



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

ELANE DE NAZARÉ MAGNO FERREIRA

ATIVACÃO MICROGLIAL, PERDA NEURONAL E ASTROCITOSE EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

BELÉM – PARÁ

2011

ELANE DE NAZARÉ MAGNO FERREIRA

ATIVACÃO MICROGLIAL, PERDA NEURONAL E ASTROCITOSE EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.

BELÉM – PARÁ

2011

ii

ELANE DE NAZARÉ MAGNO FERREIRA

ATIVACÃO MICROGLIAL, PERDA NEURONAL E ASTROCITOSE EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.

Aprovação em: 12 de maio de 2011.

BANCA DE DEFESA

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal (ICB/ UFPA) – Orientador e Presidente da Banca

Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Franco (ICB/ UFPA) – Membro Titular

Prof. Dr. Manoel da Silva Filho (ICB/ UFPA) – Membro Titular

À Deus e à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Wallace Gomes Leal, por me possibilitar realizar esse trabalho que tanto me deu felicidade de fazê-lo e pela paciência, dedicação e alegria de desenvolver o projeto junto de mim;

Ao laboratório de Neuroendocrinologia, de responsabilidade do Prof. Doutor Anderson Herculano, através de suas alunas Adriene Seabra e Suelen Moraes, pela ajuda material e pela sincera amizade, nos momentos difíceis;

Aos membros do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE). A todos os professores responsáveis, alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica;

Aos amigos Marcelo Cardoso, Rosana Lopes, Celice Cordeiro, Michele Moraes, Arthur Sampaio e Mario Santos pelo apoio, companhia, dedicação, risadas, lágrimas, amizade e pelo amor nesses dois anos: Obrigada mesmo!

E pelo apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Pará (FAPESPA) por me possibilitar dedicação exclusiva ao projeto.

RESUMO

A epilepsia é uma condições neurológicas crônicas graves mais prevalentes no mundo inteiro. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em cada 100.000 habitantes, 45 a 50 apresentam a doença em países desenvolvidos, subindo para 122 a 190, nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Não há fatores de risco em relação a sexo, raça ou idade, mas acredita-se que algumas mutações gênicas estejam relacionadas com o aumento do risco de se apresentar a doença. A fisiopatologia da epilepsia envolve fatores complexos, como perda de inibição e aumento da excitabilidade neuronal em diversas regiões encefálicas, principalmente o hipocampo. Defeitos de canais iônicos e transportadores e receptores para neurotransmissores podem contribuir para a patogênese da doença. A resposta inflamatória possui um papel importante na fisiopatologia da epilepsia. Evidências recentes sugerem um papel fundamental da ativação microglial para a exacerbação das crises convulsivas. Nesta dissertação, descrevemos os padrões gerais de ativação microglial, astrocitária e perda neuronal nas regiões CA1, CA3 e hilo do giro denteado do hipocampo e nos córtices motor, peririnal, entorrinal lateral e complexo amigdalóide na primeira semana após *Status Epilépticus* (SE) induzido por injeção de pilocarpina. Inibiu-se a ativação microglial com minociclina. Realizou-se imunohistoquímica para a marcação de neurônios (anti-NeuN), micróglia em geral (anti-Iba1), micróglia/macrófagos ativados (anti-ED1), astrócitos (anti-GFAP). Quantificou-se o número de neurônios e micróglia ativada em regiões hipocámpais. Houve intensa ativação microglial e astrocitária nas diversas regiões motoras e límbicas estudadas, principalmente entre 3 e 7 dias após a indução de SE. O tratamento com a minociclina diminuiu significativamente ativação microglial no hipocampo nos tempos acima citados ($p < 0,05$), mas não influenciou a astrocitose. A inflamação foi considerável nas regiões extrahipocámpais, onde teve o ápice nos tempos de sobrevida precoces. Não houve perda de neurônios hipocámpais na primeira semana após SE, apesar de alterações neuronais esporádicas terem sido observadas. Estes resultados sugerem que a resposta inflamatória é um evento generalizado e precoce, afetando diversas áreas motoras e límbicas, após SE induzido injeções de pilocarpina, mesmo na ausência de perda celular evidente. Os padrões de ativação microglial e astrocitária podem ser usados como marcadores do comprometimento tecidual progressivo em modelos experimentais de epilepsia.

PALAVRAS-CHAVE: Epilepsia; Pilocarpina; Minociclina; Micróglia; Astrócitos

APOIO FINANCEIRO: Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA).

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most prevalent serious chronic neurological conditions worldwide. The World Health Organization (WHO) estimates 45-50 cases in 100,000 habitants in developed countries, rising to 122 to 190, in developing countries, including Brazil. There are no risk factors in relation to gender, race or age, but it is believed that some gene mutations are associated with an increased risk to develop the disease. The pathophysiology of epilepsy involves complex factors such as loss inhibition and increased neuronal excitability in different brain regions, but mainly at the hippocampus. Mutations in ion channels and in both receptor and neurotransmitter transporters may underlie disease pathogenesis. The inflammatory response plays an important role on epilepsy pathophysiology. Recent experimental evidence suggests a major role for both microglia and astrocyte activation on the seizure exacerbation. In this dissertation, we describe the general patterns of microglial and astrocyte activation and neuronal loss in CA1, CA3, hippocampal hylus, peririnal, lateral entorrinal and motor cortices and amigdaloid complex in the first week following “*Status Epilepticus*” induced by pilocarpine injection. Immunohistochemistry was performed to label neurons (anti-NeuN), microglia in general (anti-Iba1), activated microglia/macrophages (anti-ED1) and astrocytes (anti-GFAP). Numbers of neurons and activated microglia were counted in the hippocampus. There was intense microglia and astrocyte activation in all motor and limbic regions studied, mainly at 3 and 7 days post SE. Minocycline treatment reduced microglia activation in the hippocampus ($p < 0.05$), without affecting astrocytosis. There was considerable inflammation in regions outside the hippocampus with an early inflammatory response. There was no neuronal loss in the hippocampus in the first week following SE, although sporadic alterations on neuronal morphology have been observed. These results suggest that the inflammatory response is an early and generalized histopathological event in several motor and limbic structures following pilocarpine-induced SE, even in the absence of conspicuous cell loss. The patterns of microglia and astrocyte activation can be used as markers of the progressive tissue impairment in the experimental models of epilepsy.

KEYWORDS: Epilepsy; Pilocarpine; Minocycline; Microglia; Astrocytes

FINANCIAL SUPPORT: Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA).

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 – INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 - O HIPOCAMPO E O SISTEMA LÍMBICO | 15 |
| 1.2 - A EPILEPSIA | 18 |
| 1.2.1 - Aspectos Históricos e Epidemiológicos | 18 |
| 1.2.2 - Classificação das Epilepsias | 20 |
| 1.2.3 - Fisiopatologia da Epilepsia | 23 |
| 1.2.4 - Terapêutica | 28 |
| 1.2.5 – Modelos Experimentais de Epilepsia | 29 |
| 1.2.5.1 – Aspectos Gerais | 29 |
| 1.2.5.2 – O Modelo da Pilocarpina | 29 |
| 1.3 - INFLAMAÇÃO E EPILEPSIA: O PAPEL DA MICRÓGLIA E DOS ASTRÓCITOS | 30 |
| 1.3.1 - Ativação Microglial: Aspectos Gerais | 30 |
| 1.3.2 - Ativação Microglial e Epilepsia | 33 |
| 1.3.3 - Astrocitose e Epilpsia | 35 |
| 1.4 - TRATAMENTO COM MINOCICLINA PARA DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL | 37 |
| 1.5 - O PROBLEMA E A PERGUNTA EXPERIMENTAL | 39 |
| 1.6 – OBJETIVOS | 41 |
| 1.6.1 – Geral | 41 |
| 1.6.2 – Específicos | 41 |
| 2 - MATERIAIS E MÉTODOS | 42 |
| 2.1 - ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS | 42 |
| 2.2 - INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELO MODELO EXPERIMENTAL DA | |

| | |
|---|----|
| PILOCARPINA | 43 |
| 2.3 - TRATAMENTO COM MINOCICLINA | 43 |
| 2.4 - PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO | 44 |
| 2.5 - ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA | 45 |
| 2.5.1 - Análise Histopatológica Geral | 45 |
| 2.5.2 – Imunoistoquímica | 45 |
| 2.6 - ANÁLISE QUALITATIVA | 47 |
| 2.7 - ANÁLISE QUANTITATIVA | 47 |
| 2.7.1 - Método de Contagem | 47 |
| 2.7.2 - Análise Estatística | 48 |
| 3 – RESULTADOS | 49 |
| 3.1 - A INJEÇÃO DE PILOCARPINA INDUZ “STATUS EPILEPTICUS” COM MIOCLONIAS DOS MEMBROS ANTERIORES | 49 |
| 3.2 - A INJEÇÃO DE PILOCARPINA INDUZ INTENSA ATIVAÇÃO MICROGLIAL EM DIFERENTES REGIÕES ENCEFÁLICAS NA FASE AGUDA APÓS O “ <i>STATUS EPILEPTICUS</i> ” | 50 |
| 3.2.1 - Ativação Microglial no Hipocampo | 50 |
| 3.2.2 - Ativação Microglial nos Núcleos Talâmicos | 54 |
| 3.2.3 - Ativação Microglial nos Córtex Motor | 54 |
| 3.2.4 - Ativação Microglial nos Córtices Peririnal, Entorrinal Lateral, Piriforme e Complexo Amigdalóide | 57 |
| 3.3 - ASPECTOS QUANTITATIVOS DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL NO HIPOCAMPO E INIBIÇÃO MICROGLIAL COM MINOCICLINA | 59 |
| 3.4 - A INDUÇÃO DE “STATUS EPILEPTICUS” INDUZ INTENSA ASTROCITOSE EM DIVERSAS REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL | 67 |
| 3.5 - O TRATAMENTO COM MINOCICLINA NÃO ALTEROU O PADRÃO DE ASTROCITOSE APÓS A INDUÇÃO DE “STATUS EPILEPTICUS” | 67 |

| | |
|--|----|
| 3.6 - A INDUÇÃO DE <i>STATUS EPILÉPTICUS</i> NÃO INDUZ PERDA NEURONAL NAS REGIÕES CA1, CA3 E HILO DO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO NA PRIMEIRA SEMANA APÓS “STATUS EPILEPTICUS” | 71 |
| 4 – DISCUSSÃO | 78 |
| 4.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS | 78 |
| 4.2 - OS PADRÕES DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL SUGEREM DIFERENTES PADRÕES TEMPORAIS DE COMPROMETIMENTO TECIDUAL EM DIVERSAS ÁREAS MOTORAS E LÍMBICAS APÓS A INDUÇÃO DE “STATUS EPILÉPTICOS” | 79 |
| 4.3 - OS PADRÕES DE ASTROCITOSE ACOMPANHAM OS DE MICROGLIOSE APÓS “STATUS EPILÉPTICUS” | 84 |
| 4.4 - A INJEÇÃO DE PILOCARPINA NÃO INDUZ PERDA NEURONAL NA PRIMEIRA SEMANA APÓS A INDUÇÃO DE “STATUS EPILÉPTICUS” | 86 |
| 5. CONCLUSÕES | 88 |
| 6. PERSPECTIVAS FUTURAS | 88 |
| 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 89 |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1 | Corte coronal de cérebro de rato corado pela técnica de Nissl, mostrando as regiões hipocâmpais CA1, CA3, Giro Denteado e Hilo. | 16 |
| FIGURA 2 | Circuito trisináptico hipocâmpal, mostrando via perforante e colaterais de Schaffer. | 17 |
| FIGURA 3 | Estrutura molecular da minociclina. | 38 |
| TABELA 1 | Grupos experimentais e tempos de sobrevivência utilizados. | 42 |
| TABELA 2 | Grupos experimentais e suas respectivas descrições. | 43 |
| FIGURA 4 | Método de contagem nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. | 48 |
| FIGURA 5 | Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região CA1 do hipocampo. | 51 |
| FIGURA 6 | Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região CA3 do hipocampo. | 52 |
| FIGURA 7 | Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região do hilo hipocâmpal. | 53 |
| FIGURA 8 | Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região do tálamo. | 55 |
| FIGURA 9 | Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região do córtex motor. | 56 |
| FIGURA 10 | Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 nos corpos amigdalóides e córtex entorrinal. | 58 |
| FIGURA 11 | Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para ED1 na região CA1 do hipocampo. | 61 |
| FIGURA 12 | Número de células ED1+ na região CA1 do hipocampo. | 62 |
| FIGURA 13 | Imunoreatividade microglial revelada pela | 63 |

