1 hipocampal

Na lesão encontrada na camada piramidal da região CA1 (figuras 4A à 4D) a mesma tendência foi constatada (figura 4E), porém o valor da mediana para os grupos 1 SP e 3 SP se restringiu a 1, embora houve animais que alcançaram escores maiores nestes dois grupos.

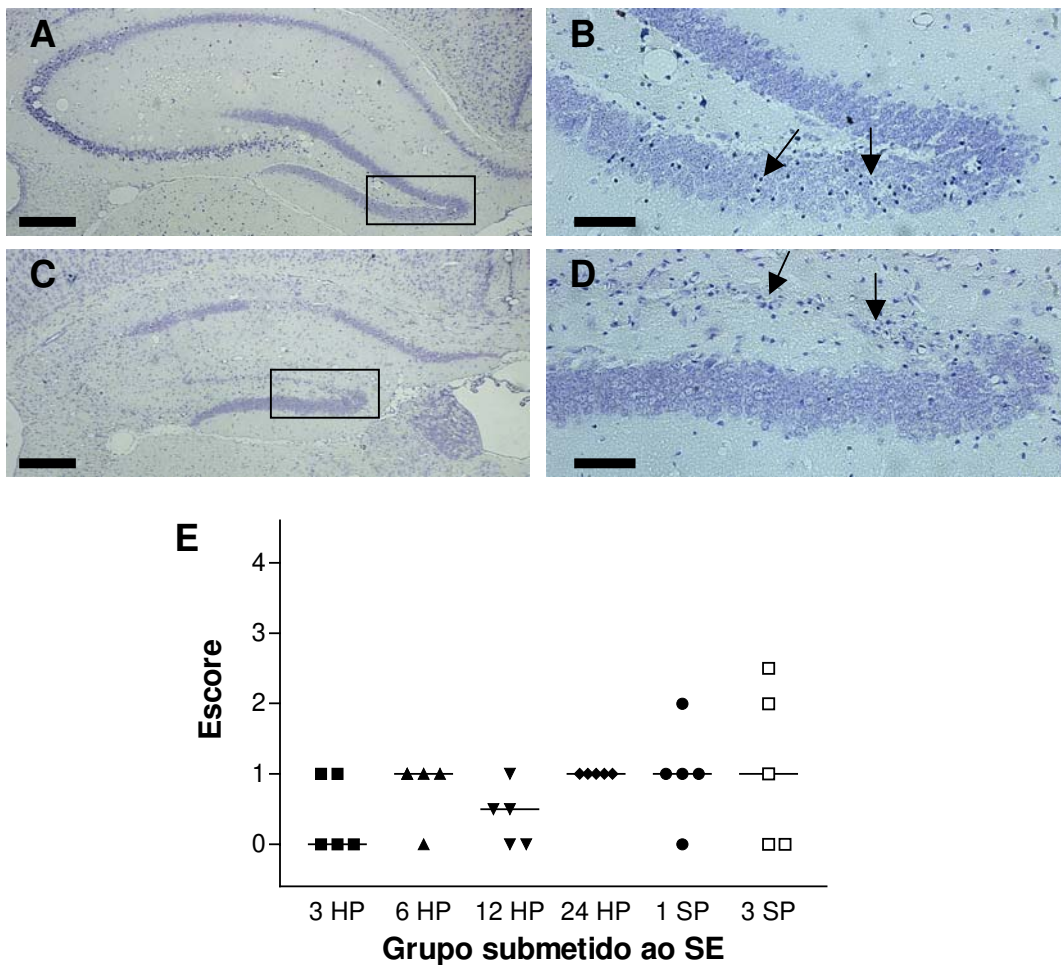


Figura 1. Dano neuronal na camada granular do giro denteado. **A-** Formação hipocampal de camundongo do grupo 6 HP. A camada granular do giro denteado apresenta a maior parte de suas células íntegras, correspondendo ao escore 1. **B-** Detalhe da figura A, onde se pode observar neurônios com núcleos picnóticos entre neurônios com morfologia normal na camada granular (setas). **C-** Formação hipocampal de camundongo do grupo 3 SP. Camada granular do giro denteado apresentando grande perda neuronal, correspondendo ao escore 2. **D-** Detalhe da figura C: Há neurônios com núcleos picnóticos entre neurônios com morfologia normal na camada granular (setas). A e C: barra = 300 μ m; B e D: barra = 80 μ m. **E-** Gráfico representando as lesões encontradas na camada granular do giro denteado nos animais dos grupos 3 HP a 3 SP. As barras horizontais representam as medianas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Note-se a presença de animais apresentando escores superiores a 1 nos grupos 1 SP e 3 SP.

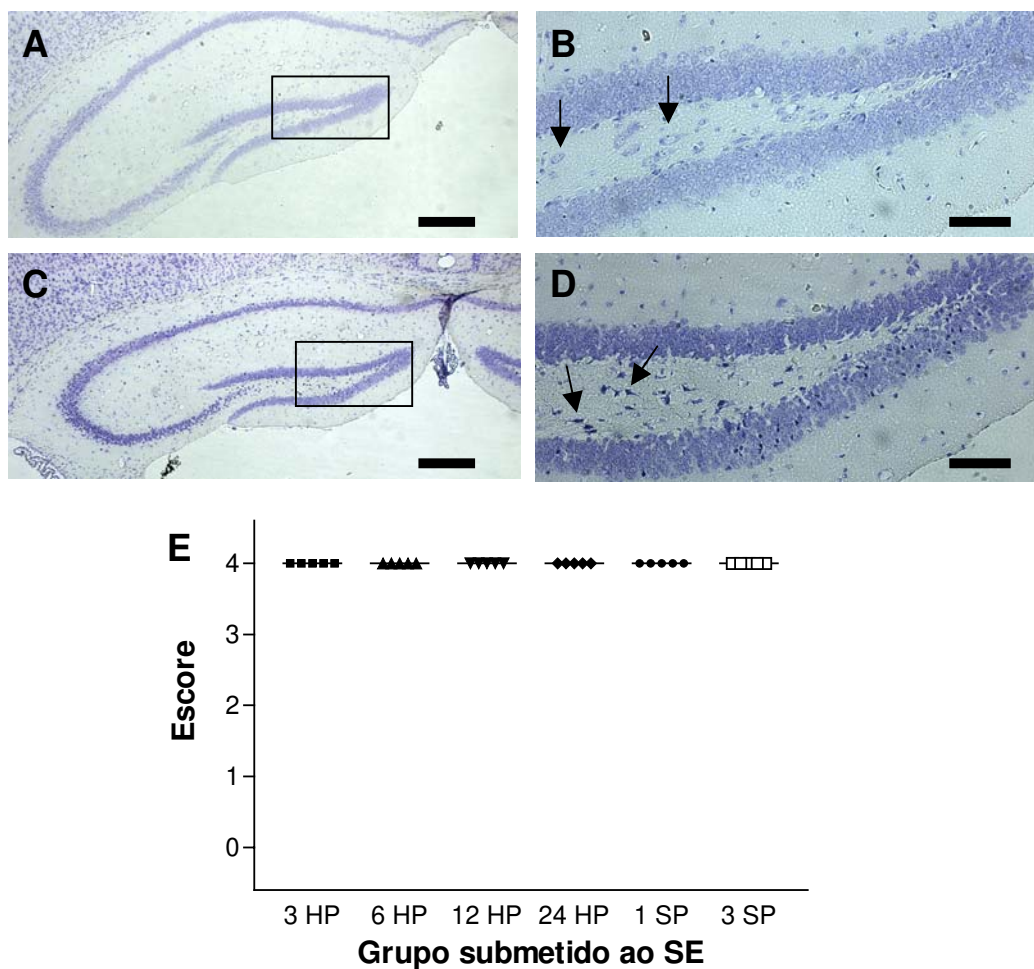


Figura 2. Dano neuronal no hilo do giro dentado. A- Formação hipocampal de camundongo do grupo 3 horas controle. Hilo do giro dentado apresenta todas as suas células íntegras correspondendo ao escore 0. **B-** Detalhe da figura A: Neurônios íntegros com núcleo e nucléolo evidente na região hilar (setas). **C-** Formação hipocampal de camundongo do grupo 3 HP. O hilo apresenta grande perda neuronal correspondendo ao escore 4. **D-** Detalhe da figura C: Observam-se células hilares escuras e encolhidas (setas). A e C: barra = 300 μ m; B e D: barra = 80 μ m. **E-** Gráfico representando as lesões encontradas na camada polimórfica do giro dentado nos animais dos grupos 3 horas a 3 semanas após o SE. As barras horizontais representam as medianas. Note-se a extrema vulnerabilidade dos neurônios hilares à lesão provocada pelo SE, constatada pela perda neuronal com escore 4 já evidenciado no grupo de menor tempo (3 HP).

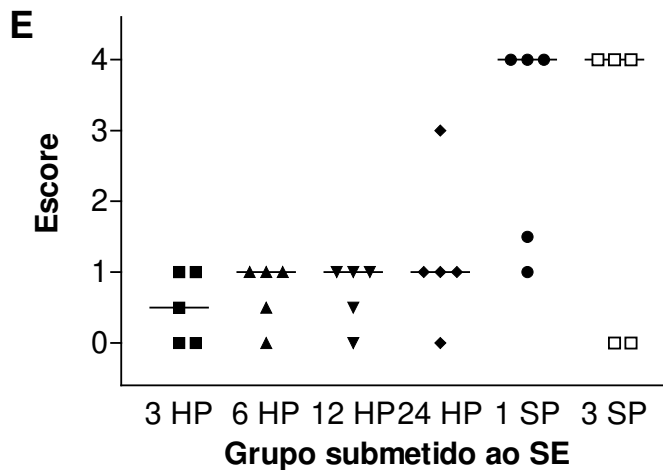
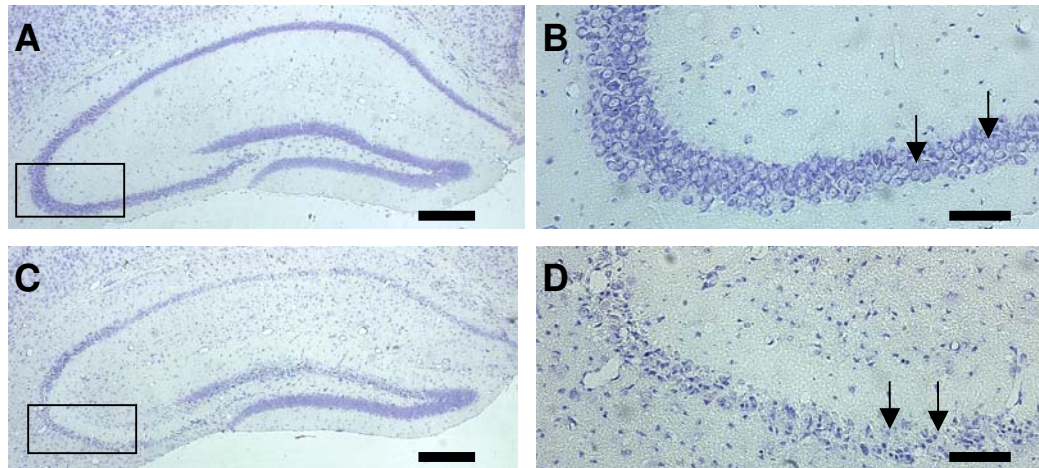


Figura 3. Dano neuronal na camada piramidal de CA3 hipocampal. **A-** Formação hipocampal de camundongo do grupo 1 semana controle. Camada piramidal íntegra com seus neurônios dispostos enfileirados normalmente correspondendo ao escore 0. **B-** Detalhe da figura A: Neurônios íntegros com núcleo e nucléolos evidentes (setas). **C-** Formação hipocampal de camundongo do grupo 1 SP cuja camada piramidal em CA3 corresponde ao escore 4. **D-** Detalhe da figura C: Observa-se desestruturação da camada piramidal, com grande perda neuronal (setas). A e C: barra = 300 µm; B e D: barra = 80 µm. **E-** Gráfico representando as lesões encontradas na camada piramidal de CA3 hipocampal nos animais dos grupos 3 horas a 3 semanas após o SE. As barras horizontais representam as medianas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Note-se a maior incidência de animais com escores máximos (mediana 4) nos grupos 1 SP e 3 SP.

