

***Prêmio Aristides Leão\****

## **A Proliferação de Neurônios Granulares Hipocampais Aumenta e os Dendritos dos Novos Neurônios São Anormais no Modelo Experimental de ELT Induzida por Pilocarpina**

Gabriel Maisonnave Arisi, Norberto Garcia-Cairasco

Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

### RESUMO

A imunohistoquímica para doublecortin (DCX), um marcador endógeno de neurogênese, foi utilizada para quantificar e estudar a morfologia dos novos neurônios granulares no modelo de epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina. Vinte e sete ratos Wistar machos foram tratados com metil-escopolamina e pilocarpina. Os animais foram tratados com diazepam 90 min após o início do *status epilepticus* (SE). Sete ratos controles receberam injeções de escopolamina, salina no lugar de pilocarpina e diazepam. Os animais foram monitorados 8 h por dia para observação de crises recorrentes espontâneas. Trinta dias após o SE os animais foram profundamente anestesiados, perfundidos e o tecido nervoso foi congelado. Uma série de cortes de todo o hipocampo foi realizada em criostato. Quatro seções de cada animal foram processadas para a imunohistoquímica de DCX de acordo com Rao e Shetty (2004). As seções imunomarcadas foram observadas em um microscópio conectado a um computador executando o programa Stereo Investigator. O método estereológico do fracionador óptico foi utilizado com o delineamento da camada granular (GCL) e da zona subgranular (SGZ) do giro denteado (GD) e os neurônios DCX-positivos presentes foram contados. Neurônios DCX-positivos tiveram sua morfologia reconstruída ( $n = 20$  por grupo) com o programa NeuroLucida. A análise de esferas concêntricas de Sholl foi utilizada para medir a distribuição dos dendritos. A primeira esfera tinha o raio igual à espessura da GCL, as esferas seguintes possuíam raios com incrementos de  $50 \mu\text{m}$  a partir da primeira. A reação de neo-Timm foi realizada de acordo com Danscher (2004). A escala de Cavazos (1991) foi utilizada para medir o brotamento das fibras musgosas na camada molecular interna. Os grupos foram comparados utilizando-se o teste t de Student ou o de Mann-Whitney, e os valores expressos como média  $\pm$  EPM.

Dezessete ratos tratados com pilocarpina desenvolveram SE e dez desses ratos morreram. O monitoramento registrou uma média de 8,4 crises límbicas por animal, sendo mais freqüente a crise classe 5. A contagem estereológica revelou a presença de aproximadamente o dobro de neurônios DCX-positivos no GD dos ratos epiléticos em relação aos controles ( $n = 7$ ;  $p < 0,001$ ).

Dendritos basais eram mais freqüentes e longos nos neurônios DCX-positivos dos ratos epiléticos que nos controles ( $p < 0,01$ ). Os dendritos apicais dos neurônios DCX-positivos apresentaram o mesmo comprimento total ( $\sim 500 \mu\text{m}$ ) em ambos os grupos. Porém, os ratos epiléticos possuíam mais bifurcações que os controles na GCL ( $p < 0,001$ ) e mais dendritos emergiam da GCL nos epiléticos que nos controles ( $p < 0,05$ ). Havia mais extremidades dendríticas nos primeiros  $50 \mu\text{m}$  da camada molecular (GCL+ $50 \mu\text{m}$ ) nos animais epiléticos ( $p < 0,001$ ). Os ratos epiléticos possuíam maior comprimento acumulado de dendritos DCX-positivos na GCL e na GCL+ $50 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ). O contrário foi observado na esfera GCL+ $100 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).

A avaliação da reação de neo-Timm na camada molecular interna do GD revelou ausência de grânulos de prata nos animais controle e um proeminente número de grânulos formando uma banda confluyente nos animais epiléticos, com largura média de  $48 \mu\text{m}$ , equivalente à esfera GCL+ $50 \mu\text{m}$  da análise de Sholl.

\* Prêmio concedido durante o XXXI Congresso Brasileiro de Epilepsia da LBE.  
Received June 26, 2006; accepted July 07, 2006.

As crises epilépticas estimularam a proliferação de novos neurônios granulares, com o dobro do número de células DCX-positivas nos animais epilépticos em relação aos controles. Os dendritos basais no hilus foram mais freqüentes, longos e ramificados e os dendritos apicais apresentaram maior número de ramificações na camada molecular interna nos animais epilépticos, exatamente onde ocorreu o brotamento das fibras musgosas. A formação de sinapses entre esses axônios e dendritos pode contribuir para o lento processo patológico de epileptogênese no hipocampo observado na epilepsia do lobo temporal.