| | | |
|-----------|---|----|
| | imunohistoquímica para ED1 na região CA3 do hipocampo. | |
| FIGURA 14 | Número de células ED1+ na região CA3 do hipocampo. | 64 |
| FIGURA 15 | Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para ED1 na região do hilo hipocampal. | 65 |
| FIGURA 16 | Número de células ED1+ na região do hilo hipocampal. | 66 |
| FIGURA 17 | Imunoreatividade astrocitária revelada pela imunohistoquímica para GFAP na região CA1 do hipocampo. | 68 |
| FIGURA 18 | Imunoreatividade astrocitária revelada pela imunohistoquímica para GFAP na região CA3 do hipocampo | 69 |
| FIGURA 19 | Imunoreatividade astrocitária revelada pela imunohistoquímica para GFAP na região do hilo hipocampal. | 70 |
| FIGURA 20 | Imunoreatividade neuronal revelada pela imunohistoquímica para NeuN na região de CA1 do hipocampo. | 72 |
| FIGURA 21 | Número de células NeuN+ na região CA1 do hipocampo. | 73 |
| FIGURA 22 | Imunoreatividade neuronal revelada pela imunohistoquímica para NeuN na região de CA3 do hipocampo. | 74 |
| FIGURA 23 | Número de células NeuN+ na região CA3 do hipocampo. | 75 |
| FIGURA 24 | Fotomicrografias de imunohistoquímica para NeuN mostrando células hipocampais na região CA3. | 76 |
| FIGURA 25 | Número de células NeuN+ no hilo do giro denteado. | 77 |

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – O HIPOCAMPO E O SISTEMA LÍMBICO

O sistema límbico consiste em uma série de estruturas corticais e subcorticais, cujas funções são, principalmente, relacionadas à olfação, memória, emoção e homeostasia neuroendócrina e autonômica (ANDERSEN *et al.*, 2007). Os principais componentes do sistema límbico são: a formação hipocampal, córtex olfatório, complexo amigdalóide e hipotálamo, corpos mamilares e giro do cíngulo (KANDEL, 2000).

O hipocampo é uma estrutura que faz parte do sistema límbico, localizado na porção medial do lobo temporal (ANDERSEN *et al.*, 2007). Seu nome deriva do grego *hippo+ kampos* (cavalo + monstro do mar), uma referência à sua forma, que lembra um cavalo marinho. Forma esta também comparada a um chifre, por esse motivo, ele é também chamado de *Cornus Ammonis* (CA) (Figura 1).

O hipocampo estende-se por toda a extensão do soalho do lobo temporal, sendo dividido no sentido ântero-posterior em três porções: cabeça, corpo e cauda. Medial e inferiormente, o hipocampo é contíguo ao subículo, o pré-subículo e o para-subículo, repousando sobre o córtex entorrinal e giro parahipocampal (ANDERSEN *et al.*, 2007). O termo “hipocampo” é comumente utilizado para descrever conjuntamente duas regiões interligadas: o giro denteado e o hipocampo propriamente dito. Ambos possuem uma organização interna trilaminada, composta por dois tipos principais de células: as células granulares do giro denteado e as células piramidais do *Cornus Ammonis*, que, em primatas, estão classificadas em CA1, CA2, CA3 e CA4, porém estas últimas não são encontradas em ratos (Figura 1).

A região CA1 do hipocampo é formada por células piramidais não-gigantes, enquanto nas outras regiões (CA2, CA3 e CA4) podemos encontrar neurônios

piramidais adultos. O giro denteado é formado por células granulares, que são bem menores que as células hipocâmpais supracitadas (ANDERSEN, 2007).

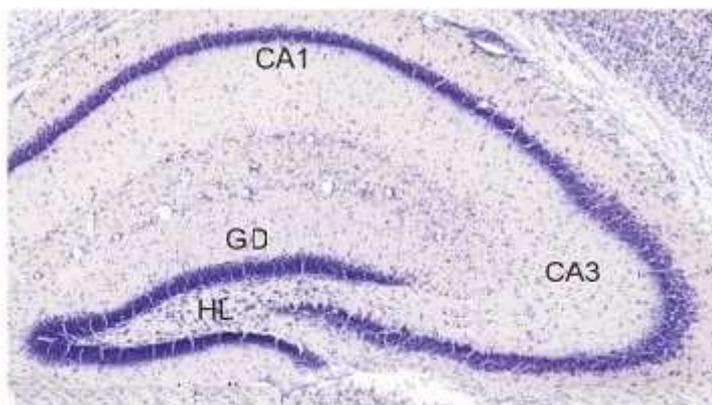


Figura 1: Corte coronal de cérebro de rato corado pela técnica de Nissil, mostrando as regiões hipocâmpais CA1, CA3, Giro Denteado (GD) e Hilo (HL) (ZATTONI, 2011).

Cada uma dessas regiões hipocâmpais mantém um padrão organizado de conexões intrínsecas e extrínsecas. A principal aferência para o hipocampo é a “via perforante” que inerva os dendritos das células granulares da camada molecular do giro denteado (BLUMENFELD, 2002).

Os axônios das células granulares formam as fibras musgosas que projetam-se para as células piramidais da região de CA3. Os neurônios de CA3, por sua vez, emitem fibras para a região de CA1, constituindo a chamada “via colateral de Schaffer”. De CA1, as fibras projetam-se para o complexo subicular e então para as camadas profundas do córtex entorrinal. O circuito córtex entorrinal-giro denteado-CA3-CA1 é tradicionalmente denominado “via tri-sináptica” e utiliza o glutamato como principal neurotransmissor (Figura 2). Os neurônios de CA2 enviam projeções em direção à região de CA1 e a região supramamária, esta última apresentando características difusas. Pesquisas recentes provaram que existe uma conexão de CA1 para o córtex entorrinal, via subiculum (ver BLUMENFELD, 2002 para revisão).

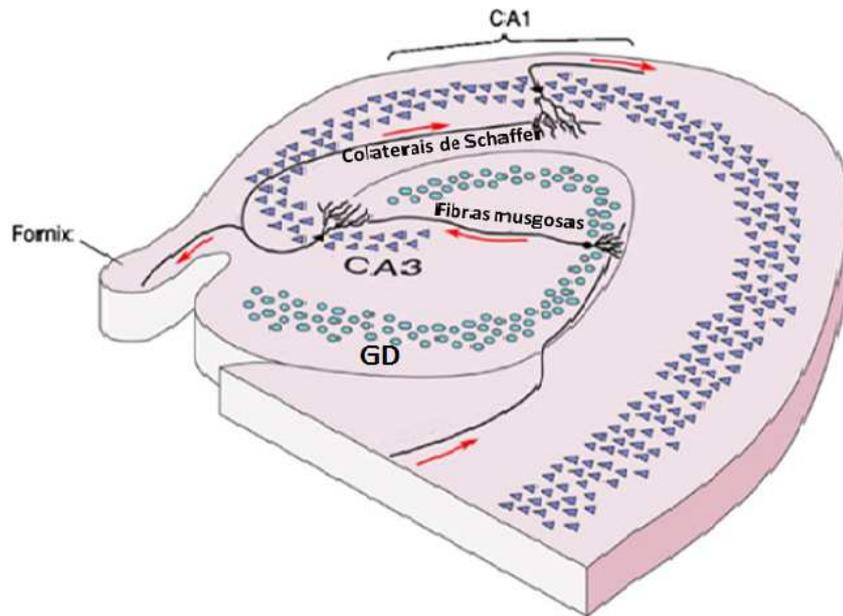


Figura 2: Circuito trisináptico hipocampal, mostrando a via perfurante e colaterais de Schaffer (Modificado de MCCORMICK, 2001).

Como mencionado, o hipocampo faz parte do sistema límbico e sua função é relacionada a mecanismos ligados ao aprendizado, memória e emoção (ANDERSEN *et al.*, 2007). O papel do hipocampo nos mecanismos de memória foi descoberto com o estudo de um curioso caso de epilepsia incurável, em que o paciente H.M. se submeteu a um procedimento cirúrgico que visava a retirada bilateral de estruturas do lobo temporal, incluindo o hipocampo, na década de 1950 (SCOVILLE & MILNER, 1958).

Após a cirurgia, H.M. lembrava perfeitamente fatos do passado distante, como da sua infância, por exemplo, mas era incapaz de guardar memórias do presente por muito tempo, mostrando manutenção de memória retrógrada e perda da memória anterógrada. Esse fato levou os neurocientistas a estudos posteriores que confirmaram ser o hipocampo a estrutura responsável pela formação da memória recente.

Freqüentemente os pacientes epiléticos se queixam de distúrbios de memória. Esse fenômeno ainda é pouco conhecido, mas acredita-se que seja devido ao fato de

ocorrer intensa morte de neurônios hipocampais após a ocorrência de diversas crises convulsivas, principalmente nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo e no hilo do giro denteado (BELL & GIOVANOLI, 2007).

Devido o papel central no sistema límbico, aprendizagem e consolidação de memória, alterações na estrutura e fisiologia hipocampal são importantes para a fisiopatologia de diversas doenças do SNC, incluindo epilepsia do lobo temporal e a doença de Alzheimer. Nos tópicos seguintes, descreveremos a base anatomofisiológica da epilepsia, importante doença crônica do SNC, investigada neste estudo através de um modelo experimental (BRODAL, 1997).

1.2 - A EPILEPSIA

1.2.1 Aspectos Históricos e Epidemiológicos

O estudo da epilepsia influenciou de forma significativa o avanço nos estudos das neurociências, pois, a busca pela compreensão da doença aumentou a compreensão sobre o funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC) (CAVALHEIRO, 2004). Porém, muito antes de um possível conhecimento que pudesse embasar os estudos cerebrais e fornecer pistas para a percepção de que a epilepsia advém de desordens neurológicas, a crença de que a doença era de origem espiritual e/ou demoníaca era dominante (GOMES, 2006).

De forma geral, observa-se que o preconceito imperou, e ainda impera, sobre pacientes portadores de epilepsia onde, por exemplo, na Roma antiga esses pacientes eram evitados por medo de contágio. Enquanto que na idade média, em um documento intitulado *Malleus maleficarum*, o manual de caça às bruxas em que nele, manifestações de crises epilépticas eram tidas como característica de feitiçaria, conseqüentemente com prescrições de tratamentos mágicos ou religiosos. Durante o renascimento houve

tentativas de se enxergar a epilepsia como doença física, porém, foi só durante o iluminismo que essa visão de fato se concretizou (GOMES, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em cada 100.000 pessoas, 40 a 50 apresentam epilepsia nos países desenvolvidos, número que sobe para 122 a 190 casos por 100.000 habitantes, em países em vias de desenvolvimento, como o Brasil (SHORVON, 1990). Essas taxas variam com a idade, sendo altas em lactantes e em crianças de tenra idade, ocorrendo um “plateau” entre 15 e 65 anos, onde começa novamente a subir (BERG *et al.*, 1996). Assim, a doença é uma condição extremamente freqüente na população e, portanto, deve ser encarada como um problema de saúde pública.