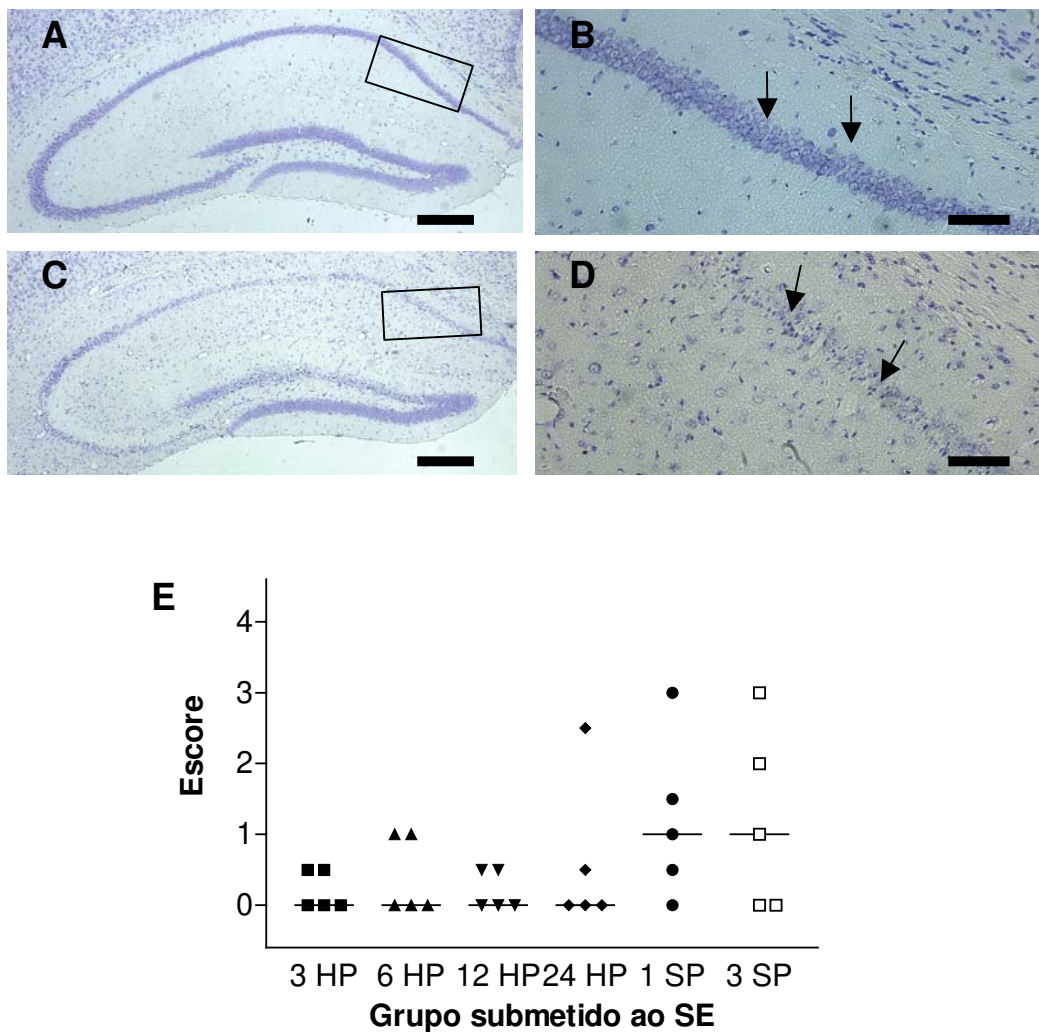


Figura 4. Dano neuronal na camada piramidal de CA1 hipocampal. **A-** Formação hipocampal de camundongo do grupo 1 semana controle. Camada piramidal em CA1 íntegra com seus neurônios dispostos enfileirados normalmente correspondendo ao escore 0. **B-** Detalhe da figura A: Neurônios íntegros com núcleo e nucléolos evidentes (setas). **C-** Formação hipocampal de camundongo do grupo 1 SP cuja camada piramidal em CA1 corresponde ao escore 4. **D-** Detalhe da figura C: Observa-se desestruturação da camada piramidal, com grande perda neuronal (setas). A e C: barra = 300 μ m; B e D: barra = 80 μ m. **E-** Gráfico representando as lesões encontradas na camada piramidal de CA1 hipocampal nos animais dos grupos 3 horas a 3 semanas após o SE. As barras horizontais representam as medianas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Note-se a presença de animais com escores superiores a 1 nos grupos 1 SP e 3 SP.

4.2.2. Fluoro-Jade B

4.2.2.1. Camada granular do giro denteado

A presença de neurônios Fluoro-Jade B positivos na camada granular foi extremamente variável ao longo do tempo (figura 5). Dentre os animais de cada grupo, no mínimo dois deles não apresentaram nenhum neurônio marcado para fluoro-jade B e o maior número desses neurônios foi encontrado em um animal do grupo 1 SP e outro do grupo 3 SP (figura 6). A análise estatística não detectou diferença no número de neurônios Fluoro-Jade B positivos na camada granular ao longo do tempo pós SE.

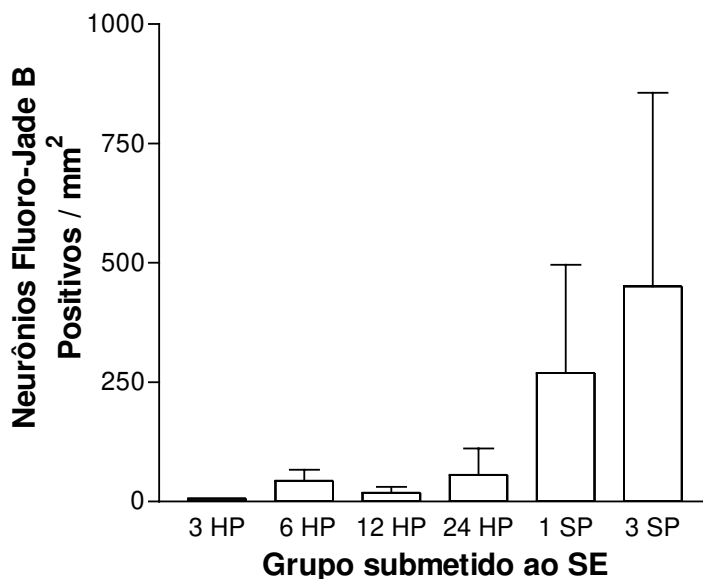


Figura 5. Gráfico representando a avaliação quantitativa de neurônios Fluoro-Jade B positivos na camada granular do giro denteado, 3 horas a 3 semanas após o início do SE. Os valores estão representados em média ± E.P.M.

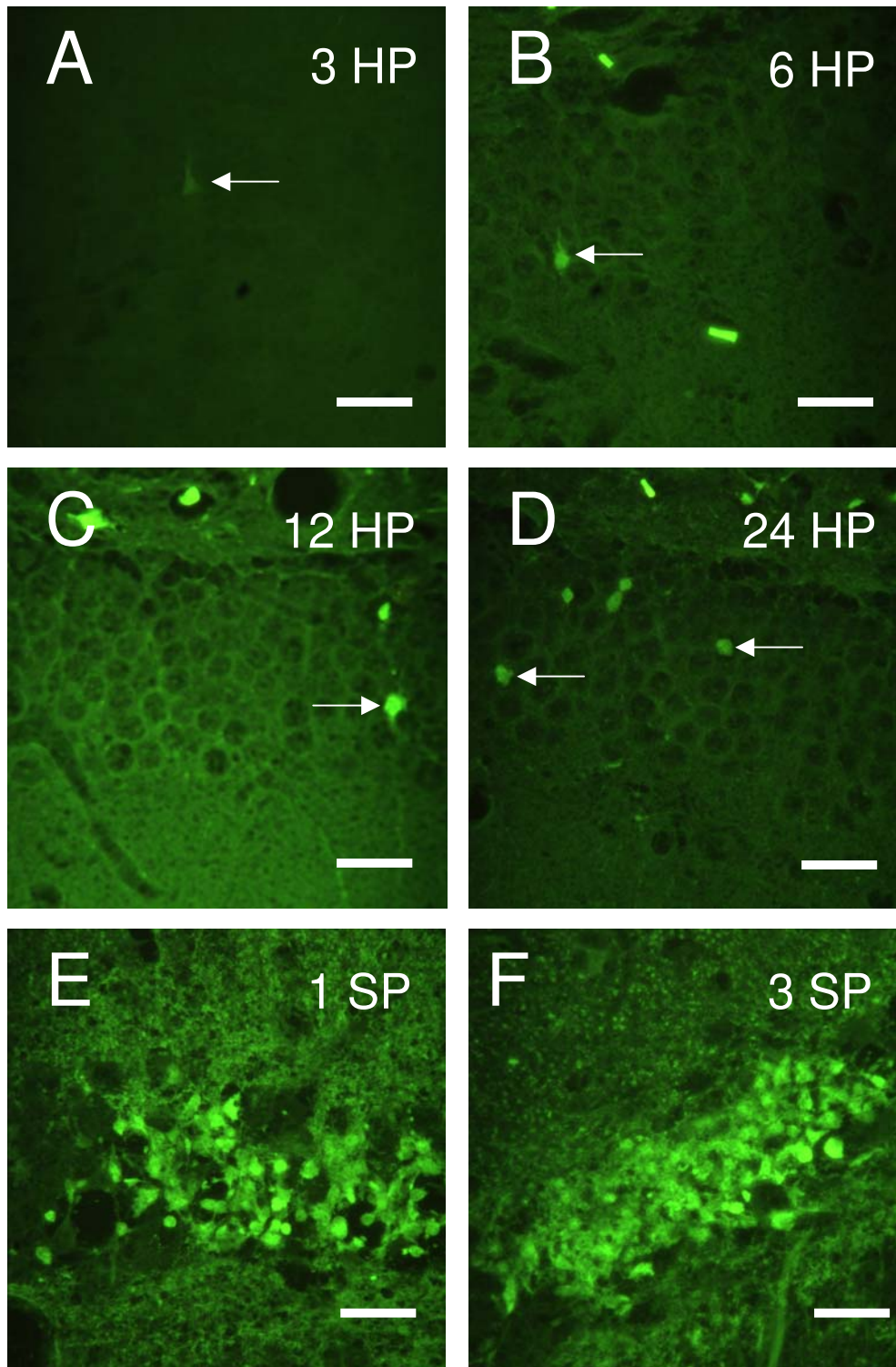


Figura 6. Dano neuronal na camada granular do giro denteado (CG) de 3 h a 3 semanas após o início do SE. **A-** CG de camundongo do grupo 3 HP mostrando neurônio Fluoro-Jade B positivo fracamente marcado (seta). **B-** CG de camundongo do grupo 6 HP mostrando neurônio Fluoro-Jade B positivo (seta). **C-** CG de camundongo do grupo 12 HP mostrando neurônio Fluoro-Jade B positivo (seta). **D-** CG de camundongo do grupo 24 HP mostrando neurônios FJB+ (setas). **E-** CG de camundongo do grupo 1 SP mostrando muitos neurônios FJB+. **F-** CG de camundongo do grupo 3 SP mostrando muitos neurônios FJB+. A até F: barra = 50 μ m.

4.2.2.2. Hilo do giro denteado

O aparecimento de neurônios hilares Fluoro-Jade B positivos ocorreu já no grupo 3 HP, apresentando um aumento gradual com o tempo até 12 HP e decréscimo progressivo até 3 SP (figura 8). Foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para o grupo 12 HP em relação aos grupos 3 HP e 3 SP ($n = 5$, figura 7).

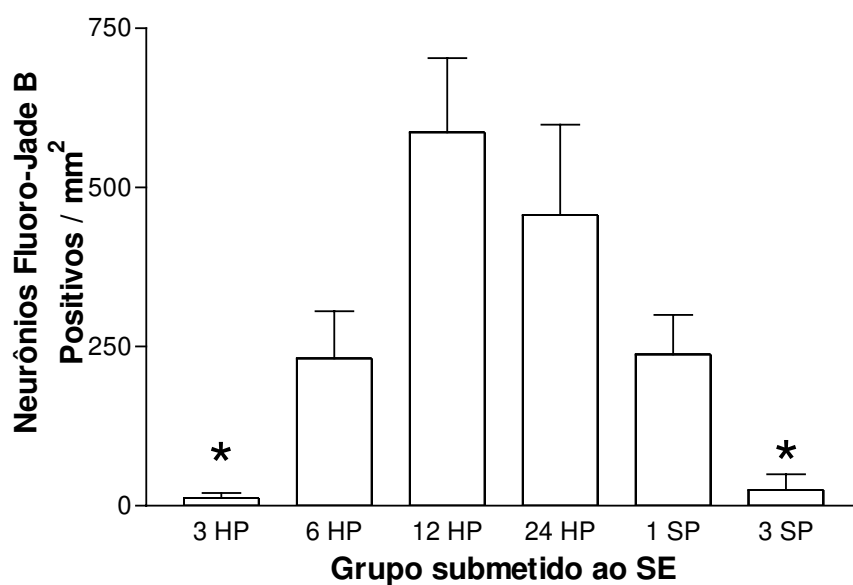


Figura 7. Gráfico representando a avaliação quantitativa de neurônios Fluoro-Jade B positivos no hilo do giro denteado, 3 horas a 3 semanas após o início do SE. Valores estão expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo 12 HP.