**Unitermos:** epilepsia, neurogênese, *doublecortin*, reconstrução digital, estereologia.

## ABSTRACT

### *Hippocampal doublecortin-positive granular neurons have abnormal dendritic morphology in the temporal lobe epilepsy pilocarpine model*

To quantify the number and morphology of doublecortin-positive (DCX+) granular neurons in a temporal lobe epilepsy model, Wistar rats were treated with pilocarpine and, 90 min after status epilepticus (SE) onset, with diazepam. Controls received saline instead of pilocarpine. Rats were monitored 8 h per day to record spontaneous recurrent seizures (SRS) and perfused 30 days after SE. A series of sections containing the hippocampus was immunolabeled for DCX. The stereological optical fractionator method was used to count DCX+ neurons in granular cell layer (GCL) and subgranular zone of the dentate gyrus (DG). DCX+ neurons (n = 40) were digitally reconstructed and their dendritic distribution measured with Sholl's concentric spheres analysis. The first sphere has the radius equal to the GCL thickness followed by spheres with increments of 50  $\mu\text{m}$  in their radii. Neo-Timm staining was performed to evaluate the mossy fiber sprouting. Statistical difference in Student and Mann-Whitney tests at  $p < 0.05$ , values are mean  $\pm$  SEM.

Each animal had  $8.4 \pm 3.7$  SRS recorded. The DCX+ counting revealed the presence of  $8,987 \pm 1,986$  neurons in controls DG (n = 7) and  $19,337 \pm 4,715$  neurons in epileptic DG (n = 7). Basal dendrites were observed in 85% of DCX+ neurons in epileptics and in 30% of DCX+ neurons in controls with a length of  $63.9 \pm 9.7 \mu\text{m}$  and  $19.8 \pm 5.3 \mu\text{m}$ , respectively. Apical dendrites of DCX+ neurons had  $\sim 500 \mu\text{m}$  in both groups, but the epileptics had more nodes ( $3.9 \pm 0.3$ ) and dendrites emerging from GCL ( $4.1 \pm 0.4$ ) than controls ( $2.47 \pm 0.2$  nodes and  $2.95 \pm 0.3$  dendrites). The epileptic rats had more dendritic endings ( $4.55 \pm 0.5$ ) than controls ( $1.7 \pm 0.4$ ) in the first 50  $\mu\text{m}$  of the molecular layer (GCL + 50). Epileptic rats had more DCX+ dendritic length in GCL ( $168 \pm 14 \mu\text{m}$  against  $126 \pm 11 \mu\text{m}$  in controls) and GCL + 50 ( $231 \pm 26 \mu\text{m}$  against  $163 \pm 17 \mu\text{m}$  in controls); the contrary occurred in GCL + 100 ( $94 \pm 23 \mu\text{m}$  against  $160 \pm 23 \mu\text{m}$  in controls). Neo-Timm staining revealed a confluent band of silver granules in epileptic DG with a mean thickness of 48  $\mu\text{m}$  (equivalent to GCL + 50) and no band in controls.

Hilar basal dendrites were more frequent, long and ramified and the apical dendrites presented intense ramification in the inner molecular layer of epileptic rats. Dendrites were more abundant in regions with mossy fiber sprouting. Formation of synapses between these new dendrites and axons could contribute to the pathological process of hippocampal epileptogenesis.

**Key words:** neurogenesis, epilepsy, doublecortin, dentate gyrus, mossy fiber sprouting, 3D reconstruction, stereology.

## INTRODUÇÃO

A doublecortin (DCX) é uma proteína associada a microtúbulos normalmente expressa no citoplasma e prolongamentos dendríticos de neurônios em diferenciação durante o desenvolvimento. Recentemente a DCX tem sido utilizada como um marcador endógeno de neurogênese no sistema nervoso de animais adultos (Rao & Shetty, Eur J Neurosci 19:234-46, 2004). A neurogênese ocorre em determinados locais do sistema nervoso central como a zona subgranular do hipocampo e a zona subventricular dos ventrículos laterais. A neurogênese hipocampal é diminuída no envelhecimento e aumentada por exercícios físicos e na fase aguda da epileptogênese (Ming & Song, Annu Rev Neurosci 28:223-50, 2005). A epilepsia do lobo temporal humana pode ser mimetizada em animais experimentais com o uso de pilocarpina, um agonista

colinérgico muscarínico (Cavalheiro et al., Epilepsia 38: 778-2, 1991).