No Brasil, os estudos epidemiológicos sobre epilepsia são limitados. Isso pode estar relacionado à dificuldade inerente de classificação, bem ao acesso da maioria da população mais carente ao diagnóstico ou tratamento. Por outro lado, estes estudos são mais disponíveis nos países mais desenvolvidos economicamente, o que auxilia consideravelmente nas decisões tomadas pelas políticas de saúde pública, tanto para melhorar a vida de portadores, financiamento de tratamentos e cirurgias, quanto para evitar o aumento da incidência anual da enfermidade (SANDER, 2003).

No geral, pacientes que sofrem epilepsia tem entre duas a três vezes mais chances de vir a óbito, em comparação à população geral (FERREIRA & TABOSA e SILVA, 2009). Sabe-se que, prioritariamente, os óbitos de pacientes epiléticos estão relacionados ao estado epilético propriamente dito, morte súbita e inexplicável, traumas resultantes de quedas e afogamento acidental (RUFO-CAMPOS, 2000).

FERREIRA & TABOSA e SILVA, em 2009, em um estudo epidemiológico sobre a mortalidade por epilepsia no Brasil de 1980 a 2003, usando o *Sistema de Informação sobre Mortalidade do Ministério da Saúde (SIM/MS)* constataram que a maioria dos

pacientes que morre com epilepsia é formada por homens, com faixa-etária mais elevada e que as taxas de mortalidade vem crescendo na região Nordeste. Porém, sabe-se que a epilepsia é uma doença com elevado grau de sub-notificação, fazendo com que os dados apresentados não correspondam às taxas reais de incidência de morte, as quais devem ser ainda maiores. É o que pode estar acontecendo nas regiões Norte e Nordeste do país, onde, pela carência de recursos humanos e financeiros, acrescido à extensão territorial, taxas de incidência e prevalência da doença sejam um reflexo da falha da coleta de dados pelos sistemas de notificação (BRASIL, 2005). Portanto dados epidemiológicos devem ser interpretados com cautela.

1.2.2 – Classificação das Epilepsias

Classificar as epilepsias desde sempre se configurou num trabalho árduo, visto a doença ser de grande heterogeneidade clínica. Porém, superar essa barreira é de grande relevância no que diz respeito à sua terapêutica, pois a eficácia medicamentosa dependerá da escolha certa do anticonvulsivante. A classificação das epilepsias é de grande relevância clínica para se direcionar o paciente para o tratamento mais eficaz, seja este medicamentoso ou cirúrgico. Assim, na década de 1980, a Liga Internacional Contra Epilepsia estabeleceu duas classificações para auxiliar clínicos (COMMISSION TO CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY, 1981).

Há várias formas de se classificar as epilepsias. Uma delas baseia-se na localização do início das crises epiléticas, onde estas são divididas em crises focais e generalizadas.

- Focal: Crises de início restrito a determinada área cortical de um pequeno grupo de neurônios que constitui o foco da crise e, de acordo com o nível de

consciência do paciente durante a ocorrência da crise, pode ser subdividida em focal simples, sem perda de consciência, ou focal complexa, com perda de consciência. Geralmente antes do início das crises focais, os pacientes podem descrever sintomas denominados “auras”. As auras podem incluir sensação de medo, sensação de sufoco ou mesmo algum determinado odor. As auras se devem à atividade elétrica anormal na população neuronal que será o foco da crise convulsiva (CAVANNA, 2011). As manifestações clínicas da epilepsia focal dependem da origem da descarga epileptogênica, e inclui sintomas motores, sensitivos, autônomos e psíquicos (CAVANNA, 2011).

- Generalizada: Descargas neuronais anômalas provenientes de ambos os hemisférios cerebrais e os pacientes não relatam a ocorrência da aura. São subdivididas em convulsivas e não convulsivas.

1. Crise generalizada não convulsiva: Mais conhecida como crise de ausência, antigamente chamada “pequeno mal”. É mais comum em crianças e tem começo abrupto e está associada à interrupção das atividades motoras e perda da consciência. São manifestações clínicas de crises primárias generalizadas que não incluem forte resposta motora (MEEREN, 2005).

2. Crise generalizada convulsiva: Crise com sintomatologia de caráter tônico-clônico, ou grande mal. Geralmente na fase tônica o paciente pode cair rígido no chão e perder o controle urinário e intestinal. Esta fase tende a durar aproximadamente 30 s antes de evoluir para a fase clônica, onde há movimentos repetitivos das extremidades, que podem durar de 1 a 2 minutos. Após a fase tônico-clônica ocorre o que chamamos de

período pós-ictal, onde o paciente apresenta sonolência e pode apresentar cefaléia ou mialgia.

Lesões como Acidente Vascular Encefálico, traumas mecânicos (EVANS, 1962), infecções ou tumores podem desencadear epilepsias de início tardio, na fase adulta, que são classificadas como epilepsias sintomáticas.

Um tipo bastante comum de epilepsia é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) que, como seu próprio nome já diz, suas gênese e propagação estão relacionadas à estruturas do sistema límbico, dentre elas destaca-se o hipocampo. A ELT acomete aproximadamente 20% de todos os pacientes diagnosticados como portadores de epilepsia (BABB, 1999). Por outro lado, é também o tipo de epilepsia mais refratário ao tratamento medicamentoso disponível no mercado, onde observa-se mais de 50% de pacientes não responsivos às drogas antiepilépticas (ENGEL, 1996).

Para se diagnosticar um paciente como portador de epilepsia, este precisa apresentar crises espontâneas e recorrentes, no mínimo. A identificação de diferentes padrões de sintomas tem nos ajudado a classificá-las, um trabalho que continua evoluindo dentre os profissionais envolvidos nestas questões, como médicos e pesquisadores. As variáveis que são consideradas neste momento são, principalmente, a presença ou não de uma anormalidade anatômica cerebral, que se relaciona à localização do início dos disparos atípicos, e se existe uma causa identificável (sintomática) ou não (idiopática) (SHORVON, 2011).

1.2.3 Fisiopatologia da Epilepsia

Caracterizando-se como o mais comum dos distúrbios neurológicos crônicos graves, a epilepsia é uma doença caracterizada pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes, convulsivas e não-convulsivas, como consequência de desordens cerebrais, cuja etiologia geralmente é desconhecida, acometendo pessoas independentemente de cor, raça ou sexo (SCHARFMAN, 2007). Esta doença é caracterizada como uma doença complexa pela existência de manifestações clínicas variadas, numerosos fatores genéticos e não-genéticos associados, e a possibilidade de interação de todos os fatores supracitados (REES, 2010).

A causa da doença geralmente é desconhecida, mas acredita-se que grande parte dos pacientes que sofre desta condição patológica crônica tenha sido acometida por um episódio de febre intensa, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento da doença alguns meses, ou mesmo anos após o episódio (SPECCHIO *et al.*, 2010).

Crises convulsivas geralmente são originadas a partir de um grupo de neurônios com atividade elétrica anormal. Apresentando excitabilidade aumentada chamada epileptiforme, o que constituem o foco das crises convulsivas (DICHTER, 1994; FISHER *et al.*, 2005). Nesse processo epileptogênico, há contribuição tanto de fenômenos sinápticos quanto não-sinápticos. Entender a fisiopatologia desses fenômenos é importante para a melhor compreensão da epilepsia de modo geral e, ao mesmo tempo, se chegar mais perto a uma terapêutica mais eficaz.

Uma das hipóteses mais aceitas para se explicar a gênese das crises convulsivas é que ocorre, durante a doença, uma alteração no delicado balanço entre inibição e excitabilidade neuronal (NAYLOR, 2010). Entre estes mecanismos, destaca-se a liberação, recaptção e ação pós-sináptica dos neurotransmissores Glutamato e Ácido Gama-amino-butírico (GABA), bem como mudanças nas propriedades de canais

iônicos dependentes de voltagem, transporte iônico, ou mudanças anatomofuncionais entre as células.

Após as crises convulsivas, podem ocorrer alterações anatomopatológicas rápidas, incluindo a atrofia e perda celular no hipocampo, mudanças na morfologia dendrítica de neurônios remanescentes e brotamentos axonais anormais (MELLO *et al.*, 1993). Entre as alterações axonais, é digno de nota o crescimento anormal de fibras musgosas, que surgem dos neurônios piramidais da região CA3 do hipocampo e fazem sinapses com células piramidais do Giro Denteado (MELLO *et al.*, 1993). Essas mudanças axonais provavelmente aumentam a excitabilidade neuronal, contribuindo para a gênese e o alastramento de crises convulsivas (KAROLY *et al.*, 2010).

Uma forma prática de se estudar a fisiopatologia de crises epiléticas é levando em consideração a sua gênese, ou seja, se ela inicia-se como uma crise parcial ou generalizada. Uma característica primordial das crises convulsivas parciais é o fato de elas serem originadas da atividade elétrica anormal em um pequeno grupo de neurônios, chamados foco da crise. Essa excitabilidade aumentada pode ser resultado de diversos fatores, como alterações celulares resultantes de variações genéticas, conexões sinápticas atípicas, alterações vasculares locais e/ou tumores (SHARIFI *et al.*, 2010).

Dependendo da localização desse pequeno grupo de neurônios com atividade epileptogênica, o paciente pode vir a apresentar diferentes tipos de sintomas, como movimentos involuntários (no caso de comprometimento de neurônios corticais motores) ou perda momentânea de consciência, que pode envolver perda de neurônios do sistema límbico (DANIELSON *et al.*, 2011).

Os neurônios pertencentes ao foco da crise apresentam resposta elétrica estereotipada e sincronizada, comumente chamada de mudança paroxística de

despolarização, uma tradução do inglês para paroxysmal depolarizing shift (PDS) (MAJUMDAR *et al.*, 2004).

A PDS caracteriza-se como uma mudança repentina no potencial de membrana do neurônio, o que o torna excitável, ocorrendo, assim, uma despolarização muito intensa e de longa duração. Assim, como o neurônio está muito excitado, torna-se difícil o retorno ao seu estado de repouso, o que leva a um trem de potenciais de ação no pico do PDS (MAJUMDAR *et al.*, 2004).

O período de extrema excitabilidade é gerado principalmente pela ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos como o AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-N-metil-D-aspartato) e NMDA (N-metil-D-aspartato), com subsequente influxo de Ca^{++} através de canais de Ca^{++} dependentes de voltagem (BLANKE *et al.*, 2009). Após isto, o neurônio experimenta um período de pós-hiperpolarização, que é reflexo das propriedades elétricas de membrana dos neurônios (OTMAKHOVA & LISMAN, 2004), ou seja, pela atividade de canais de potássio dependentes de voltagem e cálcio, bem como pela ativação de canais iônicos GABAérgicos, dentre eles o $GABA_A$, um canal de cloreto, e o $GABA_B$, acoplado à proteína G (OTMAKHOVA & LISMAN, 2004).

As crises epilépticas de caráter tônico-clônico são reflexo dessa alternância entre excitação e inibição, caracterizando-se como alvo terapêutico de medicamentos anticonvulsivantes, que podem agir tanto inibindo a hiperexcitabilidade neuronal, quanto estimulando a inibição circundante, o que pode evitar tanto a gênese quanto o alastramento de uma crise (DA SILVA & CABRAL, 2008).

Apesar de na maioria dos neurônios o comportamento tipo PDS ser um evento atípico e, muitas vezes, patológico, outros grupos o fazem como algo fisiológico, como

é o caso de neurônios piramidais na região CA3 do hipocampo, bem como neurônios piramidais corticais. Estes últimos exibem resposta de potencial excitatório pós-sináptico, seguido de potencial inibitório pós-sináptico após receber aferências excitatórias (KANDEL, 2000). Por isso, o PDS pode ser uma resposta exagerada dos componentes excitatórios e inibitórios em circuitos neuronais típicos (MEDVEDEV *et al.*, 2011).

A fase inicial de atividade elétrica anormal restrita chama-se período ictal. O período ictal é seguido de um período interictal, uma sincronização neuronal, um alastramento da crise e, finalmente, uma generalização secundária (MEDVEDEV, 2011).