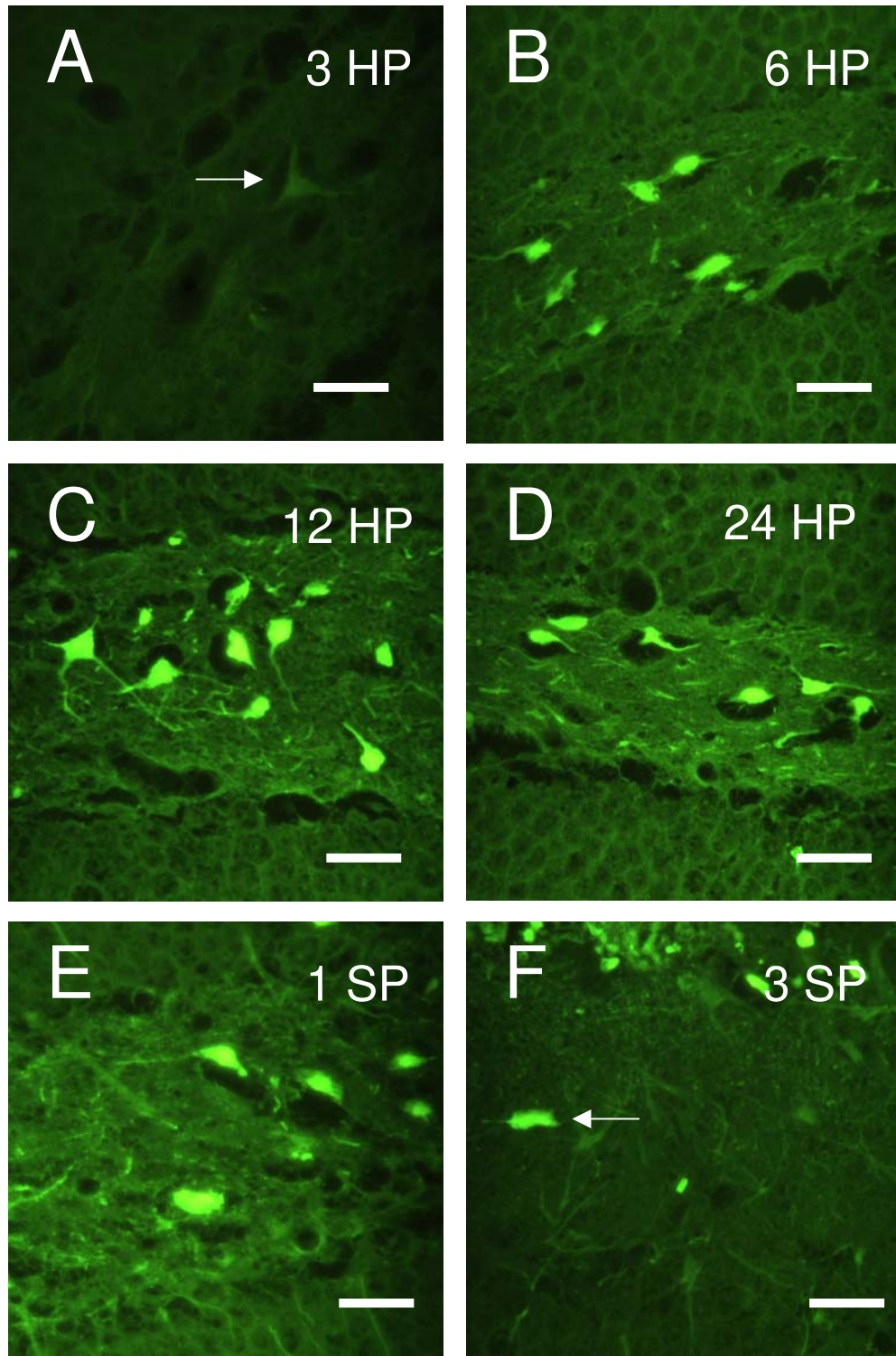


Figura 8. Dano neuronal no hilo do giro denteado (H) de 3 h a 3 semanas após o início do SE. **A-** Hilo de camundongo do grupo 3 HP mostrando neurônio Fluoro-Jade B positivo fracamente marcado (seta). **B-** Hilo de camundongo do grupo 6 HP mostrando neurônios FJB+. **C-** Hilo de camundongo do grupo 12 HP mostrando neurônios FJB+. **D-** Hilo de camundongo do grupo 24 HP mostrando neurônios FJB+ (setas). **E-** Hilo de camundongo do grupo 1 SP mostrando neurônios FJB+. **F-** Hilo de camundongo do grupo 3 SP mostrando neurônio FJB+ (seta). A até F: barra = 50 μ m.

4.2.2.3. Camada piramidal de CA3 hipocampal

Os neurônios Fluoro-Jade B positivos da camada piramidal da região CA3 estavam ausentes nos grupos 3 HP e 6 HP. Nos grupos 12 HP e 24 HP, dois e três animais apresentaram marcação positiva para Fluoro-Jade B, respectivamente. O pico para a marcação de neurônios Fluoro-Jade B positivos foi encontrado no grupo 1 SP (figura 10). No grupo 3 SP um animal não apresentou nenhuma marcação. Diferença estatisticamente significativa foi detectada entre o grupo 1 SP e os grupos 3 HP e 6 HP ($n = 5$, figura 9).

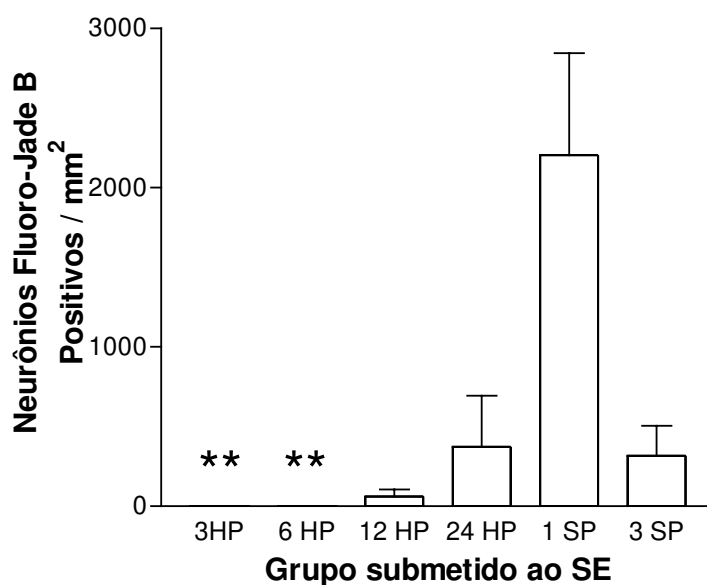


Figura 9. Gráfico representando a avaliação quantitativa de neurônios Fluoro-Jade B positivos na camada piramidal CA3 do hipocampo, 3 horas a 3 semanas após o início do SE. Valores estão expressos em média \pm E.P.M. ****P < 0.01** indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo 1 SP.

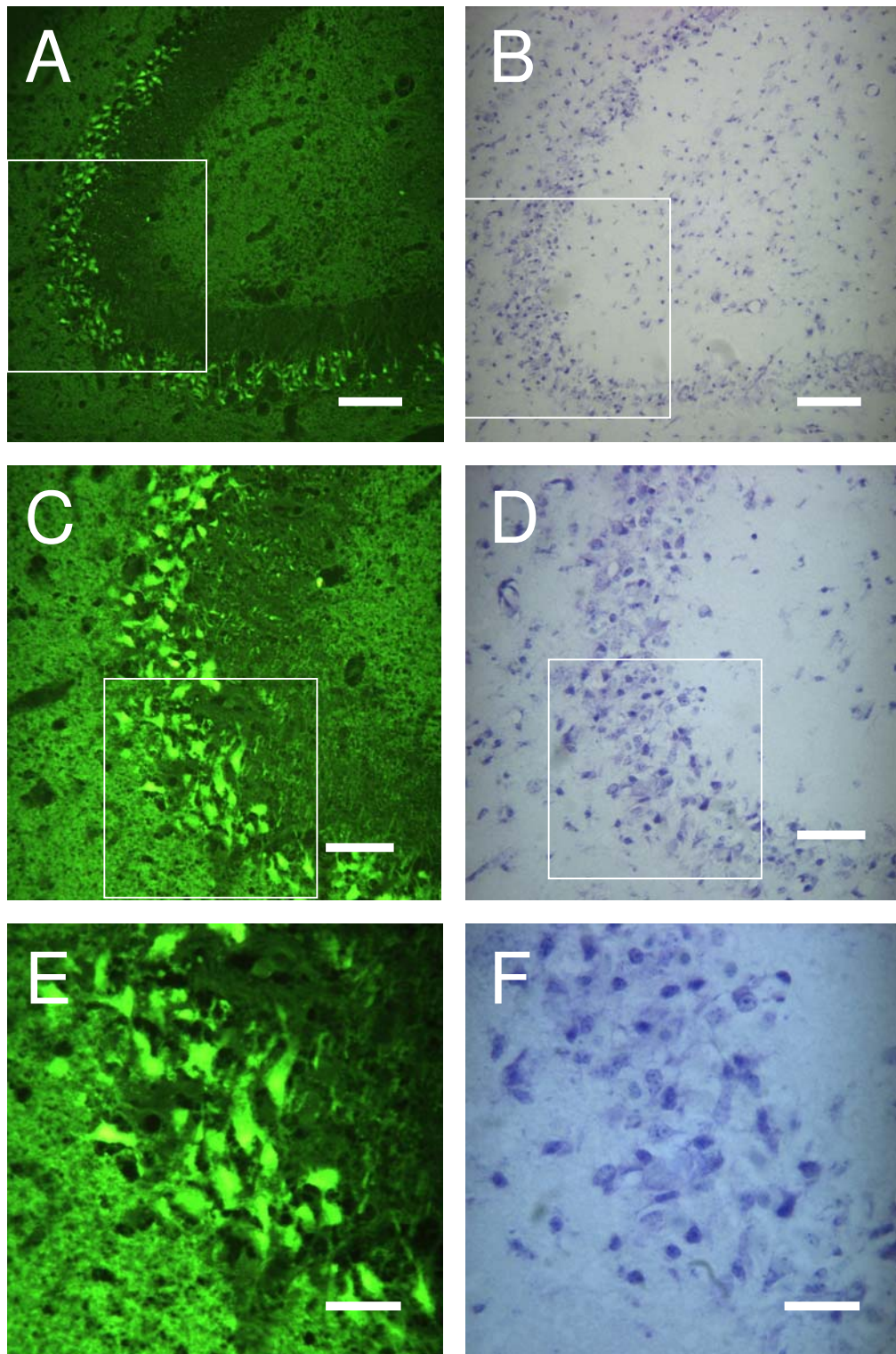


Figura 10. Dano neuronal na camada piramidal de CA3 hipocampal (CA3cp). **A-** CA3 de animal do grupo 1 SP apresentando muitos neurônios FJB+. **B-** Corte imediatamente adjacente ao corte da figura 10 A corado com violeta de cresila. **C-** Detalhe da figura A. **D-** Corte imediatamente adjacente ao corte da figura 10 C corado com violeta de cresila. **E-** Detalhe da figura C. **F-** Corte imediatamente adjacente ao corte da figura 10 E corado com violeta de cresila. A e B: barra = 170 μm ; C e D: barra = 90 μm ; E e F: barra = 50 μm .

4.2.2.4. Camada piramidal de CA1 hipocampal

Os neurônios Fluoro-Jade B positivos da camada piramidal da região CA1 estavam ausentes nos grupos 3 HP. No grupo 6 HP três animais não apresentaram marcação positiva para Fluoro-Jade B, e no grupo 12 HP e 24 HP somente um camundongo de cada grupo não apresentou marcação. O pico para a marcação de neurônios Fluoro-Jade B positivos, assim como na camada piramidal de CA3, também foi encontrado no grupo 1 SP (figura 12). No grupo 3 SP dois animais não apresentaram marcação. A análise estatística entre os 6 grupos detectou diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 SP e 3 HP ($n = 5$, figura 11).