## OBJETIVO

Quantificar e estudar a morfologia dos neurônios granulares positivos para doublecortin no modelo de epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Ratos Wistar machos pesando 250-300 g, com 5-7 semanas de idade foram utilizados nesse estudo. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em experimentação animal da FMRP-USP (243/2005). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h com comida e água à vontade. Vinte e sete animais foram tratados com metil-escopolamina (1 mg/kg, i.p.) para mi-

nimizar os efeitos periféricos da pilocarpina e, meia hora depois, com pilocarpina (320 mg/kg, i.p.) para induzir o *status epilepticus* (SE). O início do SE foi considerado quando os animais sofreram uma crise motora de classe 3 na escala de Racine (Electroen Clin Neuro 32:281-94, 1972), caracterizada por mioclonias de membros anteriores. Os animais foram tratados com diazepam (10 mg/kg, i.p.) noventa minutos após o início do SE. Sete animais controle receberam injeções de escopolamina, salina no lugar de pilocarpina e diazepam nas mesmas doses. Os animais foram monitorados 8 horas por dia para observação de crises recorrentes espontâneas.

Trinta dias após o SE os animais foram profundamente anestesiados com nembital (80 mg/kg) e perfundidos via aorta com solução salina seguida por solução fixadora com formaldeído 4% e glutaraldeído 0,1%. Os encéfalos foram removidos e imersos no fixador por 2 h. O tecido nervoso foi crioprotectado em sacarose 30% e congelado em álcool iso-pentano refrigerado com gelo seco.

Uma série de cortes, com 60  $\mu\text{m}$  de espessura, contendo todo o hipocampo foi realizada em um criostato entre as coordenadas -1,7 e -6 mm a partir do bregma (Paxinos e Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates, 2005). Quatro secções de cada animal foram selecionadas em intervalos de 17 cortes com o sorteio da primeira posição. A imunohistoquímica para doublecortin foi realizada nessas secções de acordo com o método de Rao e Shetty (Eur J Neurosci, 19:234-46, 2004). Lâminas contendo as secções imunomarcadas foram observadas em um microscópio Olympus BX-60 equipado com platina motorizada LUDL, e câmera digital Optronics 750 L conectada a um computador executando o programa Stereo Investigator (Microbrightfield, EUA). O método estereológico do fracionador óptico (West et al., Anat Rec 231:482-97, 1991) foi utilizado para estimar o número total de neurônios granulares positivos para DCX no hipocampo. A camada granular (GCL) e a zona subgranular (SGZ) do giro denteado (GD) foram delineadas com a função de traçamento do programa. Quadros de contagem de  $40 \times 40 \mu\text{m}$  foram distribuídos em um retículo de  $150 \times 150 \mu\text{m}$  posicionado aleatoriamente sobre o contorno do giro denteado. Devido a uma espessura média de 20  $\mu\text{m}$  do tecido na lâmina, o dissecador óptico possuía uma profundidade de 10  $\mu\text{m}$  com zonas de resguardo de 5  $\mu\text{m}$  no topo e na base da secção. A contagem dos neurônios positivos para doublecortin foi realizada em cada um dos quadros de contagem com uma lente de abertura numérica 1,35.

Vinte neurônios de cada um dos grupos tiveram sua morfologia reconstruída digitalmente utilizando o mesmo sistema de microscopia descrito acima. O programa Neurolucida (Microbrightfield, EUA) gerou os arquivos de

coordenadas que permitiram medir o perímetro e área somática e as ramificações e comprimento dos dendritos. A distância entre o soma do neurônio positivo para doublecortin e a transição da GCL para a camada molecular foi medida em cada neurônio reconstruído. A análise de esferas concêntricas de Sholl (J Anat, 87:387-406, 1953) foi utilizada para medir a distribuição da árvore dendrítica a partir do soma. A primeira esfera tinha o raio igual à espessura da GCL medida para cada célula, as esferas seguintes possuíam raios com incrementos de 50  $\mu\text{m}$  a partir da primeira.

A autometalografia de neo-Timm foi realizada de acordo com Danscher (J Histochem Cytochem, 52:1619-25, 2004). Essa técnica revela a distribuição do íon zinco presente nos terminais sinápticos, ou seja, fibras musgosas, dos neurônios granulares do GD. A escala de Cavazos (J Neurosci, 11:2795-803, 1991) que varia de 0 a 5, foi utilizada para medir o brotamento das fibras musgosas na camada molecular interna do giro denteado.

Os grupos foram comparados utilizando-se o teste t de Student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com os valores expressos como média  $\pm$  EPM.

## RESULTADOS

Dezessete dos vinte e sete animais (63%) tratados com pilocarpina desenvolveram SE, dez desses animais (59%) morreram na fase aguda do tratamento. O monitoramento registrou uma média de 8,4 crises límbicas por animal, sendo a crise classe 5, com elevação e queda do animal, a mais freqüente (39% das crises).