Diversas outras regiões do SNC conectam-se ao hipocampo através das vias aferentes e eferentes supracitadas. Por este motivo, estas regiões são afetadas durante a epilepsia do lobo temporal, quando descarga epileptogênica é suficientemente forte para superar a inibição circundante (MAGLÓCZKY, 2010).

Assim como o hipocampo, outras estruturas corticais podem estar diretamente relacionadas tanto à gênese da crise, quanto à propagação do estímulo epileptoforme. Dentre essas regiões podemos citar o córtex motor e o tálamo, que se inter-relacionam por uma via tálamo cortical recíproca (KANDEL *et al.*, 2000).

Não está claro, mas supõe-se que em uma crise, as células corticais sejam recrutadas pela influência de células talâmicas, através de vias tálamo corticais, ocorrendo, assim, a sincronização (KANDEL *et al.*, 2000). O tálamo é fundamental para o alastramento da descarga epileptogênica nas crises generalizadas, por ocupar uma posição central nos circuitos do sistema límbico (HAMANI *et al.*, 2008). O tálamo vem

sendo um crescente alvo em estudos com modelos experimentais e pacientes com epilepsia refratária (HAMANI *et al.*, 2008).

Um importante aspecto da epilepsia do lobo temporal são sintomas clínicos emocionais, pela perda neuronal no sistema límbico (VAZQUEZ & DEVINSKY, 2003). Dentre esses sintomas, os pacientes freqüentemente são acometidos por ansiedade, medo, distúrbio obsessivo-compulsivo e estresse pós-traumático.

Outra estrutura também afetada pela descarga epileptogênica é o córtex piriforme, envolvido na percepção e discriminação olfatória, por receber projeções advindas do trato olfatório (PRICE, 1973). O envolvimento do córtex piriforme com o processamento da memória e o alastramento da crise já foi descrito, pela sua ligação com o sistema límbico. Acredita-se que o córtex piriforme desempenhe um papel importante no que se refere tanto à gênese quanto à propagação da crise convulsiva. Durante as crises convulsivas em modelos experimentais de epilepsia, já relatou-se morte celular nesta região (TURSKI *et al.*, 1984).

Uma estrutura com importante envolvimento na epilepsia é o córtex entorrinal, por se localizar entre o neocórtex e o hipocampo e gerar a principal via aferente do hipocampo. Uma hiperexcitabilidade no córtex entorrinal pode induzir sincronização hipocampal e crises epilépticas (JAMALI *et al.*, 2006). Estudos experimentais já demonstraram o envolvimento do córtex entorrinal no alastramento de crises convulsivas (MCINTYRE & KELLY, 2000). Um estudo relativamente recente demonstrou que áreas relacionadas com o hipocampo, como amígdala e córtices entorrinal e piriforme também sofrem perda celular após o insulto epileptogênico bem como apresentam resposta inflamatória, como ativação microglial, o que pode indicar dano tecidual (JUNG *et al.*, 2009).

Apesar destes e de muitos outros estudos buscarem uma maior compreensão da real importância dessas diversas regiões para a epilepsia, o nosso conhecimento nesse sentido ainda é pequeno, se fazendo necessário maiores investigações a respeito do envolvimento relativo, bem como a contribuição na fisiopatologia das regiões supracitadas.

1.2.4 – Terapêutica

Apenas cerca de 70% dos pacientes têm as crises convulsivas controladas por medicamentos (KWAN & BRODIE, 2000). O tratamento cirúrgico pode ser utilizado para o controle das crises convulsivas no restante dos pacientes (HOSHIDA, 2011).

O primeiro procedimento cirúrgico para a epilepsia foi realizado pelo médico Victor Horsley em 1886, que fez a ressecção do córtex adjacente a uma fratura em depressão no crânio e curou um paciente com crises motoras focais (HORSLEY, 1886 Apud GONÇALVES & ALMEIDA, 1995). Na primeira metade do século passado, o método cirúrgico atual começou a ser desenvolvido com a utilização de informação neurofisiológica (PENFIELD & JASPER, 1954 Apud GONÇALVES & ALMEIDA, 1995).

Dos tratamentos medicamentosos disponíveis atualmente observamos o predomínio de dois tipos: aqueles que agem aumentando a neurotransmissão GABAérgica e/ou inibindo a neurotransmissão glutamatérgica (DA SILVA & CABRAL, 2008). Destes, destacam-se a carbamazepina, o fenobarbital, o valproato, dentre outros. É grande o número de medicamentos antiepilépticos disponíveis atualmente, porém, apesar dessa variabilidade, os pacientes ainda se queixam de efeitos colaterais fortíssimos, e, em muitos casos, observa-se ineficácia do tratamento em

alguns subtipos da doença, como acontece na epilepsia do Lobo temporal (DA SILVA & CABRAL, 2008).

1.2.5 – Modelos Experimentais de Epilepsia

1.2.5.1 – Aspectos gerais

A dificuldade em estudos com pacientes portadores de doenças neurológicas é assustadora. No caso da epilepsia, apesar de ser uma doença com abrangência cosmopolita, sua manifestação cortical generalizada torna-a de difícil entendimento nesses pacientes. Por isso, o desenvolvimento de modelos experimentais de epilepsia é fundamental. Os principais modelos experimentais de epilepsia são os seguintes:

- Abrasamento;
- Injeções de ácido cainíco;
- Animais com pré-disposição genética;
- Modelo da pilocarpina

Neste texto, discutiremos apenas o modelo da pilocarpina, o qual foi utilizado no presente estudo.

1.2.5.2 – O Modelo da Pilocarpina

O modelo da pilocarpina foi proposto pela primeira vez em 1984, pelo pesquisador norte-americano Waldemar A. Turski e sua equipe, com a participação dos brasileiros Luiz Eugênio Mello e Esper Abrão Cavalheiro, onde determinaram os padrões citológicos do hipocampo de animais que receberam doses intraperitoneais de Cloridrato de pilocarpina, o que levava o animal a apresentar Epilepsia do Lobo Temporal (TURSKI *et al.*, 1984).

O modelo da pilocarpina configura-se com o um modelo simples, relativamente barato e não-invasivo. Os achados histopatológicos no encéfalo dos animais epiléticos (STANFIELD, 1989) induzidos pela administração da pilocarpina se equiparam àqueles encontrados em humanos (BABB *et al.*,1991) que apresentam ELT, incluindo a diminuição do número de células hipocampais e crescimento de fibras musgosas (MELLO *et al.*, 1993).

Injeções de pilocarpina, um potente agonista colinérgico muscarínico, induzem crises convulsivas em roedores em um padrão consistente com a ELT humana (MELLO *et al.*, 1993). O modelo de pilocarpina é bastante utilizado e consagrado como um excelente modelo experimental desta doença crônica (MELLO *et al.*, 1993). A pilocarpina se liga ao receptor de acetilcolina M1, um receptor metabotrópico acoplado à proteína G. Este receptor não está presente apenas no sistema nervoso, mas também em músculos cardíacos, na junção neuromuscular e no tecido epitelial. O receptor M1 desempenha papel importante na memória e aprendizado, controle do movimento e gênese de crises convulsivas (HAMILTON *et al.*, 1997).

1.3 – INFLAMAÇÃO E EPILEPSIA: O PAPEL DA MICRÓGLIA E DOS ASTRÓCITOS

1.3.1 – Ativação Microglial: Aspectos Gerais

A resposta inflamatória no SNC foi, por muito tempo, praticamente ignorada, por se acreditar que este era “imunologicamente privilegiado” (SCHWARTZ & MOALEM, 2001).

Atualmente sabe-se que o privilégio imunológico não é total (MATYSZAK, 1998; GALEA, 2007). Estudos demonstraram que, em certas condições patológicas do

SNC, a resposta inflamatória é prejudicial ao tecido e pode exacerbar o processo lesivo em doenças agudas e crônicas do SNC (RANSOHOFF & PERRY, 2009).

O SNC possui células especializadas que também desencadeiam respostas imunes, as chamadas células gliais. Estas células são divididas em macroglia (astrócitos e oligodendrócitos) e microglia, a população contendo as células microgлияis, os chamados macrófagos residentes do SNC (BUFFO *et al.*, 2010; RANSOHOFF & PERRY, 2009).

As células gliais são fundamentais para manter a estrutura do SNC através de relações recíprocas com neurônios e outros tipos celulares, com liberação de fatores tróficos, citocinas e outras substâncias (BUFFO *et al.*, 2010; RANSOHOFF & PERRY, 2009).

A micróglia constitui a linhagem macrofágica residente no parênquima do SNC. Em mamíferos adultos ela apresenta morfologia característica, com corpo celular picnótico, citoplasma perinuclear reduzido e processos celulares finos e alongados. Este tipo morfológico caracteriza a micróglia no estágio de repouso, em condições em que o SNC não apresenta alterações patológicas, e está amplamente distribuída por todo o tecido. Estudos *in vivo* demonstraram que as células microgлияis fazem uma constante varredura no parênquima cerebral, realizando, assim, um monitoramento das condições da saúde e normalidade do SNC (NIMMERJAHN *et al.*, 2005).

As células microgлияis estão intimamente relacionadas ao microambiente celular que as circundam, e mudanças nessa vizinhança induzem resposta dessas células, como alterações morfológicas e na expressão de receptores na sua superfície celular (KREUTZBERG, 1999). Porém, ainda não está totalmente claro quais fatores locais determinam essas mudanças. A liberação de purinas, como ATP e ADP parece um

fenômeno importante para a sinalização e movimentação dos processos microgliais durante a manutenção da homeostase do SNC (DAVALOS *et al.*, 2005).

As mesmas podem ser decorrentes de traumas, tumores, doenças degenerativas, acidentes vasculares, entre outros fatores (BLOCK *et al.*, 2007; PERRY *et al.*, 2010). Essas alterações modificam o microambiente celular com liberação de substâncias como citocinas, quimiocinas, substâncias excitotóxicas como o glutamato, ATP, ADP, também modificam a forma com que a micróglia passa a se relacionar com sua vizinhança (BLOCK *et al.*, 2007; PERRY *et al.*, 2010).

A micróglia, assim como os macrófagos periféricos, é a primeira linha de defesa frente a microorganismos ou a lesões de diversas naturezas (STREIT *et al.*, 2005). As células microgliais não apresentam uma via pré-determinada de resposta, e sim variável, que depende, dentre outros fatores, do tipo do estímulo desencadeador da resposta e do estado de ativação em que a micróglia encontra-se no momento do dano (GORDON, 2003).

Para se iniciar um processo patológico, microorganismos ou traumas de diversas naturezas podem ativar receptores de células microgliais, como receptores do tipo toll (BLOCK *et al.*, 2007; RANSOHOFF & PERRY, 2009). A micróglia inicia o processo inflamatório no SNC pela liberação de citocinas pro-inflamatórias e fagocitose de células mortas (ALOISI, 2005; KETTENMANN, 2007). A partir disso, eventos inflamatórios posteriores ocorrem para a manutenção da resposta, como ativação de linfócitos T efetores, produção e liberação de anticorpos e, como resultado, memória imunológica (ROSSI *et al.*, 2011). Neste momento ocorre uma retro alimentação positiva, onde as células microgliais respondem aos produtos da ativação de linfócitos T, como o interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF, do inglês Tumoral

Necrosis Factor) e inter-leucina 1 (IL-1), o que amplifica a resposta microglial e, conseqüentemente, a resposta inflamatória (ROSSI *et al.*, 2011).

Uma das maiores discussões a respeito da resposta inflamatória no parênquima neural é o papel ambíguo da atividade de células microgлияis, pois, enquanto sua ativação constitui-se em uma forma de defesa contra infecção, a exacerbação de sua atividade pode aumentar o dano e contribuir para o alastramento da lesão (SCHWARTZ *et al.*, 2006).