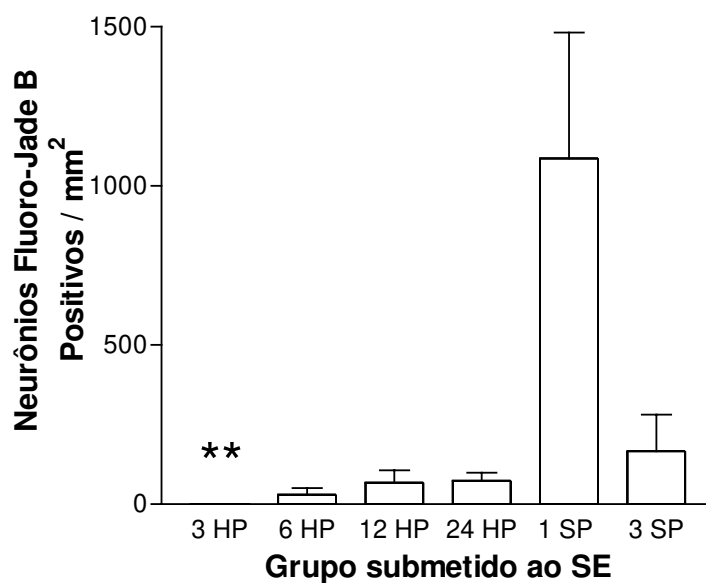


Figura 11. Gráfico representando a avaliação quantitativa de neurônios Fluoro-Jade B positivos na camada piramidal CA1 do hipocampo, 3 horas a 3 semanas após o início do SE. Valores estão expressos em média \pm E.P.M. $P < 0.01$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo 1 SP.**

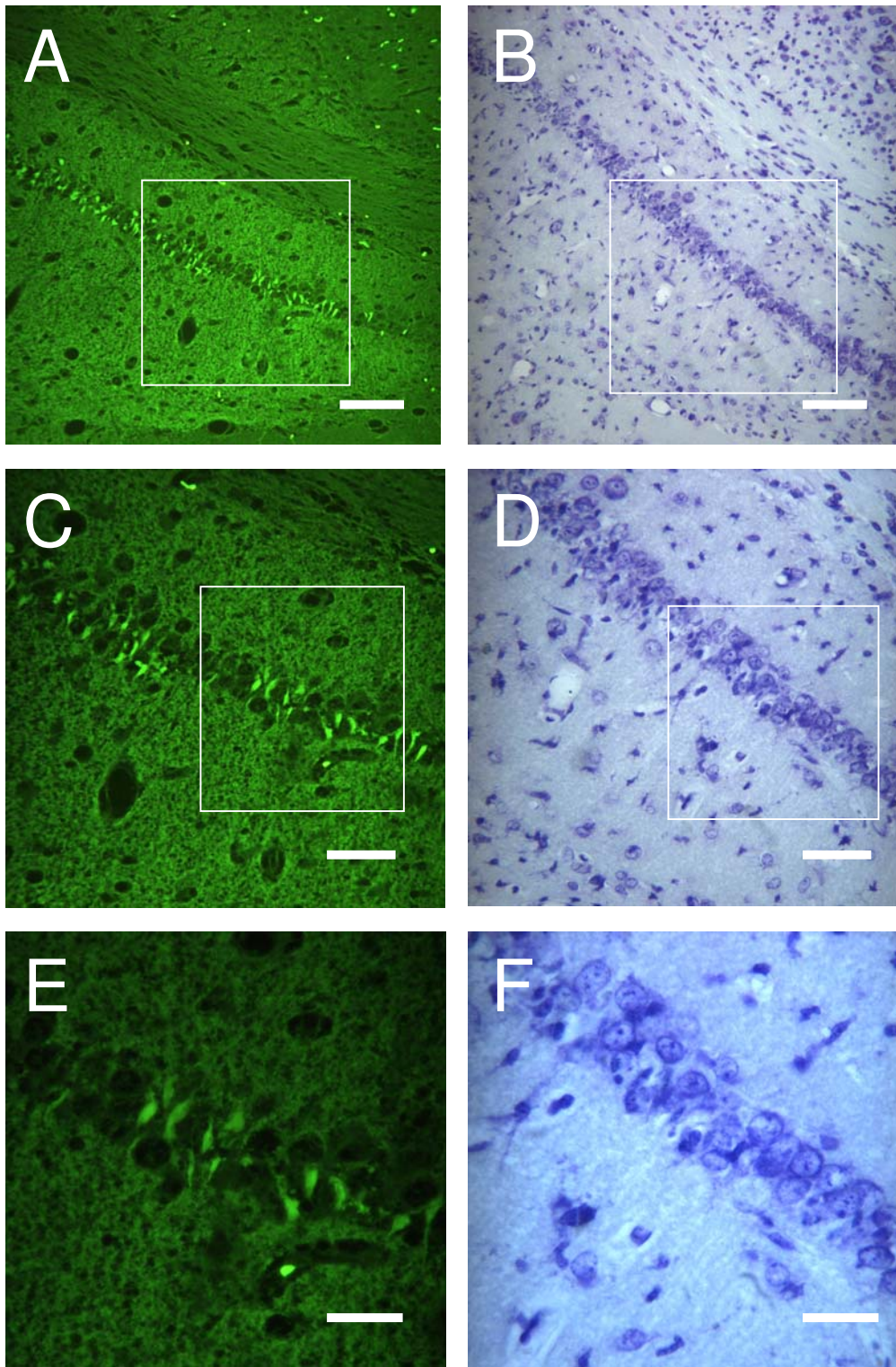


Figura 12. Dano neuronal na camada piramidal de CA1 hipocampal (CA1cp). **A-** CA1cp de animal do grupo 1 SP apresentando muitos neurônios FJB+. **B-** Corte imediatamente adjacente ao corte da figura 10 A corado com violeta de cresila. **C-** Detalhe da figura A. **D-** Corte imediatamente adjacente ao corte da figura 10 C corado com violeta de cresila. **E-** Detalhe da figura C. **F-** Corte imediatamente adjacente ao corte da figura 10 E corado com violeta de cresila. A e B: barra = 170 μ m; C e D: barra = 90 μ m; E e F: barra = 50 μ m.

5. Discussão

5.1. Avaliação dos resultados comportamentais e padronização da duração do *status epilepticus*

Os resultados comportamentais encontrados neste trabalho após a administração da pilocarpina foram similares aos previamente descritos em camundongos (TURSKI et al., 1984; SANTOS, 1995; CAVALHEIRO et al., 1996) e em ratos (TURSKI et al., 1983a; CAVALHEIRO et al., 1991; CAVALHEIRO, 1995).

Com relação ao Modelo de Epilepsia Induzida pela Pilocarpina em Camundongos (MEIPC), não há na literatura dados que foquem especificamente a relação entre a duração do SE e o grau de perda neuronal. Esta informação, ausente em camundongos, foi bem caracterizada em ratos por LEMOS e CAVALHEIRO (1995). Estes autores, além de analisar a relação entre a duração do SE e a densidade celular na formação hipocampal, também avaliaram a duração do SE em relação à latência para a primeira crise espontânea, à frequência das crises espontâneas e à reorganização sináptica avaliada pelo método de neo-Timm na camada supragranular do giro denteado. É importante destacar que no estudo de LEMOS e CAVALHEIRO (1995) o SE foi interrompido pela administração conjunta de diazepam e pentobarbital para a obtenção de grupos com SE de diferentes durações: 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 6 horas. Foi formado também um grupo com SE induzido e sem administração de diazepam e pentobarbital, onde o SE remitiu espontaneamente 8 a 12 horas após o seu início. No grupo cujo SE foi interrompido 30 minutos após o seu início, não foram detectadas alterações neuropatológicas. Nos demais grupos com SE interrompido, a severidade das alterações neuropatológicas aumentou na medida em que a duração do SE foi maior. Contudo, apenas no grupo no qual o SE foi interrompido 6 horas após o seu início 100 % dos animais tiveram posteriormente crises epiléticas espontâneas. Além disso, apresentaram alterações neuropatológicas praticamente iguais àquelas encontradas nos animais que não tiveram o SE interrompido. Assim, em virtude destas informações da literatura, em nosso trabalho a duração de no mínimo 6 horas de SE foi condição para inclusão dos animais nos seus respectivos grupos experimentais, com

exceção do grupo 3 HP que teve o SE interrompido no ato do sacrifício, 3 horas após o início do SE.

5.2. Perda neuronal e excitotoxicidade

Na presente tese, a perda neuronal nas camadas piramidais de CA1 e CA3 hipocampais e na camada polimórfica do giro denteado em animais submetidos ao SE, induzido pela pilocarpina em camundongos, foi similar à previamente descrita em outros trabalhos com camundongos (TURSKI et al., 1984; CAVALHEIRO et al. 1996; BORGES et al. 2003). Os mecanismos fisiológicos que podem estar associados à perda neuronal por nós observada são discutidos a seguir.

A pilocarpina é um potente agonista muscarínico extraída da planta brasileira *Pilocarpus jaborandi* (CAVALHEIRO, 1995). A estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos, iniciam crises convulsivas as quais progressivamente envolvem sistemas não colinérgicos e tornam-se resistentes a antagonistas de receptores muscarínicos. Estas convulsões causam uma excessiva liberação de glutamato por neurônios glutamatérgicos que estimulam a liberação contínua de acetilcolina. Esta atividade convulsiva “auto-propagante” resulta em dano neuronal mediado pelo receptor NMDA (HAMILTON et al., 1997).

Os íons cálcio (Ca^{2+}) são importantes mensageiros intracelulares dirigindo funções celulares, tais como diferenciação e crescimento, excitabilidade da membrana, exocitose e atividade sináptica. Os neurônios possuem mecanismos homeostáticos para assegurar um alto controle dos níveis citosólicos de Ca^{2+} . No seu estado de repouso, os níveis de cálcio livre são mantidos em baixos níveis (100 nM). Deste modo, elevações localizadas de Ca^{2+} que ocorrem na vizinhança de um canal iônico ou em locais que liberam Ca^{2+} intracelulares podem eficientemente ativar enzimas ou canais iônicos próximos. Os neurônios controlam os níveis intracelulares e a localização dos íons Ca^{2+} através de uma complexa interação entre o influxo, efluxo, tamponamento e armazenamento interno de Ca^{2+} . Em condições fisiológicas, estes processos permitem múltiplas cascatas sinalizantes reguladas pelo Ca^{2+} ocorrerem independentemente, dentro dos limites da mesma célula. Entretanto, excessivo influxo de Ca^{2+} ou liberação a partir de depósitos intracelulares podem elevar as cargas

deste íon para níveis que excedem a capacidade dos mecanismos regulatórios de Ca^{2+} . Isto leva a ativação inapropriada de processos Ca^{2+} -dependentes que estão normalmente inativos ou operam em baixos níveis, causando desarranjos e eventual morte celular (CHOI, 1988; TYMIANSKI e TATOR, 1996; SATTLER e TYMIANSKI, 2000). Excessivos aumentos no Ca^{2+} intracelular podem superativar proteases, lipases, fosfatases, e endonucleases que diretamente danificam estruturas celulares ou induzem a formação de radicais livres oxidativos que mediam a morte celular. O termo “excitotoxicidade” foi criado por OLNEY (1969) para indicar neurodegeneração mediada por receptores para aminoácidos excitatórios. Na excitotoxicidade, a excessiva liberação sináptica de glutamato pode levar à desregulação da homeostase do Ca^{2+} (ARUNDINE e TYMIANSKY, 2003).

Proteínas ligantes de cálcio intracelulares oferecem capacidade tamponante ao Ca^{+2} permitindo um controle da homeostase do íon cálcio intracelular (SYNTICHAKI e TAVERNARAKIS, 2003). No entanto, além de haver um limite da capacidade tamponante intracelular executada por estas proteínas ligantes de cálcio, nem todos os neurônios as possuem. E estas diferenças podem explicar, ao menos em parte, a diferente suscetibilidade à neurodegeneração, onde neurônios com pouca ou nenhuma proteína ligante de cálcio seriam mais sujeitos a morte celular por excitotoxicidade enquanto que neurônios que as possuíssem em maior quantidade teriam uma maior resistência quando submetidos ao SE.

5.3. Excitotoxicidade e conteúdos intracelulares de proteínas ligantes de cálcio na formação hipocampal

Através da via perfurante, axônios de neurônios glutamatérgicos estabelecem sinapses nas células granulares da camada granular do giro denteado. Considera-se que a ativação secundária dessa circuitaria, após a ativação inicial da circuitaria colinérgica devido à ação da pilocarpina que induziu o SE, seja responsável pelo fenômeno de excitotoxicidade nesse modelo em ratos (CAVALHEIRO, 1995). Contudo, a excitotoxicidade na camada granular do giro denteado não é tão grande provavelmente pelo fato das células granulares possuírem a proteína ligante de cálcio calbidina. Além disso, os interneurônios desta camada expressam parvalbumina e calretinina (MÁTYAS et al., 2004). Isto poderia

explicar o porquê desta região ter se apresentado mais conservada e menos suscetível à lesão após o SE também em nosso trabalho.

A camada polimórfica do giro denteado apresenta diferentes tipos de interneurônios, sendo que as células musgosas são os principais neurônios desta camada (FUJISE e KOSAKA, 1998). As fibras musgosas conectam-se às células musgosas através da circuitaria glutamatérgica (ZILLES et al., 2000), e esta em condições de excessiva atividade, pode promover um aumento de cálcio intracelular a um nível prejudicial a tais neurônios, culminando na morte deles por excitotoxicidade.