A marcação imunohistoquímica para doublecortin revelou a presença de neurônios granulares novos na GCL e na SGZ do giro denteado dos animais tratados com pilocarpina (n = 7) e controles (n = 7). A quantificação estereológica do número absoluto de células indicou a presença de  $8.987 \pm 1.986$  neurônios DCX-positivos no GD dos animais controles e  $19.337 \pm 4.715$  neurônios DCX-positivos no GD dos animais epiléticos (p < 0,001).

A comparação da reconstrução digital dos neurônios positivos para DCX dos grupos controle e pilocarpina demonstrou não haver diferenças no perímetro e área do soma e no número de bifurcações e extremidades dos dendritos apicais. Porém, dendritos basais foram observados em 85% dos neurônios DCX-positivos dos animais epiléticos e em apenas 30% dos neurônios DCX-positivos dos animais controle. Além disso, o comprimento dos dendritos basais era de  $63,9 \pm 9,7 \mu\text{m}$  nos animais tratados com pilocarpina contra  $19,8 \pm 5,3 \mu\text{m}$  nos animais controle (p < 0,01).

Ao contrário dos dendritos basais, os dendritos apicais dos neurônios DCX-positivos apresentaram o mesmo comprimento total de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  em ambos os

grupos. No entanto, a distribuição espacial desses dendritos apresentou grandes diferenças nos animais epilépticos em relação aos controles. Os animais epilépticos possuíam mais bifurcações ( $3,9 \pm 0,35$ ) que os controles ( $2,47 \pm 0,23$ ) na GCL ( $p < 0,001$ ) e mais dendritos emergiam da GCL nos epilépticos ( $4,1 \pm 0,38$ ) que nos controles ( $2,95 \pm 0,26$ ;  $p < 0,05$ ). Esse maior número de dendritos possuía suas extremidades nos primeiros  $50 \mu\text{m}$  da camada molecular (GCL+50), com  $4,55 \pm 0,55$  extremidades nos animais epilépticos contra apenas  $1,7 \pm 0,36$  extremidade na camada molecular interna dos controles ( $p < 0,001$ ).

Como resultado desse padrão de bifurcação e término, os animais epilépticos possuíam maior comprimento acumulado de dendritos DCX-positivos na GCL ( $168 \pm 14 \mu\text{m}$  contra  $126 \pm 11 \mu\text{m}$  nos controles;  $p < 0,05$ ), e também nos primeiros  $50 \mu\text{m}$  da camada molecular ( $231 \pm 26 \mu\text{m}$  nos epilépticos e  $163 \pm 17 \mu\text{m}$  nos controles;  $p < 0,05$ ). O contrário foi observado no trecho de  $50$  a  $100 \mu\text{m}$  da camada molecular (GCL+100), com os animais epilépticos apresentando apenas  $94 \pm 23 \mu\text{m}$  contra  $160 \pm 23 \mu\text{m}$  de comprimento dendrítico nos controles ( $p < 0,05$ ).

A reação de neo-Timm revelou a ausência de grânulos de prata na camada molecular interna do GD dos animais controle (grau 0) e um proeminente número de grânulos formando uma banda confluyente na camada molecular interna do GD dos animais epilépticos (grau 4). A medição da largura dessa banda revelou uma espessura média de  $48 \mu\text{m}$ , sendo equivalente aos primeiros  $50 \mu\text{m}$  da camada molecular (GCL+50) da análise de Sholl.

## CONCLUSÕES

As crises epilépticas estimularam a proliferação de novos neurônios granulares no GD, pois foi encontrado o dobro do número de células DCX-positivas nos animais tratados com pilocarpina em relação aos controles.

Além de estar presente em maior número, esses neurônios novos tinham alterações em sua arborização dendrítica. Os dendritos basais, comuns em células granulares imaturas, foram mais freqüentes, mais longos e mais ramificados nos animais epilépticos. Os dendritos apicais apresentaram mais ramificações e estavam mais adensados na camada molecular interna do GD. Portanto, os dendritos basais e apicais dos neurônios novos dos animais epilépticos estavam presentes em maior densidade no hilus e na camada molecular interna do GD, exatamente onde ocorreu o brotamento das fibras musgosas.

O aumento na contínua adição desses novos neurônios à camada granular do GD e a coincidência de brotamento axonal e alterações dendríticas podem formar circuitos sinápticos aberrantes. Esses fenômenos em conjunto podem contribuir para o lento processo patológico de epileptogênese no hipocampo observado na epilepsia do lobo temporal.

Apoio financeiro: CAPES, FAPESP, CNPq, PRONEX e FAEPA.

### Endereço para correspondência:

Norberto Garcia-Cairasco  
Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP  
Av. Bandeirantes, 3900  
CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil  
E-mail: gabriel@rfi.fmrp.usp.br – ngcairas@fmrp.usp.br