A ativação microglial contribui para a exacerbação do processo lesivo em várias doenças do SNC, incluindo acidente vascular encefálico (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2008), da lesão da medula espinhal (GOMES-LEAL *et al.*, 2005), epilepsia (EKDAHL *et al.*, 2003; BONDE *et al.*, 2006; FABENE *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010) e doenças de Parkinson (McGEER & McGEER, 2008) Huntington (TAI *et al.*, 2007), Esclerose Múltipla (SANDERS & DE KEYSER, 2007), esclerose lateral amiotrófica (MOISSE & STRONG, 2006) e Alzheimer (NAERT & RIVEST, 2011) .

1.3.2 – Ativação Microglial e Epilepsia

Diversos estudos sugerem que a resposta inflamatória tem um papel fundamental nos mecanismos neuropatológicos subjacentes à epilepsia, tanto em animais de experimentação, como em humanos (RAVIZZA *et al.*, 2008; SCHWARCZ, 2008; VEZZANI, 2008). Relatou-se ativação microglial em diversos modelos experimentais de epilepsia, incluindo o modelo experimental por abrasamento (EKDAHL *et al.*, 2003; BONDE *et al.*, 2006), injeções de ácido caínico (AVIGNONE *et al.*, 2008) e pilocarpina (SHAPIRO *et al.*, 2008). Nestes estudos, observou-se intensa e progressiva ativação microglial a partir da primeira semana após a indução de SE. Esta ativação

microglial parece depender de sinalização purinérgica, através da ativação de receptores do tipo P2 na membrana microglial (AVIGNONE *et al.*, 2008).

Existem evidências experimentais (EKDAHL *et al.*, 2003; SOMERA-MOLINA *et al.*, 2007) e após epilepsia humana (CHOI *et al.*, 2009) que a ativação microglial excessiva pode exacerbar o processo lesivo após epilepsia. Ekdahl *et al.* (2003) propuseram que inflamação prejudica a neurogênese basal que ocorre continuamente na SGZ do giro denteado no hipocampo e que tratamento antiinflamatório com a tetraciclina minociclina, um inibidor microglial clássico, pode restaurar os níveis basais de neurogênese nessa região (EKDAHL *et al.*, 2003). Além disso, estudos recentes sugerem que a ativação microglial excessiva contribui para a neurogênese anômala que ocorre no hipocampo após crises convulsivas (YANG *et al.*, 2010), o que pode exacerbar o processo lesivo.

A resposta inflamatória pode aumentar a susceptibilidade de animais a apresentar mais crises epiléticas (SOMERA-MOLINA *et al.*, 2007; GALIC *et al.*, 2008). A indução de inflamação em uma fase precoce da vida de animais, fez com que os mesmos apresentem uma maior susceptibilidade a crises convulsivas e aumento da excitabilidade neuronal na vida adulta (SOMERA-MOLINA *et al.*, 2007; GALIC *et al.*, 2008). Este fenômeno pode estar relacionado a alterações microgлияis (SOMERA-MOLINA *et al.*, 2007) e astrocíticas (GALIC *et al.*, 2008). Outros estudos sugerem que eventos inflamatórios periféricos podem contribuir para o aumento da suscetibilidade de animais a crises convulsivas, através da indução do aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias por astrócitos e microglia no SNC (RIAZI *et al.*, 2010).

Eventos inflamatórios podem contribuir para a gênese de alguns tipos de epilepsia humana (CHOI *et al.*, 2009). Demonstrou-se que no encéfalo de crianças com epilepsia intratável o padrão de morte neuronal difusa correlaciona-se com intensa

ativação microglial e astrocítica, bem como com níveis maiores de citocinas pró-inflamatórias no parênquima neural (CHOI *et al.*, 2009).

1.3.3 – Astrocitose e Epilepsia

Os astrócitos, morfológicamente falando, podem se apresentar sob duas formas: fibrilares e protoplasmáticos (RAIVICH, *et al.*, 1999) . O primeiro caracteriza-se por apresentar processos longos e delgados, enquanto o segundo caracteriza-se por apresentar ramos curtos e numerosos (RAIVICH, *et al.*, 1999). Estas células gliais possuem um papel fundamental na fisiologia do SNC (RANSON *et al.*, 2003; BUFFO *et al.*, 2010). Entre essas funções, pode-se mencionar o seqüestro de K⁺ extracelular, remoção de neurotransmissores, principalmente GABA e glutamato, da fenda sináptica e do meio extra celular, participação da barreira hematoencefálica e, suporte trófico (RANSON *et al.*, 2003; BUFFO *et al.*, 2010). A captação de glutamato é fundamental para o controle da excitabilidade neuronal, evitando excitotoxicidade e o acúmulo de radicais livres (RANSON *et al.*, 2003; BUFFO *et al.*, 2010).

Os astrócitos são ativados após doenças agudas e crônicas do SNC (RAIVICH *et al.*, 1999; BUFFO *et al.*, 2010). Por exemplo, após lesão aguda da medula espinhal, essas células são rapidamente ativadas nas substâncias branca e cinzenta e parecem contribuir para eventos inflamatórios (GOMES-LEAL *et al.*, 2004). Nesta situação, astrócitos reativos proliferam na região lesionada formando a cicatriz glial, que é considerada um fator que impede a regeneração de axônios (PROPERZI *et al.*, 2003). Após isquemia, ocorre intensa astrocitose, a qual pode contribuir para a exacerbação dos eventos lesivos através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e para sobrevivência neuronal através da liberação de fatores tróficos (BLOCK & HONG, 2005; ANDERSON *et al.*, 2003; BUFFO *et al.*, 2010).

O papel dos astrócitos no tecido epiléptico ainda é obscuro, porém, acredita-se que eles estejam relacionados com o desbalanço entre inibição e excitação (ALVESTAD *et al.*, 2011). Muito recentemente, pesquisadores analisaram imagens de ressonância magnética de cérebro de animais que sofreram indução de epilepsia do lobo temporal medial pela injeção de ácido cáínico, e observaram que em diversas regiões como hipocampo, córtices entorrinal e piriforme apresentam diminuição na síntese de GABA (ALVESTAD *et al.*, 2011).

Outras células inflamatórias estão envolvidas na fisiopatologia da epilepsia. Por exemplo, recentemente, ZATTONI *et al.*, (2011) investigaram como a interação entre a imunidade inata e a adaptativa pode contribuir para a reorganização funcional e histológica da formação hipocampal em um modelo experimental de epilepsia do lobo temporal. Neste estudo, observou-se que a ruptura na barreira hemato-encefálica e a neurodegeneração estão relacionadas com a ativação de células microgliais e infiltração macrofágica. Esse trabalho demonstrou também que linfócitos T e B podem desempenhar um papel neuroprotetor na epilepsia, diminuindo a excitabilidade neuronal.

Alguns estudos revelaram que componentes da resposta inflamatória podem ser negativos para a recuperação funcional do SNC em situações lesivas. Esses estudos tem demonstrado que linfócitos também participam da resposta inflamatória no cérebro epiléptico, tanto em humanos quanto em modelos experimentais. Por exemplo, FABENE e colaboradores (2008), usando um modelo de epilepsia do lobo temporal em roedores, demonstraram que a interação de linfócitos com células endoteliais vasculares pode modular crises espontâneas e recorrentes.

1.4 – TRATAMENTO COM MINOCICLINA PARA DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A minociclina é uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração, usada comumente como antibiótico, demonstrando ação satisfatória no tratamento clínico de acnes vulgares e artrite reumatóide (YONG *et al.*, 2004), mas que possui considerável efeitos antiinflamatórios (DOMERCQ & MATUTE, 2004; HEWLETT & CORBETT, 2006). Estudos prévios demonstram que a minociclina pode prevenir morte neuronal e de oligodendrócitos, em diversos modelos experimentais de doenças agudas e crônicas do sistema nervoso (DOMERCQ & MATUTE, 2004). Por exemplo, o tratamento de roedores submetidos à lesão aguda da medula espinhal com minociclina reduziu a degeneração secundária de oligodendrócitos, aumentou a regeneração axonal e modulou a morte celular por apoptose (STIRLING *et al.*, 2004). Além desses achados, a minociclina demonstrou efeitos neuroprotetores também em modelos de Doença de Parkinson (DU *et al.*, 2001), doença de Huntington (CHEN *et al.*, 2008, WANG *et al.*, 2003), esclerose lateral amiotrófica (ZHU *et al.*, 2002.) e esclerose múltipla (POPOVIC *et al.*, 2002).

Com relação à epilepsia, YILMAZ e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento com minociclina diminuiu a perda celular de neurônios hipocámpais e déficits de coordenação motora em animais epiléticos. Assim, a minociclina pode desempenhar um papel neuroprotetor para uma variedade de danos neuronais, incluindo na epilepsia.

Parte do sucesso da minociclina pode estar associada à estrutura química desta droga, mostrada na figura 3 (KIM & SUH, 2009). A organização molecular da minociclina a permite ser até 5 vezes mais lipofílica que as demais tetraciclinas (BLUM *et al.*, 2004). Isso favorece a esta tetraciclina atravessar facilmente a barreira

hematoencefálica (DOMERCQ & MATUTE, 2004; YONG *et al.*, 2004). Além disso, a minociclina é rápida e facilmente absorvida (AGWUH & MACGOWAN, 2006), bem tolerada em altas doses (BLUM *et al.*, 2004) e possui uma meia-vida média superior a outras drogas com ação biológica similar (ANDES & CRAIG, 2002; AGWUH & MACGOWAN, 2006). Estas características fazem da minociclina uma promessa terapêutica para diversas doenças do SNC, incluindo a epilepsia do lobo temporal (DOMERCQ & MATUTE, 2004; YONG *et al.*, 2004; HEWLETT & CORBETT, 2006; KIM & SUH, 2009; YANG, 2010).

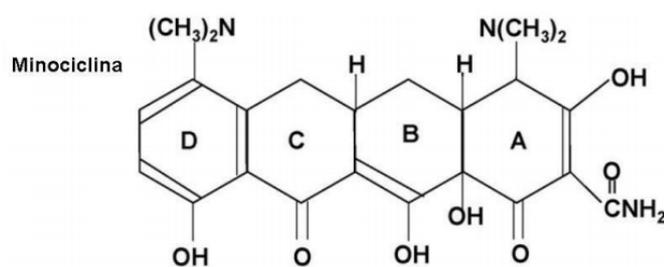


Figura 3. Estrutura molecular da minociclina. Modificado de KIM e SUH (2009).

Ainda não está clara a via pela qual a minociclina age. Na resposta inflamatória, estudos demonstram que a minociclina bloqueia a ativação e infiltração de leucócitos (YONG *et al.*, 2004; STIRLING *et al.*, 2005), atenua a permeabilidade da BHE, inibe as enzimas metaloproteinase de matriz extracelular, sintase do óxido nítrico, atenuando, desta forma, a resposta imune adaptativa (POPOVIC *et al.*, 2002), modula mediadores inflamatórios (YONG *et al.*, 2004), bloqueia receptores do tipo NMDA (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999) e reduz a ativação e proliferação microglial (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; DOMERCQ & MATUTE, 2004; YONG *et al.*, 2004; STIRLING *et al.*, 2005; HEWLETT & CORBETT, 2006; HAYAKAWA *et al.*, 2008). Um estudo recente sugere que a minociclina inibe a ativação microglial por uma ação

especifica em um mediador semelhante à citocina denominado HMGB-1 (do inglês, high-mobility group box 1) (HAYAKAWA *et al.*, 2008).

Na cascata apoptótica, a minociclina pode intervir na disponibilidade extracelular de ligantes de morte (TNF- α e ligante Fas) e/ou na presença de fatores neurotróficos no meio que ativam receptores de sobrevivência na célula. Intracelularmente, o principal alvo da minociclina é a mitocôndria (DOMERCQ & MATUTE, 2004). Nesta organela, o fármaco estabiliza a membrana mitocondrial e impede a liberação de citocromo-C (TENG *et al.*, 2004; YONG *et al.*, 2004; STIRLING *et al.*, 2005), aliado à redução direta da ativação de caspase-3 (STIRLING *et al.*, 2005).