No nível do hipocampo dorsal, as células musgosas não apresentam proteínas ligantes de cálcio, enquanto que em outros interneurônios hilares, ao menos uma delas (calbidina, parvalbumina e calretinina) está presente (FUJISE et al., 1998; MATYAS et al., 2004). Na avaliação da perda neuronal no hilo, já no grupo 3 HP e em todos os demais grupos submetidos ao SE, foi encontrado escore 4 (máximo), demonstrado ser esta região altamente suscetível à neurodegeneração resultante de SE. Uma vez que as células musgosas predominam na camada polimórfica do giro denteado, e lhes falta proteínas ligantes de cálcio, que poderiam estar conferindo uma proteção via tamponamento do excesso de cálcio intracelular, a ausência destas pode explicar a grande vulnerabilidade representada pela enorme perda neuronal encontrada nesta camada, neste trabalho de tese.

Densidades axonais de origem colinérgica são encontradas na camada piramidal de CA3, no hipocampo dorsal de camundongos (AZNAVOUR et al, 2002). A camada piramidal de CA3 faz parte do circuito trissináptico que é glutamatérgico, e portanto, esta camada CA3 também recebe estímulos de origem glutamatérgica.

Nessa camada, os neurônios piramidais não possuem as proteínas ligantes de cálcio calbidina e parvalbumina, enquanto que interneurônios da mesma expressam parvalbumina e calretinina (MÁTYAS et al., 2004). Consoante com estes conhecimentos, a morte celular encontrada em CA3 no MEIPC deve ter sido predominantemente de neurônios piramidais, já que os mesmos possuem menos capacidade tamponante para o cálcio do que os interneurônios.

Densidades axonais de origem colinérgica são encontradas também na camada piramidal de CA1, no hipocampo dorsal de camundongos (AZNAVOUR et al, 2002). Assim como na camada piramidal de CA3, a camada piramidal de CA1 também faz parte

do circuito trissináptico o qual é glutamatérgico e, portanto, esta camada CA1 também recebe estímulos de origem glutamatérgica.

Na camada piramidal de CA1, encontramos lesão, mas sempre em um grau igual ou menor que o encontrado em CA3 piramidal. Há interneurônios da camada CA1 que possuem parvalbumina e calretinina assim como na camada CA3, no entanto, ao contrário dos neurônios piramidais de CA3, ao menos nos neurônios superficiais de CA1 existe a presença de neurônios piramidais superficiais que possuem calbidina (MÁTYAS et al., 2004).

5.4. Progressão do dano neuronal na formação hipocampal de camundongos após SE induzido pela pilocarpina

O presente trabalho corresponde ao primeiro estudo dedicado à avaliação da progressão do dano neuronal após SE induzido pela pilocarpina em camundongos utilizando-se o composto Fluoro-Jade B como marcador de neurônios em degeneração.

Outros trabalhos envolvendo avaliação temporal do dano neuronal produzido pela pilocarpina foram realizados em ratos (FUJIKAWA, 1996; COVOLAN e MELLO, 2000; POIRIER et al., 2000; FABENE et al., 2004). Destes trabalhos, para a quantificação do dano neuronal, POIRIER et al. (2000) utilizaram a molécula antecessora do Fluoro-Jade B, denominada por SCHMUED et al. (1997) como Fluoro-Jade e somente FABENE et al. (2004) utilizaram o Fluoro-Jade B para a quantificação dos neurônios em degeneração.

Apenas um estudo foi realizado para avaliação temporal da morte neuronal após a utilização de pilocarpina em camundongos (BORGES et al., 2003). Estes autores, porém, utilizaram nesse estudo somente a coloração padrão com hematoxilina e eosina.

Em nosso trabalho verificamos que a camada polimórfica do giro denteado dorsal apresentou pico de expressão de neurônios em degeneração (FJB+) 12 horas após o início do SE, enquanto que as camadas piramidais de CA1 e CA3 do hipocampo dorsal apresentaram o patamar mais elevado de neurônios FJB+ nos grupos experimentais de 1 semana após início do SE. A camada granular do giro denteado não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Em vista da ausência de trabalhos similares na literatura para a realização de comparações mais intimamente relacionadas, devido ao ineditismo do presente trabalho, apresentar-se-ão adiante alguns

resultados apresentados por outros trabalhos que podem ao menos em parte, acrescentar subsídios à compreensão dos fenômenos neurodegenerativos.

FUJIKAWA (1996), utilizando ratos e coloração por hematoxilina e eosina, verificaram que interrompendo o SE 3 horas após o seu início, o número de neurônios normais na camada hilar do giro denteado dorsal teve uma redução de 41 % nesta camada quando os animais foram sacrificados imediatamente após esse período. Esta redução passou para 60 % e 53 %, respectivamente, 24 e 72 horas após a interrupção do SE. Este autor não avaliou a perda neuronal após períodos superiores a 72 horas após a interrupção do SE. Ainda este autor, avaliando a perda neuronal em CA1 e CA3 do hipocampo dorsal, hilo e camada granular do giro denteado dorsal, observou um pico de perda neuronal 24 horas após a interrupção do SE, com um número inferior a 46 % de neurônios acidófilos em CA1, CA3 e camada granular e inferior a 55 % no hilo. A partir destes dados pode-se inferir que o hilo do giro denteado dorsal em ratos é mais resistente do que o hilo do giro denteado dorsal de camundongos, uma vez o resultado encontrado em nosso trabalho mostrou que no grupo 3 HP houve uma perda neuronal maior do que a encontrada por FUJIKAWA (1996) no grupo de 3 horas após o início do SE.

COVOLAN e MELLO (2000) avaliaram o perfil temporal de injúria neuronal após o *status epilepticus* induzido por ácido cáínico ou pilocarpina em ratos, utilizando a técnica de coloração pela prata. Os autores interromperam o SE com tionembutal 90 minutos após seu início e sacrificaram os animais em quatro tempos diferentes após o início do SE: 2,5 horas, 8 horas, 24 horas ou 48 horas. Utilizando escores baseados no número de células coradas pela prata para avaliar o dano neuronal, verificaram que células hilares impregnadas pela prata estavam presentes em todos os grupos experimentais. Este dado levou os autores a sugerirem a existência de um início rápido e um lento processo de dano na camada polimórfica do giro denteado. Nesse mesmo estudo, células impregnadas pela prata na camada piramidal CA1 e CA3a foram vistas somente 24 horas após o início do SE.

Em nosso trabalho, pode-se inferir também que o processo de neurodegeneração nos neurônios do hilo do giro denteado dorsal de camundongos apresenta um início rápido, evidenciado pelo escore máximo (quatro) de perda neuronal encontrado já no grupo 3 HP, e que este processo neurodegenerativo é um processo lento, evidenciado pelo perfil temporal encontrado na avaliação da presença de neurônios FJB+ encontrados nesta camada.

POIRIER et al. (2000), utilizando ratos, Fluoro-Jade e uma técnica de impregnação por prata, e interrompendo com diazepam o SE 1 hora após o seu início, realizou a contagem do número de neurônios Fluoro-Jade positivos e os corados pela prata nos stratum radiatum, stratum oriens, e pyramidale de CA1 e CA3 hipocampus e nas três camadas do giro denteado. A progressão do dano celular foi avaliada em 6 diferentes tempos após o início do SE: 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 1 semana e 3 semanas. Já no grupo de 3 horas, os autores detectaram neurônios impregnados pela prata nas camadas piramidais de CA1, CA3 e na camada polimórfica do giro denteado, sendo que o pico de expressão de neurônios marcados pela prata nestas regiões aconteceu 6 horas, 3 horas e 6 horas após início do SE, respectivamente. Os tipos neuronais marcados pela prata incluíram, segundo os autores, interneurônios hilares, e neurônios piramidais das regiões CA1 e CA3. O pico da expressão dos neurônios Fluoro-Jade positivos nas camadas piramidais de CA1 e CA3 hipocampus e no hilo do giro denteado ocorreu 1 semana após o início do SE. Em nosso estudo, o pico da expressão dos neurônios FJB+ também ocorreu no grupo 1 semana após o início do SE nas camadas piramidais de CA1 e CA3 do hipocampo dorsal e 12 horas após o início do SE no hilo do giro denteado dorsal.

Comparando-se nossos resultados com os encontrados por POIRIER et al. (2000), podemos supor que processos neurodegenerativos bioquímicos e temporalmente semelhantes possam estar ocorrendo em ratos e em camundongos, ao menos no nível do hipocampo dorsal. Esta suposição baseia-se no fato de que o Fluoro-Jade e Fluoro-Jade B são marcadores fluorescentes aniônicos, que possuem afinidade pelo mesmo tipo de molécula no neurônio em degeneração, embora com grau de afinidade diferente, sendo maior o do Fluoro-Jade B (SCHMUED e HOPKINS, 2000).

FABENE et al. (2004), dentre alguns parâmetros avaliados em seu trabalho, utilizaram o Fluoro-Jade B para a investigação dos fenômenos neurodegenerativos do hipocampo e giro denteado de ratos Wistar e *Proechimys guyannensis*, 8 h e 24 h após a primeira crise elicitada pela pilocarpina. Nos ratos Wistar, a quantidade de neurônios Fluoro-Jade B positivos foi similar em 8 h e 24 h em CA1, CA2, CA3 e giro denteado. No hilo houve um aumento significativo no grupo 24 h. Nos ratos *Proechimys* houve um leve aumento no número de neurônios Fluoro-Jade B positivos, porém não significativo, no grupo 24 h em CA2, CA3, giro denteado e hilo. Em CA1 houve um aumento significativo

no grupo 24 h. Assim como nos ratos Wistar e em *Proechimys* nos grupos 24 h após a primeira crise elicítada pela pilocarpina no trabalho de FABENE et al. (2004), em nossos resultados foram detectados neurônios Fluoro-Jade B positivos em todas as regiões da formação hipocampal escolhidas para a quantificação dos neurônios em degeneração no grupo 24 horas após o início do *status epilepticus* (grupo 24 HP).

BORGES et al. (2003), utilizando pilocarpina em camundongos, sacrificou-os em diferentes tempos (6 horas, 1 dia, 3 dias, 10 dias e 31 dias) sob profunda anestesia. Após a remoção de seus cérebros imergiu-os em paraformaldeído 4 % por no mínimo 10 horas antes da inclusão em parafina. Os cinco grupos experimentais formados, correspondentes aos diferentes tempos em que vieram a ser sacrificados, foram utilizados para a avaliação neuropatológica. Utilizando hematoxilina e eosina, a contagem dos neurônios hilares foi realizada e os autores encontraram uma perda celular hilar maior que 99 % já no grupo de 6 horas. Para as camadas piramidais CA1 e CA3 a avaliação da perda neuronal foi realizada atribuindo-se escores para os diferentes graus de lesão. Graus diversos de injúria celular piramidal (células inchadas, picnóticas ou perda neuronal celular) foram observadas em todos os grupos experimentais após o grupo 6 horas. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais com relação ao dano celular piramidal. Segundo os autores, após a avaliação de seus resultados em relação à perda celular em CA1 que foi geralmente menor do que em CA3, eles afirmaram que havia indicação de que a área CA3 era mais sensível a neurodegeneração induzida pela pilocarpina em camundongos que a área CA1, porém não discutiram os motivos fisiológicos ou patológicos que poderiam justificar esta afirmação. Nossos dados mostram que na camada piramidal de CA1, a lesão encontrada foi sempre de igual intensidade ou menor do que a encontrada na camada piramidal CA3. A hipótese para justificar esta ocorrência se encontra discutida precedentemente no item 5.3. da discussão desta presente tese.

5.5. Relação entre a(s) molécula(s) envolvida(s) em processos neurodegenerativos com a(s) sua(s) expressão(ões) em neurônios FJB+ na camada polimórfica do giro denteado

No presente trabalho, foi encontrada uma grande suscetibilidade ao insulto convulsivo nos neurônios hilares do giro denteado, evidenciada pelo fato de haver perda neuronal de escore 4 (máximo) já no grupo 3 HP e pela presença de animais deste grupo contendo neurônios FJB+. O escore 4 manteve-se em todos os outros tempos, o que nos permite supor que os neurônios que apresentaram morfologia alterada nos grupos de tempos mais curtos não se recuperariam e, portanto, se constituíam em neurônios em degeneração irreversível. A partir deste fato, uma outra hipótese pode ser levantada comparando-se os resultados da análise quantitativa dos neurônios FJB+. O pico da presença desses neurônios FJB+ foi no grupo 12 HP, o qual também apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos 3 HP e 3 SP. Assim, podemos supor que a presença crescente de neurônios FJB+ ao longo do tempo, com pico no grupo 12 HP e a diminuição progressiva nos grupos posteriores ao 12 HP, pode corresponder ao início da expressão, pico e o desaparecimento de molécula(s) intimamente relacionada(s) à neurodegeneração. A interação do Fluoro-Jade B com essa(s) molécula(s) dão pistas para se inferir a duração do processo neurodegenerativo sofrido pelos neurônios da camada polimórfica do giro denteado, no nível do hipocampo dorsal, dos camundongos submetidos ao SE induzido pela pilocarpina.