1.5 - O PROBLEMA E A PERGUNTA EXPERIMENTAL

Como exposto acima, a resposta inflamatória, incluindo componentes dos sistemas imunes inato e adaptativo, possuem um papel importante na fisiopatologia da epilepsia experimental, bem como na epilepsia humana (MAROSO *et al.*, 2010; MARCHI *et al.*, 2009; ZATTONI *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem que a resposta inflamatória e imune são prejudiciais durante o processo epiléptico (MAROSO *et al.*, 2010; MARCHI *et al.*, 2009), enquanto que outros estudos sugerem que componentes específicos das respostas inflamatória e imune podem ser benéficos (ZATTONI *et al.*, 2011). Portanto, os papéis da resposta inflamatória e imune durante epilepsia não são totalmente definidos (FABENE *et al.*, 2008).

Até o presente momento, poucos estudos avaliaram os padrões de ativação microglial e astrocitose após epilepsia experimental, bem como os efeitos do bloqueio inflamatório sobre os padrões neurodegenerativos nesta doença. Nesta dissertação,

investigamos os padrões gerais de microgliose, astrocitose e perda neuronal, bem como de que forma o bloqueio microglial influencia os padrões degenerativos em diferentes tempos de sobrevida após a indução de SE induzido por injeções de pilocarpina

1.6 - OBJETIVOS

1.6.1 - GERAL

Investigar os padrões gerais de microgliose, astrocitose e perda neuronal, bem como o efeito da inibição microglial, sobre os padrões neurodegenerativos no hipocampo e em outras regiões motoras e límbicas de ratos adultos na primeira semana após SE induzido por injeção de pilocarpina.

1.6.2- ESPECÍFICOS

1. Implementar o modelo experimental de epilepsia com injeções de pilocarpina no Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará;
2. Descrever os padrões de microgliose e astrocitose no hipocampo, córtices motor, entorrinal lateral, peririnal, piriforme, complexo amigdalóide e talâmo em tempos precoces (1, 3 e 7 dias) após SE induzido por injeções de pilocarpina;
3. Quantificar o padrão de ativação microglial nas regiões CA1, CA3 e hilo do giro denteado do na janela temporal mencionada;
4. Quantificar os padrões de perda neuronal nas regiões hipocámpais mencionais e na janela temporal proposta;
5. Investigar a eficácia do bloqueio microglial com minociclina na fase aguda após a indução de SE.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Foram utilizados 31 ratos Wistar, machos adultos, pesando entre 200-250g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Estes animais foram mantidos em condições padronizadas de luz (12:12 claro:escuro) e alimentação (ração comercial e água *ad libitum*), todos alojados em gaiolas contendo entre 4 e 5 animais. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em obediência às normas sugeridas pela Society for Neuroscience, National Institute of Health (NIH, USA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA, protocolo BIO-0027-11). Todos os esforços foram realizados para evitar o sofrimento e estresse excessivo nos animais.

Para este estudo foram planejados três grupos experimentais e três tempos diferentes de sobrevida para os animais, conforme disposto na Tabela 1.

Tabela 1: Grupos experimentais e tempos de sobrevida utilizados.

| | Sobrevidas | | | | |
|--|-------------|-------------|-------|--------|--------|
| | Pilocarpina | Minociclina | 1 dia | 3 dias | 7 dias |
| Grupo 1 (Salina) | Ø | Ø | 3 | 3 | 3 |
| Grupo 2 (Epiléptico sem Tratamento) | × | Ø | 5 | 5 | 5 |
| Grupo 3 (Epiléptico com tratamento) | × | × | Ø | Ø | 6 |

Ø=ausência de tratamento; X= presença de tratamento.

Os grupos experimentais, por sua vez, receberam esquemas de tratamentos diferenciados. A tabela abaixo descreve esses tratamentos para cada grupo.

Tabela 2: Grupos experimentais e suas respectivas descrições.

| Grupos | Descrição |
|----------------------------------|--|
| Controle | São animais sem indução de epilepsia e sem tratamento com minociclina; foram administrados com salina estéril por via intraperitoneal. |
| Epiléptico sem tratamento | Animais epilépticos sem tratamento com minociclina |
| Epiléptico com tratamento | Animais epilépticos com tratamento com minociclina |

2.2 - INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELO MODELO EXPERIMENTAL DA PILOCARPINA

Aproximadamente 30 minutos antes do tratamento com pilocarpina, foi administrado 1,0 mg/kg de escopolamina por via intraperitoneal, que serve para minimizar os efeitos colinérgicos periféricos indesejáveis que a pilocarpina causa. Em seguida 400 mg/kg de pilocarpina foram administrados por via intraperitoneal nos animais tratados. Sessenta minutos após, os animais receberam injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de diazepam, que interrompe o *Status Epilepticus* (SE) e aumenta a sobrevida dos animais.

2.3 - TRATAMENTO COM MINOCICLINA

Com o intuito de induzirmos inibição da ativação microglial, tratamos um grupo de animais com minociclina, uma tetraciclina semi-sintética que possui este efeito (YRJANHEIKKI, 1999). O protocolo de tratamento foi adaptado de Ekdahl e colaboradores (2003).

Nos dois primeiros dias de tratamento, os animais receberam duas doses diárias de minociclina (50 mg/kg) e, a partir do terceiro dia, os mesmos receberam apenas uma dose diária de 25 mg/kg até o sexto dia após a indução de SE (EKDAHL *et al.*, 2003).

Animais do grupo controle receberam apenas administração com o mesmo volume de solução salina estéril por via intraperitoneal, nos mesmos horários e durante o mesmo período de tempo dos animais tratados com minociclina.

2.4 - PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após os tempos de sobrevivência especificados, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg). Abolidos os reflexos de retirada da pata e corneano, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com 250-300 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) heparinizada, seguido de 250-300 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Depois da retirada dos encéfalos, estes foram pós-fixados por 24h no mesmo fixador. Em seguida, os encéfalos foram crioprotetidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose diluída em uma mistura de glicerina com tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 – 7,4.

Após a crioproteção, os encéfalos foram incluídos gel de imersão para criostato (Tissue-Tek,® Sakura) e seccionados com auxílio de um criostato (Micron, HM505E), onde secções de 20 µm foram obtidas. As secções foram diretamente montadas em lâminas histológicas gelatinizadas e conservadas em um freezer a -20°C para posterior uso.

2.5 - ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

2.5.1 - Análise Histopatológica Geral

A análise histopatológica foi realizada com a coloração pela violeta de cresila. Esta coloração permite a visualização de corpos celulares e a perda dos mesmos em situações patológicas (DOS SANTOS *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008; GUIMARAES *et al.*, 2010). Para tanto, foram coradas secções do hipocampo para análise histopatológica.

2.5.2 - Imunoistoquímica

As análises imunohistoquímicas foram feitas com o objetivo de:

- Marcar corpos neuronais com o anticorpo anti-NeuN (1:100, Chemicon-Millipore), que reconhece um epítipo específico no núcleo de neurônios maduros (MULLEN *et al.*, 1992) para se avaliar os efeitos do SE e dos tratamentos implementados sobre o número de neurônios hipocampais;
- Identificar a presença de microglia/macrófagos ativados pela imunomarcção com o anticorpo ED1 (1:200, Serotec), que reconhece um epítipo na membrana de lisossomas de macrófagos ativados (ROBINSON *et al.*, 1986). Também imunomarcamos células microgliais ativadas e não ativadas com o anticorpo Iba1 (Wako, 1:1000), uma proteína quelante de Ca^{++} presente especificamente em células microgliais (ITO *et al.*, 1998).
- A imunomarcção de astrócitos foi realizada pelo anticorpo anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um marcador clássico de astrócitos (Gomes-Leal, 2004).

Para a realização da imunomarcação, utilizou-se o protocolo descrito em GOMES-LEAL e colaboradores (2004). As lâminas com as secções montadas foram retiradas do freezer e colocadas na estufa (BrasDonto, BrClave®) à 40°C por 30 minutos. Em seguida, as secções foram delimitadas com uma caneta hidrofóbica (Dako Pen, ref. S2002), lavadas em PBS por 3 minutos, e imersas em tampão borato (0,2M, pH 9,0; Nuclear) à temperatura constante de 65°C, por 25 minutos. Após esta fase, as secções ficaram mais 20 minutos à temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas em PBS por 5 minutos e submetidas ao tratamento com solução metanol (QEEL) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Merck) (1ml de H₂O₂ para cada 100ml de metanol absoluto) sob agitação constante. As secções foram então lavadas (3 tempos, 5 minutos cada) em solução de PBS/Tween® (Sigma-Aldrich) e incubadas por 1h em soro normal de cavalo ou cabra a 10% em câmara úmida. Depois, o excesso de soro normal foi retirado para incubação no anticorpo primário, por uma noite. No dia seguinte, as secções foram lavadas (3 tempos, 5 minutos cada) na solução de PBS/Tween® e incubadas por 2h no anticorpo secundário biotilado específico para cada reação (NeuN: Horse anti-mouse; IBA1: Goat anti-rabbit; ED1: Horse anti-mouse; GFAP: Goat anti-rabbit). Após este período, três lavagens foram realizadas (5 minutos cada) em PBS/Tween para, então, as secções serem incubadas no Complexo Avidina-Biotina Peroxidase (Vector, kit ABC Vectastain®) que ficou repousando por meia hora antes de ser então incubado por 2h. As secções foram lavadas (4 tempos, 5 minutos cada) antes da revelação utilizando diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). As secções foram incubadas em uma solução contendo 250 ml de PB 0.1M (pH 7,2 – 7,4) juntamente com 125mg de DAB e 130 µl de H₂O₂. As mesmas foram monitoradas em microscópio óptico (Bioval) até que a intensidade da reação estivesse adequada. Após o

término da revelação, as secções foram lavadas em PB 0,1 M (pH 7,2 – 7,4), desidratadas em gradientes de álcool/ xileno e montadas em Entellan® (Merck).

2.6 - ANÁLISE QUALITATIVA

As secções de todos os grupos experimentais, marcadas pelos métodos imunoistoquímicos e histoquímicos foram analisadas em microscópio óptico (Bioval, L2000C). Imagens de campos representativos foram obtidas com auxílio de uma câmera digital (Moticam 2500) acoplada a um microscópio óptico (Nikon, Eclipse 50i).

2.7 - ANÁLISE QUANTITATIVA

2.7.1 - Método de Contagem

Foram contados os números de macrófagos ativados (células ED1⁺) e corpos neuronais (células NeuN⁺) de todos os grupos experimentais, utilizando objetiva de 40X e retículo de contagem de área 0.0625 mm² acoplada à ocular de um microscópio óptico (Eclipse E200, NIKON®). Utilizou-se nas contagens 3 secções por animal, 18 campos por secção, e, pelo menos, 3 animais para cada grupo experimental.

As regiões contadas foram as camadas de células granulares em CA1 e CA3, e o Hilo do giro denteado. Um retículo de contagem com área total de 0,0625mm², dividido em 100 campos iguais, foi posicionado sobre a camada que se desejava contar, mas apenas 30 divisões foram utilizadas. Por causa das dimensões reduzidas das regiões CA1 e CA3, contou-se três campos de 0,01875 mm², que corresponde a trinta, das cem divisões do retículo de contagem. A camada que se pretendia contar foi posicionada exatamente na área do retículo de contagem anteriormente especificada. O resto da área do retículo de contagem não foi considerada (Figura 6).