5.6. Putrescina como forte candidata a ser uma das moléculas marcadas com Fluoro-Jade B e mecanismo neuroprotetor associado a esta poliamina no Modelo de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina em Camundongos

SCHMUED e HOPKINS (2000), especularam baseados nas propriedades de Fluoro-Jade B, que moléculas com múltiplos grupos com cargas positivas tais como as poliaminas poderiam estar se ligando ao Fluoro Jade B. A partir das observações destes autores, eles verificaram que moléculas com uma forte atração eletrostática para Fluoro-Jade B in vitro incluem aminopropil-butanodiamina (espermidina), diaminobutano (putrescina) e diaminopentano (cadaverina); no entanto estes autores não sabiam dizer se Fluoro-Jade B se ligava ou não a alguma destas moléculas nos neurônios marcados positivamente para este marcador fluorescente.

As funções celulares das poliaminas naturais (putrescina, espermidina e espermina) são ainda amplamente desconhecidas, embora um grande número de estudos tem mostrado que estes compostos policatiônicos são cruciais para o crescimento e proliferação de células em mamíferos. Um grande número de experimentos tem mostrado que insultos de natureza física ou química ao cérebro inevitavelmente ativam a biossíntese das poliaminas pela indução de ornitina decarboxilase (ODC), a enzima que converte a ornitina em putrescina, e o concomitante acúmulo de putrescina. A espermidina e a espermina interagem como agonistas com o receptor NMDA (WILLIAMS et al., 1989; WILLIAMS et al., 1990), uma prolongada ativação das quais poderia ser responsável por dano neuronal (PASCHEN, 1992). Diferente das poliaminas de cadeias maiores acredita-se que a putrescina atue como um fraco antagonista do receptor NMDA (WILLIAMS et al., 1990). Experimentos com camundongos transgênicos e ratos superexpressando ODC tem gerado nova informação fortemente sugerindo que um aumentado acúmulo de putrescina no cérebro é mais uma medida neuroprotetora do que uma causa de dano neuronal (JÄNNE et al., 2004). Camundongos transgênicos superexpressando ODC apresentam a mais alta quantidade de putrescina no cérebro e no testículo. Em um experimento de longo tempo de sobrevivência, os animais transgênicos e isogênicos da mesma ninhada foram examinados e após 2 anos os transgênicos não apresentaram nenhum sinal microscópico ou macroscópico de neurodegeneração em seus cérebros (ALHONEN et al., 1995), significando que a superexpressão constitutiva de ODC e o acúmulo aumentado de putrescina no cérebro é tolerado sem qualquer consequência prejudicial. Experimentos subsequentes com camundongos transgênicos que superexpressam putrescina indicou que estes animais mostraram um limiar significativamente elevado para convulsão por estímulos químico (pentilenotetrazol) e físico (eletrochoque) e prejudicado aprendizado espacial e em testes de memória. O limiar para convulsão não foi devido a quaisquer mudanças nos níveis cerebrais de glutamato e nem do GABA (HALONEN et al., 1993). O Mg^{2+} atua como um bloqueador fisiológico voltagem-dependente das correntes excitatórias mediadas pelo glutamato, inibindo a condução de íons do canal do receptor NMDA (NOWAK et al., 1984). Portanto, elevado Mg^{2+} livre poderia potencialmente bloquear o receptor NMDA. Um trabalho com camundongos transgênicos que superexpressam o gene para a ODC humana revelou uma redução significativa de 40 % da quantidade de Mg^{2+} no

cérebro de animais transgênicos (KAUPPINEN et al., 1992), abrindo a possibilidade para a suposição de que o limiar elevado para a convulsão seja devido a uma ação antagonizante nos receptores NMDA mais em função da atuação da putrescina nesses receptores do que do Mg^{2+} livre nestes mesmos receptores nestes animais transgênicos. Estes resultados, analisados juntos, sugerem que a putrescina endógena poderia ter um relevante papel fisiológico no receptor NMDA (JÄNNE et al., 2004).

Espermidina e espermina podem ser convertidas de volta a putrescina pela ação da espermidina/espermina N^1 -acetiltransferase (SSAT) e PAO (poliamina oxidase). PAO é constitutivamente expressa e fortemente prefere poliaminas como substratos (HÖLTTÄ, 1977) enquanto que SSAT é altamente induzível, tem uma curtíssima meia-vida e serve como enzima controladora na taxa de conversão na poliamina (CASERO e PEGG, 1993). Em comparação com camundongos transgênicos para ODC, camundongos transgênicos que superexpressam SSAT resultaram em até uma maior expansão nos níveis de putrescina em diferentes regiões do cérebro. Análises de hibridação *in situ* dos camundongos transgênicos indicaram que SSAT foi superexpressado em todos os tecidos cerebrais (KAASINEN et al., 2000). A superexpressão de SSAT parece proteger animais transgênicos da toxicidade induzida por cainato. Isto foi manifestado pela redução substancial (50 %) da mortalidade dos camundongos transgênicos em comparação aos isogênicos, em resposta a alta dose de cainato. A transgenicidade igualmente ofereceu uma distinta neuroproteção exibida pela redução da proteína acídica fibrilar glial (GFAP), um marcador de reação glial em regiões de injúria neuronal, e nenhuma perda de neurônios hipocampais em resposta ao uso do cainato (KAASINEN et al., 2000). JÄNNE et. al. (2004) sugeriram que os níveis aumentados de putrescina, independentemente se foram originados da superexpressão de ODC ou SSAT, têm um distinto papel neuroprotetor.

Os dados obtidos no presente trabalho de tese com relação à expressão de Fluoro-Jade B nos neurônios em degeneração permitiram-nos, juntamente com informações obtidas na literatura, a formulação de duas hipóteses. A primeira é que estes neurônios em degeneração expressam putrescina e ao menos esta poliamina se encontra ligada ao Fluoro-Jade B nos neurônios marcados positivamente para o Fluoro-Jade B. E a segunda hipótese é que esta putrescina expressada em neurônios em degeneração decorrente do SE represente um mecanismo celular de neuroproteção à excitotoxicidade o qual funcionaria da seguinte

maneira: uma vez que Fluoro-Jade B marca neurônios irreversivelmente em degeneração, a putrescina presente nos neurônios submetidos ao SE representaria um excedente produzido pelo neurônio para enviá-la aos receptores NMDA, os quais atuariam sobre o sítio de ligação para esta poliamina, exercendo seu efeito de antagonismo para este receptor, e desta forma interromperia o fluxo excessivo de cálcio durante o *status epilepticus*, conferindo neuroproteção; porém, devido à falência de mecanismos que permitiriam a esta poliamina se ligar ao receptor NMDA, este excedente permaneceria no citoplasma, evidenciado pelo Fluoro-Jade B, até o momento em que o neurônio em degeneração desapareça. Neurônios que sobreviveram ao insulto excitotóxico podem ter sido protegidos devido a esta suposta ação neuroprotetora exercida pela putrescina somada ou não ao tamponamento do excesso de cálcio realizado pelas proteínas ligantes de cálcio.

5.7. Necrose versus apoptose

Existe uma considerável controvérsia com relação ao grau de dano apoptótico com crises convulsivas induzidas por pilocarpina e ácido caínico (BENZON, 2002). A natureza do dano celular granular do giro denteado em epilepsia tem sido reportada como apoptótica, necrótica ou ambas. Os defeitos das técnicas utilizadas para detecção de apoptose aumentam o problema na identificação do modo de degeneração. Há evidência que a marcação de TUNEL *in situ* poderia dar falso positivo marcando células necróticas e a detecção do padrão de escada de corda em géis de agarose poderia não ser exclusiva de células apoptóticas (CHARRIAUT-MARLANGUE e BEN-ARI, 1995; FUJIKAWA, 2000; FUJIKAWA et al., 2000b; BENZON et al., 2002).

COVOLAN et al. (2000), utilizando ratos machos e pilocarpina para indução do SE, analisaram por intermédio de microscopia eletrônica, o perfil temporal das mudanças celulares de neurônios em processo de morte na camada granular do giro denteado, em quatro intervalos de tempo após o início do SE (2 horas e meia, 5, 8, 24 e 48 horas). Uma variedade de morfologias abrangendo características de apoptose e necrose foi vista em todos os tempos estudados. Os achados indicaram, segundo estes autores, que o SE induzido pela pilocarpina promove, na camada granular do giro denteado, um processo degenerativo onde características de apoptose e necrose se sobrepõem.

FUJIKAWA et al. (2000), trabalhando com ratos machos Wistar, induziram SE de três horas de duração, utilizando lítio-pilocarpina e ácido caínico, com períodos de 24 horas e 72 horas de recuperação antes do sacrifício e avaliaram seções cerebrais utilizando H & E, técnica de TUNEL e paralelamente eletroforese em gel de agarose para examinar a presença ou ausência de clivagem internucleossomal do DNA. Nos dois tempos experimentais escolhidos (24 e 72 horas) a morte neuronal no hipocampo, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal e córtex frontal foram morfológicamente necróticos, apesar da detecção da clivagem internucleossomal nestas regiões nesses dois tempos e marcação positiva para TUNEL em algumas das regiões 72 horas após o SE. Ultraestruturalmente, neurônios necróticos estavam escuros e encolhidos, com vacúolos citoplasmáticos e núcleos picnóticos apresentando massas de cromatina dispersas, irregulares e pequenas. Segundo os autores, seus resultados juntamente a outros trabalhos, sugerem que mecanismos promotores de morte celular programada são ativados pelo SE em neurônios que se tornam preferencialmente necróticos a apoptóticos e apontam para a possibilidade de que tais mecanismos poderiam contribuir para a necrose neuronal induzida pelo SE.

Não há na literatura evidência de que Fluoro-Jade B possua especificidade somente para neurônios necróticos ou somente para neurônios apoptóticos. Dada a sua característica aniônica, pode-se acreditar que este marcador fluorescente seja inespecífico para a determinação do tipo de morte neuronal, uma vez que tanto neurônios necróticos como apoptóticos devam expressar, durante o processo neurodegenerativo, moléculas carregadas positivamente que viriam a ser marcadas por Fluoro-Jade B. Portanto, estudos que foquem avaliar o grau de apoptose em uma dada população neuronal, devem utilizar outros métodos específicos para a detecção deste tipo de processo degenerativo, levando-se em consideração, evidentemente, as limitações de cada método (CRUCHTEN e BROECK, 2002).

5.8. Implicações clínicas dos resultados desta tese

Uma grande contribuição deste trabalho está no fato de que o conhecimento obtido através dele com relação ao perfil temporal do dano neuronal induzido pelo SE e eventos associados a este perfil é importante, não somente para o oferecimento de informações que auxiliem na compreensão dos mecanismos neurodegenerativos envolvidos, mas também

para o uso deste modelo para o planejamento da intervenção de drogas candidatas a neuroprotetoras após o início do SE.

Os próprios mecanismos fisiológicos de neuroproteção sugeridos no presente trabalho de tese podem fornecer idéias para a escolha e o teste de substâncias que atuem semelhantemente a tais mecanismos, para se chegar a drogas eficazes em neuroproteção.

O presente trabalho de tese oferece um grande auxílio para pesquisadores que forem utilizar camundongos em SE induzido por pilocarpina em camundongos, pois juntamente ao fato de ter sido realizada na mesma espécie animal, as informações resultantes desta tese oferecem subsídios para a criação do desenho experimental e para a posterior análise dos resultados decorrentes deste desenho.

Finalmente, a semelhança entre os dados comportamentais e neuropatológicos obtidos nos camundongos neste trabalho de tese e os encontrados em pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal corrobora para a idéia da utilização do Modelo de Indução de Epilepsia por Pilocarpina em Camundongos como um modelo confiável e reproduzível para o estudo dos eventos fisiopatológicos relacionados à Epilepsia do Lobo Temporal.