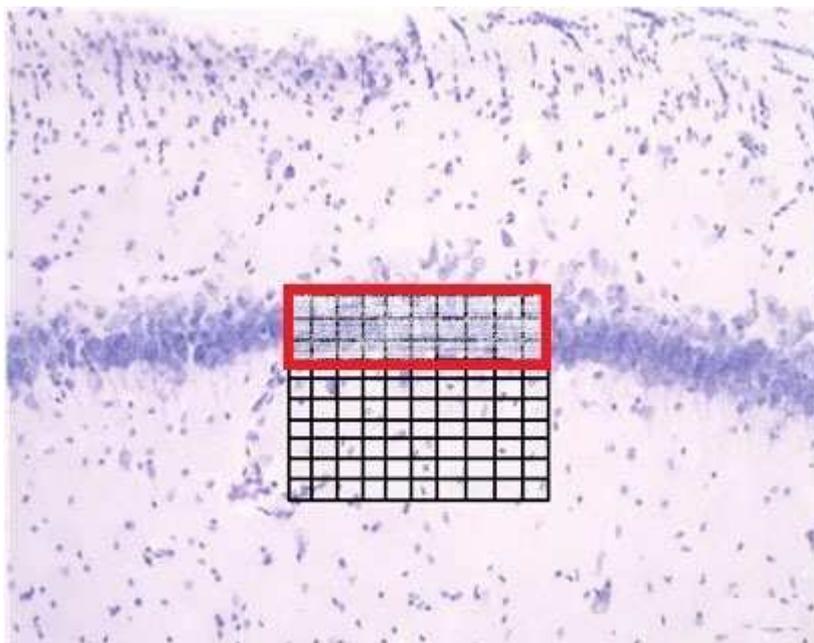


Figura 4: Método de contagem nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo.

2.7.2 -Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância um critério com correção de Bonferoni. O nível de significância estipulado foi de $p < 0,05$ (ANOVA, um critério, *posthoc* Bonferoni, $p < 0,05$). A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad (Prism 5.0).

3. RESULTADOS

3.1 A INJEÇÃO DE PILOCARPINA INDUZ “STATUS EPILEPTICUS” COM MIOCLONIAS DOS MEMBROS ANTERIORES

Após a indução do SE, segundo metodologia previamente descrita, os animais foram observados por uma hora. Aqueles que, durante esse intervalo de tempo, apresentaram crise motora de classe 3 da escala de Racine (1972), caracterizada por mioclonias de membros anteriores, foram considerados em SE. Os que não apresentaram estes critérios foram excluídos do estudo. A escala de Racine é comumente usada como um marcador de profundidade da crise convulsiva. Essa escala é comumente usada em estudos com modelos experimentais de epilepsia para a validação da efetividade do método experimental utilizado (MELLO *et al*, 1993).

Ao observarmos os animais após injeção da pilocarpina, entre quatro e quinze minutos, os animais começaram a apresentar movimentos estereotipados das vibrissas, olhar fixo e postura rígida. A partir desse momento, os animais evoluíam para perda postural momentânea, ou seja, queda pela mioclonia muscular, e rápido retorno postural. Esse período caracteriza-se como crise tônico-clônica de classe 3 da escala de Racine e variou de cinco a vinte minutos.

Passado este período, os animais evoluíam para perda total da postura, com queda, tremores, rigidez muscular, saltos que podiam chegar até a um metro de altura e sangramentos nasal e oftálmico, ou seja, era um período que necessitava de cuidados especiais para se evitar que o animal se machucasse ou mesmo viesse a óbito.

Após o animal apresentar todas essas características e permanecer por, no mínimo, quinze minutos em SE, era aplicado, então, o diazepam, para interrupção da crise e diminuição da taxa de mortalidade entre os animais.

3.2 A INJEÇÃO DE PILOCARPINA INDUZ INTENSA ATIVAÇÃO MICROGLIAL EM DIFERENTES REGIÕES ENCEFÁLICAS NA FASE AGUDA APÓS O “*STATUS EPILEPTICUS*”

3.2.1 Ativação Microglial no Hipocampo

Houve intensa ativação microglial no hipocampo após a indução de SE, com o máximo de ativação ocorrendo nos tempos de sobrevida mais tardios (Figuras 5-8). Nas regiões CA1 e CA3 de animais controle, as células microgliais apresentaram corpos celulares pequenos e ramos finos e delgados, o que caracteriza a chamada microglia em repouso (Figuras 5-6B). Em 24 horas após a indução de SE, as células microgliais adquiriram uma morfologia ameboide ou arredondada, o que caracteriza o aspecto morfológico da ativação microglial (Figuras 5 e 6D,F,H). Esta ativação aumentou progressivamente entre 3 e 7 dias, com o pico máximo de ativação ocorrendo em 7 dias (Figuras 5 e 6 H).

Assim como em CA1 e CA3, houve intensa ativação microglial no giro denteado (Figura 7). A análise de células Iba1⁺ em 24 horas mostrou que os animais que sofreram indução de SE apresentaram mudanças morfológicas, principalmente no que se refere à quantidade e espessura de seus processos, os quais ficaram mais espessos, o que foi concomitante com o aumento do volume do corpo celular (Figura 7,D,F,H). Em 3 e 7 dias após indução de SE, houve aumento progressivo da ativação microglial (Figura 7 F e H).

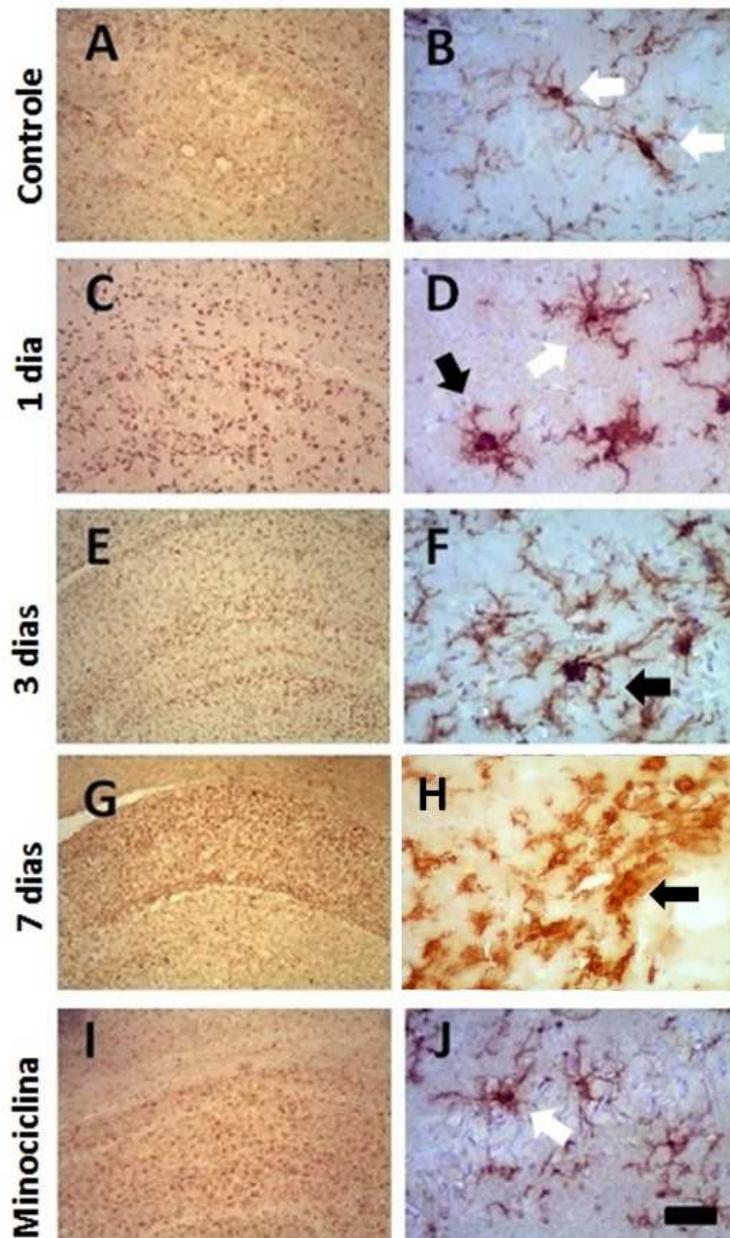


Figura 5: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região CA1 do hipocampo. Animais controle sem epilepsia (A e B) e epiléticos tratados com solução salina 1 (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (I-J). As setas brancas indicam micróglia com padrão morfológico de repouso. Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I); 20 μ m (B,D,F,H,J).

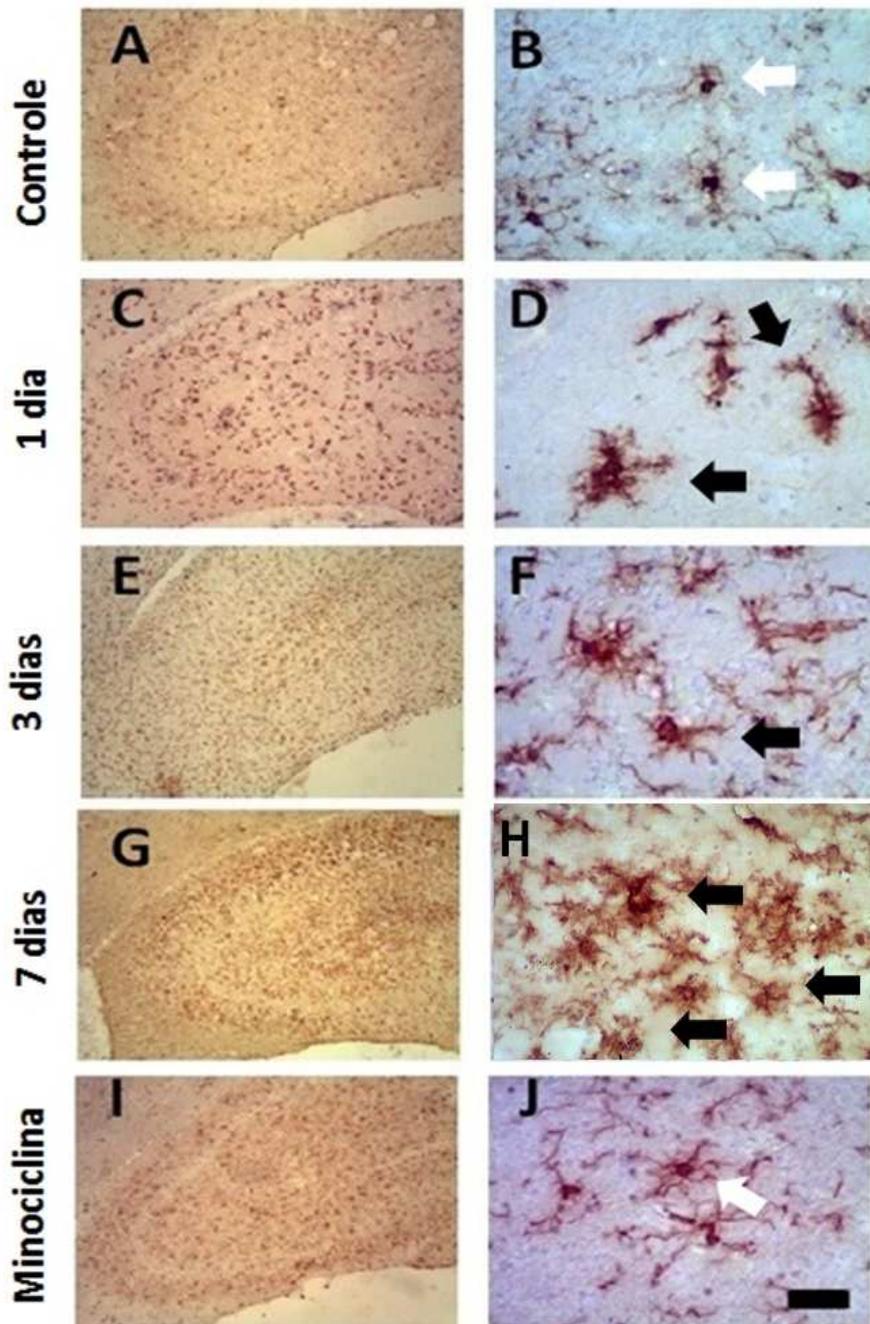


Figura 6: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região CA3 do hipocampo. Animais controle sem epilepsia (A e B) e epiléticos tratados com solução salina 1 (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (I-J). As setas brancas indicam micróglia com padrão morfológico de repouso. Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I); 20 μ m (B,D,F,H,J).