6. Conclusões

A partir dos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

1. A padronização da duração do *status epilepticus* em no mínimo 6 horas é suficiente para reproduzir um quadro neuropatológico na formação hipocampal de camundongos similar à descrita na esclerose hipocampal no Modelo de Epilepsia induzido por Pilocarpina em ratos e na encontrada em pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal.
2. O dano neuronal encontrado neste trabalho nas camadas piramidais das regiões CA1 e CA3 do hipocampo dorsal, no hilo e camada granular do giro denteado dorsal após o SE induzido pela pilocarpina em camundongos, as quais recebem inervações glutamatérgicas, reforça a idéia de que a estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos pela pilocarpina inicia crise convulsiva a qual progressivamente envolve o sistema glutamatérgico, causando uma excessiva liberação de glutamato por neurônios glutamatérgicos, que pode culminar na morte neuronal por excitotoxicidade.
3. A morte e a resistência encontradas nos neurônios submetidos ao SE induzido pela pilocarpina na formação hipocampal nos camundongos neste trabalho de tese e a presença de proteínas ligantes de cálcio e sua ação tamponante relatados na literatura correlacionam-se de modo a permitir a inferência de uma ação fisiológica neuroprotetora destas proteínas no fenômeno da excitotoxicidade nestes camundongos.
4. O escore máximo de lesão para a perda neuronal no hilo do giro denteado já no grupo experimental de menor tempo e a expressão máxima e significativa de neurônios em degeneração irreversível (evidenciadas pelo Fluoro-Jade B) já no grupo de 12 horas após o início do SE demonstra que assim como em ratos, a camada polimórfica do giro denteado é a região mais sensível à morte neuronal entre as camadas envolvidas na esclerose hipocampal causada pelo SE induzido pela pilocarpina.

5. Os perfis temporais da perda neuronal na região da camada polimórfica do giro denteado evidenciada pelo violeta de cresila e da expressão de neurônios FJB+ nesta camada, permite a inferência de que a interação do Fluoro-Jade B com a(s) molécula(s) presente(s) nestes neurônios desta região fornece pistas sobre a duração do processo neurodegenerativo sofrido pelos neurônios da camada polimórfica do giro denteado, no nível do hipocampo dorsal, dos camundongos submetidos ao SE induzido pela pilocarpina.

6. Após 1 semana da indução do SE, as camadas piramidais CA1 e CA3 do hipocampo dorsal de camundongos apresentam uma quantidade significativa de neurônios em degeneração irreversível, evidenciada pelo Fluoro-Jade B.

7. O perfil temporal dos neurônios irreversivelmente em degeneração, evidenciado pelo Fluoro-Jade B, no presente trabalho de tese foi similar ao perfil encontrado no trabalho em ratos, que utilizou pilocarpina para a indução do SE e Fluoro-Jade para marcação dos neurônios em degeneração irreversível.

8. As informações referentes ao perfil temporal das lesões em diferentes regiões da formação hipocampal relatados neste trabalho fornecem subsídios para a elaboração de desenhos experimentais, execução e interpretação de resultados em futuros trabalhos que visem o estudo de drogas candidatas a neuroproteção em camundongos submetidos ao SE induzido pela pilocarpina em camundongos.

9. A semelhança entre os dados comportamentais e neuropatológicos obtidos nos camundongos neste trabalho de tese e os relatados na literatura em relação aos encontrados em pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal corrobora para a idéia da utilização do Modelo de Indução de Epilepsia por Pilocarpina em Camundongos como um modelo confiável e reproduzível para o estudo dos eventos fisiopatológicos relacionados à Epilepsia do Lobo Temporal.

7. Referências Bibliográficas

ALHONEN, L.; HALMEKYTÖ, M.; KOSMA, V.M.; WAHLFORS, J.; KAUPPINEN, R.; JÄNNE, J. Life-long over-expression of ornithine decarboxylase (ODC) gene in transgenic mice does not lead to generally enhanced tumorigenesis or neuronal degeneration. *Int J Cancer*, 63: 402-404, 1995.

ALKONDON, M.; PEREIRA, E.F.; EISENBERG, H.M.; ALBUQUERQUE, E.X. Choline and selective agonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, 19: 2693-2705, 1999.

AMARAL, D.G.; KURZ, J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol*, 240: 37-59, 1985.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34: 325-337, 2003.

AUER, R.N.; OLSON, Y; SIESJO, B.K. Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes*, 33: 1090-1098, 1984.

AVANZINI, G.; FARIELLO R. Animal models of epilepsies. In: Avanzini, G.; Regesta, G.; Tanganelli, P. and Avoli, M. (eds.) *Molecular and Celular targets for anti-epileptic drugs*. John Libbey & Company Ltd., London, (1997), pp. 91-109.

AZNAVOUR, N.; MECHAWAR, N; DESCARRIES, L. Comparative analysis of cholinergic innervation in the dorsal hippocampus of adult mouse and rat: a quantitative immunocytochemical study. *Hippocampus*, 12: 206-217, 2002.

BABB, T.L.; BROWN, W.J. Pathological findings in epilepsy. In: Engel, J.J. (ed.) *Surgical treatment of the epilepsies*. Raven Press, New York, (1987), pp. 511-540.

BENZON, J.; MOHAPEL, P.; EKDAHL, C.T.; LINDVALL, O. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. *Progress in Brain Research*, 135: 111-119, 2002

BENSON, D.M.; BLITZER, R.D.; LANDAU, E.M. An analysis of the depolarization produced in guinea-pig hippocampus by cholinergic receptor stimulations. *J Physiol (Lond)*, 404: 479-496, 1988.

BERNADO, L.S.; PRINCE, D.A. Acetylcholine induced modulation of hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res*, 211: 227-234, 1981.

BETTLER, B.; MULLE, C. Neurotransmitter receptors II. AMPA and kainite receptors. *Neuropharmacology*, 34: 123-139, 1995.

BLAKER, S.N.; ARMSTRONG, D.M.; GAGE, F.H. Cholinergic neurons within the rat hippocampus: response to fimbria-fornix transection. *J Comp Neurol*, 272: 127-138, 1988.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39, 1993.

BORGES, K.; GEARING, M.; McDERMOTT, D.L.; SMITH, A.B.; ALMONT, A.G.; WAINER, B.H.; DINGLEDINE, R. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Experimental Neurology*, 182: 21-34, 2003.

CAMMERMEYER, J. The importance of avoiding the 'dark' neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol*, 1: 245-270, 1961.

CASERO, R.A.; PEGG, A.E. Spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase – the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J*, 7: 653-661, 1993.

CAVALHEIRO, E.A.; LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; TURSKI, W.A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, 32 (6): 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*, 16: 33-37, 1995.

CAVALHEIRO, E.A.; SANTOS, N.F.; PRIEL, M.R. The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia*, 37: 11015-1019, 1996.

CENDES, F.; KOBAYASHI, E. Epilepsia de Lobo Temporal. In: Guerreiro, C.A.M.; Guerreiro, M.M.; Cendes, F.; Lopes-Cendes, I. *Epilepsia*, 3^a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, (2000), pp. 201-213.

CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; BEN-ARI, Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*, 7: 61-64, 1995.

CHASSAN, J.L. Nervous system. In: W.A.D. Anderson and J.M. Kissane (Eds.), *Pathology*, Mosby, St. Louis, 2074-2148, 1977.

CHEN, Z.; LJUNGGREN, H.G.; BOGDANOVIC, N.; NENNESMO, I.; WINBLAD, B.; ZHU, J. Excitotoxic neurodegeneration induced by intranasal administration of kainic acid in C57BL/6 mice. *Brain Res*, 931: 135-145, 2002.

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1: 623-634, 1988.

CHOI, D.W. Excitatory cell death. *J Neurobiol*, 23: 1261-1276, 1992.

CLIFFORD, D.B; OLNEY, J.W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R.C.; ZORUMSKI, C. F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*, 23: 953-968, 1987.

COLE, A.E.; NICOLL, R.A. The pharmacology of cholinergic excitatory responses in hippocampal pyramidal cells. *Brain Research*, 305: 283-290, 1984.

COLLINGRIDGE, G.L.; SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 290-296, 1990.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndrome. *Epilepsia*, 30: 389-399, 1989.

COVOLAN, L.; MELLO, L.E.A.M. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine our kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Research*, 39: 133-152, 2000.

COVOLAN, L.; SMITH, R.L.; MELLO, L.E.A.M. Ultrastructural identificatio of dentate granule cell death from pilocarpina-induced seizures. *Epilepsy Research*, 41: 9-21, 2000.

CRUCHTEN, S.V.; BROECK, V.D. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*, 31: 214-223, 2002.

De ROBERTIS, E.D.P.; De ROBERTIS, E.M.F.J. A maquinaria para a síntese protéica. In: De Robertis, E.D.P.; De Robertis, E.M.F.J. (eds.) *Bases da Biologia Celular e Molecular*, 2ª Ed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, (1993), pp.243-261.

ENGEL, J.J. Epileptic syndromes. In: *Seizures and Epilepsy*. Philadelphia: F.A. Davis Company: 195-201, 1989.

ENGEL, J.J. Update on surgical treatment of the epilepsies. *Neurology*, 43: 1612-1617, 1993.

ENGEL, J.J. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*, 26: 141-150, 1996.

ERLANDER, M.G.; TOBIN, A.J. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res*, 16: 215-226, 1991.

FABENE, P.F.; ANDRIOLI, A.; PRIEL, M.R.; CAVALHEIRO, E.A.; BENTIVOGLIO, M. Fos induction and persistence, neurodegeneration, and interneuron activation in the

hippocampus of epilepsy-resistant versus epilepsy-prone rats after pilocarpine-induced seizures. *Hippocampus*, 14: 895-907, 2004.

FAHERTY, C.L.; XANTHODAKIS, S.; SMEYNE, R.J. Caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Brain Res Mol Brain Res*, 70: 159-163, 1999.

FERN, R.; MOLLER, T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci*, 20: 34-42, 2000.

FERNANDES, A.M.A.P.; MAURER-MORELLI, C.V.; CAMPOS, C.B.L.; MELLO, M.L.S.; CASTILHO, R.F.; LANGONE, F. Fluoro-Jade, but not Fluoro-Jade B, stains non-degenerating in brain and retina of embryonic and neonatal rats. *Brain Research*, in press, 2004.

FINK, R.P.; HEIMER, L. Two methods for the selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system, *Brain Res*, 4: 369-374, 1967.

FRANKLIN, K.B.J.; PAXINOS, G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, 1997.

FREUND, T.F.; BUZSÁKI, G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6: 347-470, 1996.

FROTSCHER, M.; SCHLANDER, M.; LERANTH, C. Cholinergic neurons in the hippocampus. A combined light- and electron-microscopic immunocytochemical study in the rat. *Cell Tissue Res*, 246: 293-301, 1986.

FUJIKAWA, D.G. The evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Research*, 725: 11-22, 1996.

FUJIKAWA, D.G. Confusion between neuronal apoptosis and activation of programmed cell death mechanisms in acute necrotic insults. *Trends Neurosci*, 23: 410-411, 2000.

FUJIKAWA, D.G.; SHINMEI, S.S.; CAI, B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia*, 41(Suppl. 6): 9-13, 2000a.

FUJIKAWA, D.G.; SHINMEI, S.S.; CAI, B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience*, 98: 41-53, 2000b.

FUJISE, N.; LIU, N.Y.; HORI, N.; KOSAKA, T. Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus: II. Mossy cells, with special reference to their dorsoventral difference in calretinin immunoreactivity. *Neuroscience*, 82 (1): 181-200, 1998.

FUKUDA, T.; HEIZMANN, C.W.; KOSAKA, T. Quantitative analysis of GAD65 and GAD67 immunoreactivities in somata of GABAergic neurons in the mouse hippocampus proper (CA1 and CA3 regions), with special reference to parvalbumin-containing neurons. *Brain Research*, 764: 237-243, 1997.

FUKUDA, T.; AIKA, Y.; HEIZMANN, C.W.; KOSAKA, T. GABAergic axon terminals at perisomatic and dendritic inhibitory sites show different immunoreactivities against two GAD isoforms, GAD67 and GAD65, in the mouse hippocampus: a digitized quantitative analysis. *The Journal of Comparative Neurology*, 395: 177-194, 1998.

GALLYAS, F.; WOLF, J.R.; BOTTCHEER, H.; ZABORSKY, L. A reliable and sensitive method to localize terminal degeneration and lysosomes in the central nervous system. *Stain Technol*, 55:299-306, 1980.

GARCIA, J.H.; KAMIJIYO, Y. Cerebral infraction: evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol*, 33: 409-421, 1974.

GLOOR, P. Mesial temporal sclerosis: historical background and an overview from a modern perspective. In: Luders, H. (ed.) *Epilepsy surgery*, Raven Press, New York, (1991), pp. 909-917.

GRAHAN, S.H.; CHEN, J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21: 99-109, 2001.

GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. Considerações Gerais. In: Guerreiro, C.A.M.; Guerreiro, M.M.; Cendes, F.; Lopes-Cendes, I. *Epilepsia*, 3^a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, (2000), pp. 1-10.

GUNDERSEN, H.J.G. Estimators of the number of objects per área unbiased by edge effects. *Microsc Acta*, 81: 107-117, 1978.

GUNDERSEN, H.J.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L. MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B. VESTERBY, A.; WEST, M.J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96: 379-394, 1988.

HALONEN, T.; SIVENIUS, J.; MIETTINEN, R.; HALMEKYTÖ, M.; KAUPPINEN, R.; SINVERVIRTA, R.; ALAKUIJALA, L.; ALHONEN, L.; MacDONALD, E.; JÄNNE, J. et al. Elevated seizure threshold and impaired spatial learning in transgenic mice with putrescine overproduction in the brain. *Eur J Neurosci*, 5: 1233-1239, 1993.

HAMILTON, S.E.; LOOSE, M.D.; QI, M.; LEVEY, A.I.; HILLE, B.; STANLEY, M.; IDZERDA, R.L.; NATHANSON, N.M. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13311-13316, 1997.

HENSHALL, D.C.; SKRADSKI, S.L.; LAN, J.; REN, T.; SIMON, R.P. Increased Bcl-w expression following focally evoked limbic seizures in the rat. *Neurosci Lett*, 305: 153-156, 2001.

HÖLLTÄ, E. Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase. *Biochemistry*, 16: 91-100, 1977.

HOUSER, C.R.; CRAWFORD, G.D.; BARBER, R.P.; SALVATERRA, P.M.; VAUGHN, J.E. Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res*, 266: 97-119, 1983.

ISOKAWA, M. Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy. *Brain Research*, 744: 339-343, 1997.

JÄNNE, J.; ALHONEN, L.; PIETILÄ, M.; KEINÄNEN, T.A. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur J Biochem*, 271: 877-894, 2004.

Jl, D.; DANI, J.A. Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons of activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *J Neurophysiol*, 83: 2682-2690, 2000.

JÚNIOR, R. M.; NIEMEYER, P.; BELLO, H. Histórico da cirurgia da epilepsia. In: Costa, J. C.; Palmini, A.; Yacubian, E. M. T.; Cavalheiro, E. A. *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias*, São Paulo, Lemos Editorial & Gráficos Ltda. (1998), 2, Part 6-B, pp. 1045-1058.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Tecido Nervoso. In. Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Histologia Básica*. 8ª Ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., (1995a), pp. 127-158.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Tecido Nervoso. In. Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Histologia Básica*. 8ª Ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., (1995b), pp. 36-45.

KAASSINEN, K.; KOISTINAHO, J.; ALHONEN, L.; JÄNNE, J. Overexpression of spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase in transgenic mice protects the animals from kainite-induced toxicity. *Eur J Neurosci*, 12: 540-548, 2000.

KAUPPINEN, R.A.; ENKVIST, K.; HOLOPAINEN, I.; AKERMAN, K.E. Glucose deprivation depolarizes plasma membrane of cultured astrocytes and collapses transmembrane potassium and glutamate gradients. *Neuroscience*, 26: 283-289, 1988a.

KAUPPINEN, R.A.; McMAHON, H.T.; NICHOLLS, D.C. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca^{2+} concentration in

isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycaemia and anoxia. *Neuroscience*, 27: 175-182, 1988b.

KAUPPINEN, R.A.; HALMEKYTÖ, M.; ALHOEN, L.; JÄNNE, J. Nuclear magnetic resonance spectroscopy study on energy metabolism, intracellular pH, and free Mg²⁺ concentration in the brain of transgenic mice overexpressing human ornithine decarboxylase gene. *J Neurochem*, 58: 831-836, 1992.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.

KUTCHAI, H.C. Transmissão Sináptica. In: Berne, R.M.; Levy, M.N. *Fisiologia*. 4^a Ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., (2000), pp. 42-56.

LEIST, M.; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral; from caspases to alternative mechanisms. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2: 589-598, 2001.

LEMOS, T.; CAVALHEIRO, E.A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res*, 102: 423-428, 1995.

LERMA, J.; MORALES, M.; VICENTE, M.A.; HERRERA, O. Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends Neurosci*, 29: 9-12, 1997.

LIU, A.K.F.; CLARK, R.S.; HENSHALL, D.C.; YIN, X.M.; CHEN, J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Progress in Neurobiology*: 103-142, 2003.

LOTHMAN, E.W.; REMPE, D.A.; MANGAN, P.S. Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol*, 74: 841-848, 1995.

MADISON, D.V.; LANCASTER, B.; NICOLL, R.A. Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *J Neurosci*, 7: 733-741, 1987.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146: 3-15, 1995.

MARTIN, D.L.; RIMVALL, K. Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem*, 60: 395-407, 1993.

MARTIN, L.J.; AL-ABDULLA, N.A.; BRAMBRINK, A.M.; KIRSCH, J.R.; SIEBER, F.E.; PORTERA-CAILLIAU, C. Neurodegeneration excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*, 46: 281-309, 1998.

MATSON, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 1 120-129, 2000.

MATYAS, F.; FREUND, T.F.; GULYÁS, A.I. Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of the mouse strains used in transgenic technology. *Hippocampus*, 14:460-481, 2004.

McKINNEY, M.; COYLE, J.T.; HEDREEN, J.C. Topographic analysis of the innervation of the rat neocortex and hippocampus by the basal forebrain cholinergic system. *J Comp Neurol*, 217: 103-121, 1983.

McQUISTON, A.R.; MADISON, D.V. Muscarinic receptor activity has multiple effects on the resting membrane potentials of CA1 hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 19: 5693-5702, 1999a.

McQUISTON, A.R.; MADISON, D.V. Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 19: 2887-2896, 1999b.

MEENCKE, H.J.; VEITH, G. Hippocampal sclerosis in epilepsy. In: Luders, H. (ed.) *Epilepsy surgery*, Raven Press, New York, (1991), pp. 705-715.

MELLO, L.E.; CAVALHEIRO, E.A.; TAN, A.M.; PRETORIUS, J.K.; BABB, T.L.; FINCH, D.M. Granule cell dispersion in relation to mossy fiber sprouting, hippocampal cell loss, silent period and seizure frequency in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res*, (Suppl) 9: 51-59, 1992.

MELDRUM, B.S.; AKBAR, M.T.; CHAPMAN, A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res*, 36 (2-3): 189-204, 1999.

MIELKE, K.; BRECHT, S.; DORST, A.; HERDEGEN, T. Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainite-induced seizures. *Neuroscience*, 91: 471-48, 1999.

MUGNAINI, E.; OERTEL, W.H. An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In: A. Bjöklund and T. Hökfelt (eds): GABA and neuropeptides in the CNS, part I. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, (1985), 4, pp. 436-608.

NAUTA, W.J.H.; GYGAX, P.A. Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system: a modified technique. *Stain Technol*, 29: 91-93, 1954.

NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBET, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307: 462-465, 1984.

NYAKAS, C.; LUITEN, P.G.; SPENCER, D.G.; TRABER, J. Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervations of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res Bull*, 18: 533-545, 1987.

de OLMOS, J.S.; BELTRAMINO, C.A.; de OLMOS de LORENZO, S. Use of an amino-cupric-silver for the detection of early and simiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicantes, hypoxia, and physical trauma. *Neurotoxicol Teratol*, 16: 545-561, 1994.

OLNEY, J.W. Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate, *Science*, 164: 719-721, 1969.

OLNEY, J.W.; deGUBAREFY, T.; LABRUYERE, J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. *Nature*, 301: 520-522, 1983.

ONISHI, B.K.A. Coloração de Nissl por Violeta de Cresila. In: Xavier, G.F. *Técnicas para o estudo do sistema nervoso*. 1^a Ed., Editora Plêiade, São Paulo, 1999, pp. 93-104.

OZAWA, S; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54: 581-618, 1998.

PASCHEN, W. Polyamine metabolism in different pathological states of the brain. *Mol Chem Neuropathol*, 16: 241-271, 1992.

POIRIER, J.L.; CAPEK, R.; DE KONINCK, Y. Differential progression of dark neuron and fluoro-jade labeling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience*, 97(1): 59-68, 2000.

RADCLIFFE, K.A.; DANI, J.A. Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci*, 18: 7075-7083, 1998.

RADCLIFFE, K.A.; FISHER, J.L.; GRAY, R.; DANI, J.A. Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission. *Ann NY Acad Sci*, 868: 591-610, 1999.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17: 3225-3236, 1998.

RIBAK, C.E.; VAUGHN, J.E.; SAITO, K. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res*, 140: 315-332, 1978.

ROUX, P.P.; COLICOS, M.A.; BARKER, P.A.; KENNEDY, T.E. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J Neurosci*, 19: 6887-6896, 1999.

RYE, D.B.; WAINER, B.H.; MESULAM, M.M.; MUFSON, E.J.; SAPER, C.B. Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 13: 627-643, 1984.

SANABRIA, E.R.G.; CAVALHEIRO, E.A. Epileptogênese: Contribuição dos modelos experimentais. In: Guerreiro, C.A.M.; Guerreiro, M.M.; Cendes, F.; Lopes-Cendes, I. *Epilepsia*, 3^a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 2000, pp. 29-57.

SANTOS, N.F. *Desenvolvimento do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em camundongos*. São Paulo, UNIFESP - Escola Paulista de Medicina, 61 p. 1995. Dissertação de Tese (Mestre em Neurociência). Universidade Federal de São Paulo.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med*, 78: 3-13, 2000.

SAVINAIMEN, A.; GARCIA, E.P.; DOROW, D.; MARSHALL, J. e LIU, Y.F. Kainate receptor activation induces mixed lineage kinase-mediated cellular signaling cascades via post-synaptic density protein 95. *J Biol Chem*, 276: 11382-11386, 2001.

SCHMUED, L.C.; ALBERTSON, C.; SLIKKER Jr., W. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Research*, 751: 37-46, 1997.

SCHMUED, L.C.; HOPKINS, K.J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research*, 874: 123-130, 2000.

SCHMUED, L.C.; SLIKKER Jr., W.; WANG, G.J. Fluoro-Jade B: a bis homolog of Fluoro-Jade with improved degenerate neurons staining properties. *Soc Neurosci Ab*, 24: 1064, 1998.

SCHAUWECKER, P.E. Differences in ionotropic glutamate receptor subunit expression are not responsible for strain-dependent susceptibility to excitotoxin-induced injury. *Molecular Brain Research*, 112: 70-81, 2003.

SERESS, L; RIBAK, C.E. GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Exp Brain Res*, 50: 173-182, 1983.

SIESJO, B.K. Cell amage in te brain: a speculative synthesis. *Cereb Blood Metab*, 1: 155-185, 1981.

SLOMIANKA, L.; DONOVAN, J. Distribution of mossy fibres in the hippocampus of two closely related species of mice. *Brain Research*, 732: 253-256, 1996.

STENSAAS, S.S.; EDWARDS, C.Q.; STENSAAS, L.J. An experimental study of hyperchromic nerve cells in the cerebral cortex. *Exp Neurol*, 36: 472-487, 1972.

SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 672-684, 2003.

TIMIANSKI, M.; TATOR, C.H. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*, 38: 1176-1195, 1996.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z; TURSKI L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, 9: 315-335, 1983a.

TURSKI, W.A.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z; TURSKI L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia*, 39: 1408-1411, 1983b.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; MELLO, L.M.; SCHWARZ, M. e Z; TURSKI L. Seizures produced by pilocarpine in mice: electroencephalographic and morphologicals analysis. *Brain Research*, 321: 237-253, 1984.

van der ZEE, E.A.; LUITEN, P.G. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*, 58: 409-471, 1999.

WALKER, N.I.; HARMON, B.V.; GOBE, G.C.; KERR, J.F. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*, 13: 18-54, 1988.

WILLIAMS, K.; ROMANO, C.; MOLINOFF, P.B. Effects of polyamines on the binding of [3H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol Pharmacol*, 36: 575-581, 1989.

WILLIAMS, K.; DAWSON, V.L.; ROMANO, C.; DICHTER, M.A.; MOLINOFF, P.B. Characterization of polyamines having, agonist, antagonist, and inverse effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron*, 5: 199-208, 1990.

WILLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURIE, A.R. Cellular events in the adrenal cortex following ACTH deprivation. *J Pathol*, 106 ix, 1972

WILLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68: 251-306, 1980.

WOOLF, N.J. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol*, 37: 475-524, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION home page. EPILEPSY: An Historical Overview. Fact Sheets, February 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact168.html>>. Acesso em: 31 ago. 2003.

ZHANG, L.X.; SMITH, M.A.; LI, X.L.; WEISS, S.R.; POST, R.M. Apoptosis of hippocampal neurons after amygdala kindled seizures. *Brain Res Mol Brain Res*, 55: 198-208, 1998.

ZILLES, K.; WU, J.; CRUSIO, W.E.; SCHWEGLER, H. Water maze and radial maze learning and the density of binding sites of glutamate, GABA, and serotonin receptors in the hippocampus of inbred mouse strains. *Hippocampus*, 10: 213-225, 2000.