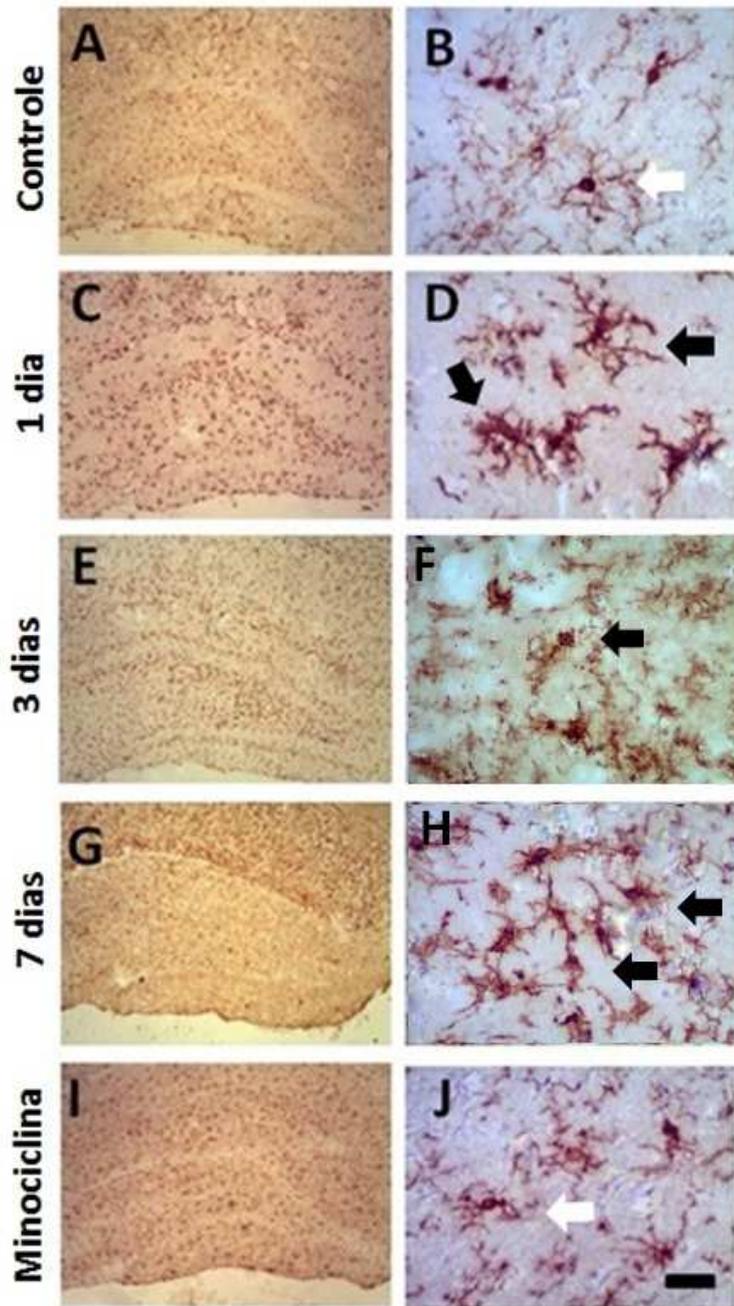


Figura 7: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região do hilo hipocampal. Animais controle sem epilepsia (A e B) e epiléticos tratados com solução salina 1 (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (I-J). As setas brancas indicam micróglia com padrão morfológico de repouso. Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I); 20 μ m (B,D,F,H,J).

3.2.2 Ativação Microglial nos Núcleos Talâmicos

Observou-se intensa ativação microglial no tálamo (Figura 8). Como relatado anteriormente para o hipocampo, a ativação microglial talâmica foi progressiva (Figura 8). Células microgliais ativadas foram observadas no tálamo a partir de 1 dia após SE (Figura 10C-D). Esta ativação microglial tornou-se bastante intensa no tempo de sobrevida de 3 dias (Figura 8E-F), mantendo-se em 7 dias após a indução de SE (Figura 8G-H). A intensidade da ativação microglial nos núcleos talâmicos pareceu bem maior do que a observada no hipocampo, nos tempos de sobrevida investigados.

3.2.3 Ativação Microglial no Córtex Motor

Nós também investigamos o padrão temporal da ativação microglial no córtex motor de animais que sofreram indução de epilepsia através da administração de pilocarpina, na primeira semana após a indução de SE (Figura 9). Como para as outras regiões mencionadas, a ativação microglial foi menos intensa em 1 dia (Figura 9C-D), aumentando progressivamente entre 3 e 7 dias após a indução de SE (Figura 9E-H), em relação aos animais controle (Figura 9A-B). As regiões mediais do córtex motor, como observado em secções coronais, apresentaram ativação microglial intensa (Figura 9).

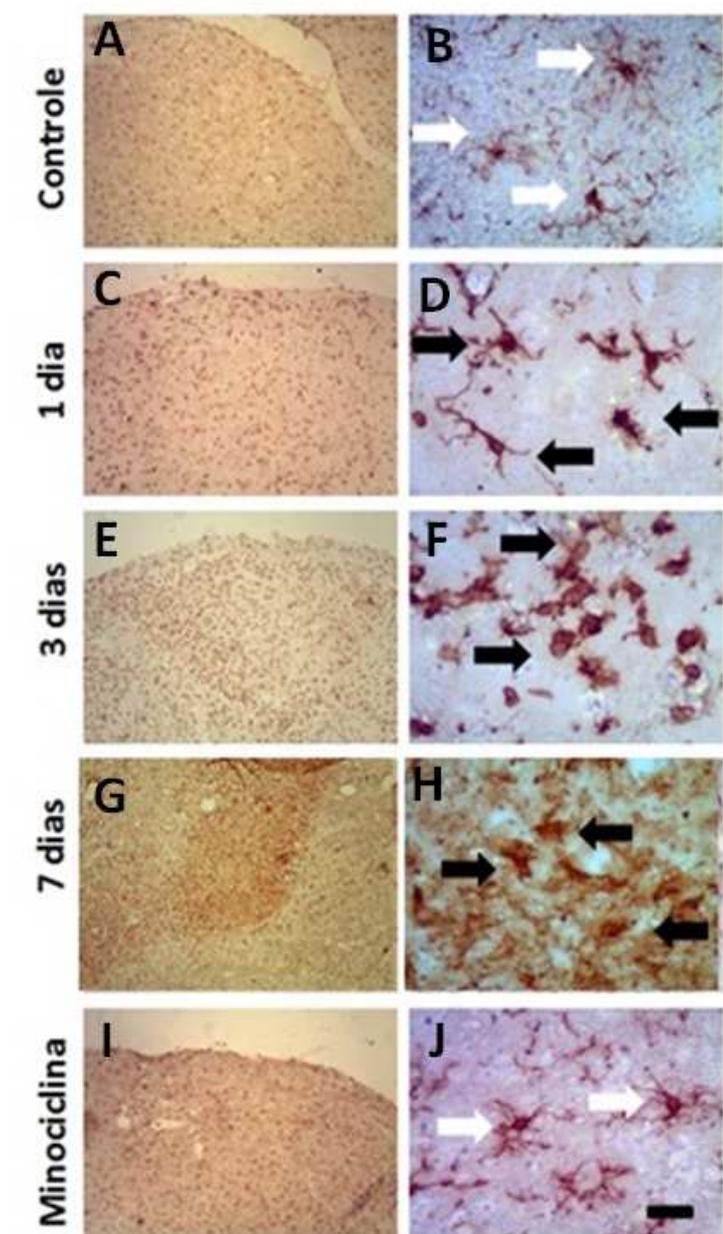


Figura 8: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região do tálamo. Animais controle sem epilepsia (A e B) e epiléticos tratados com solução salina 1 (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (I-J). As setas brancas indicam micróglia com padrão morfológico de repouso. Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I); 20 μ m (B,D,F,H,J).

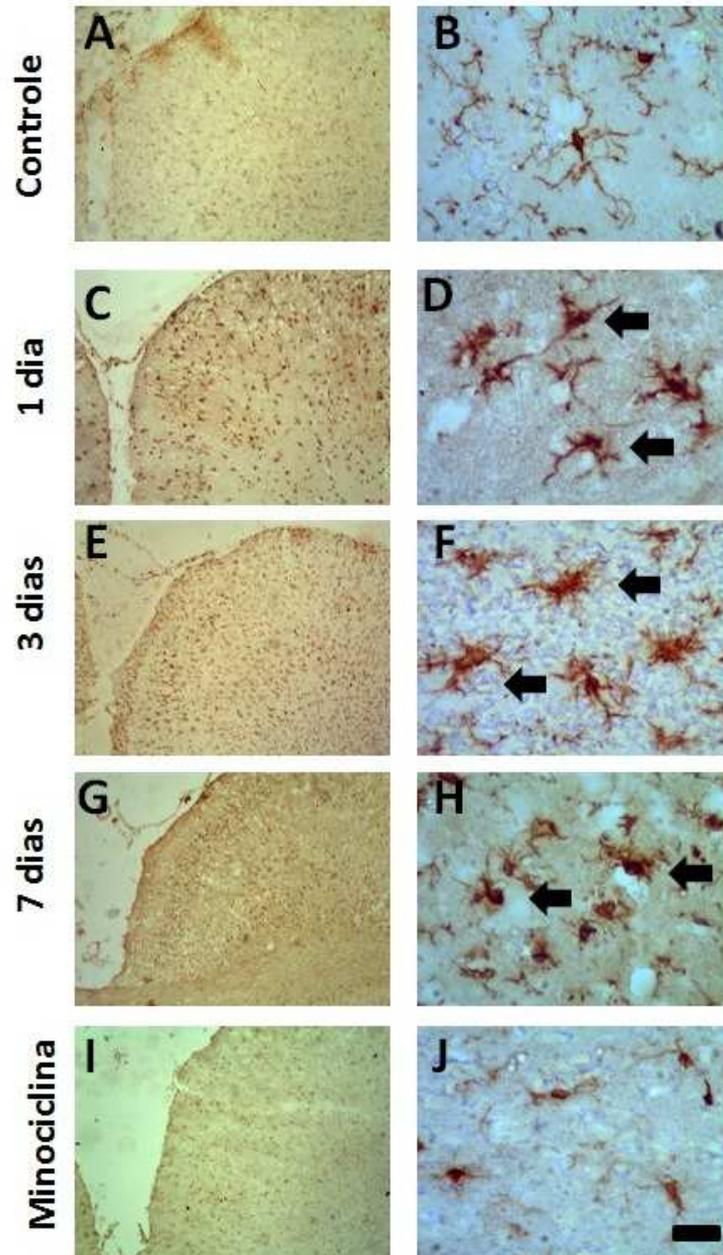


Figura 9: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 na região do córtex motor. Animais controle sem epilepsia (A e B) e epiléticos tratados com solução salina 1 (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (I-J). Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I); 20 μ m (B,D,F,H,J).

3.2.3 Ativação Microglial nos Córtices Peririnal, Entorrinal Lateral, Piriforme e Complexo Amigdalóide

Após a indução de SE, observou-se intensa ativação microglial em diversas estruturas do sistema límbico, além do hipocampo, incluindo córtices peririnal, entorrinal lateral, piriforme e complexo amigdalóide (Figura 10). O padrão de ativação microglial nestas outras regiões límbicas diferiu um pouco da relatada para o hipocampo e tálamo. Nos tempos de sobrevivência mais precoces, intensa ativação microglial foi observada na região em torno da fissura rinal (córtex peririnal), nos córtices entorrinal lateral e piriforme, além do complexo amigdalóide (Figura 10E-H). Nos tempos de sobrevivência mais tardios (3 e 7 dias), houve uma diminuição da ativação microglial, onde as células ficaram mais esparsas numericamente (Figura 10I-P).

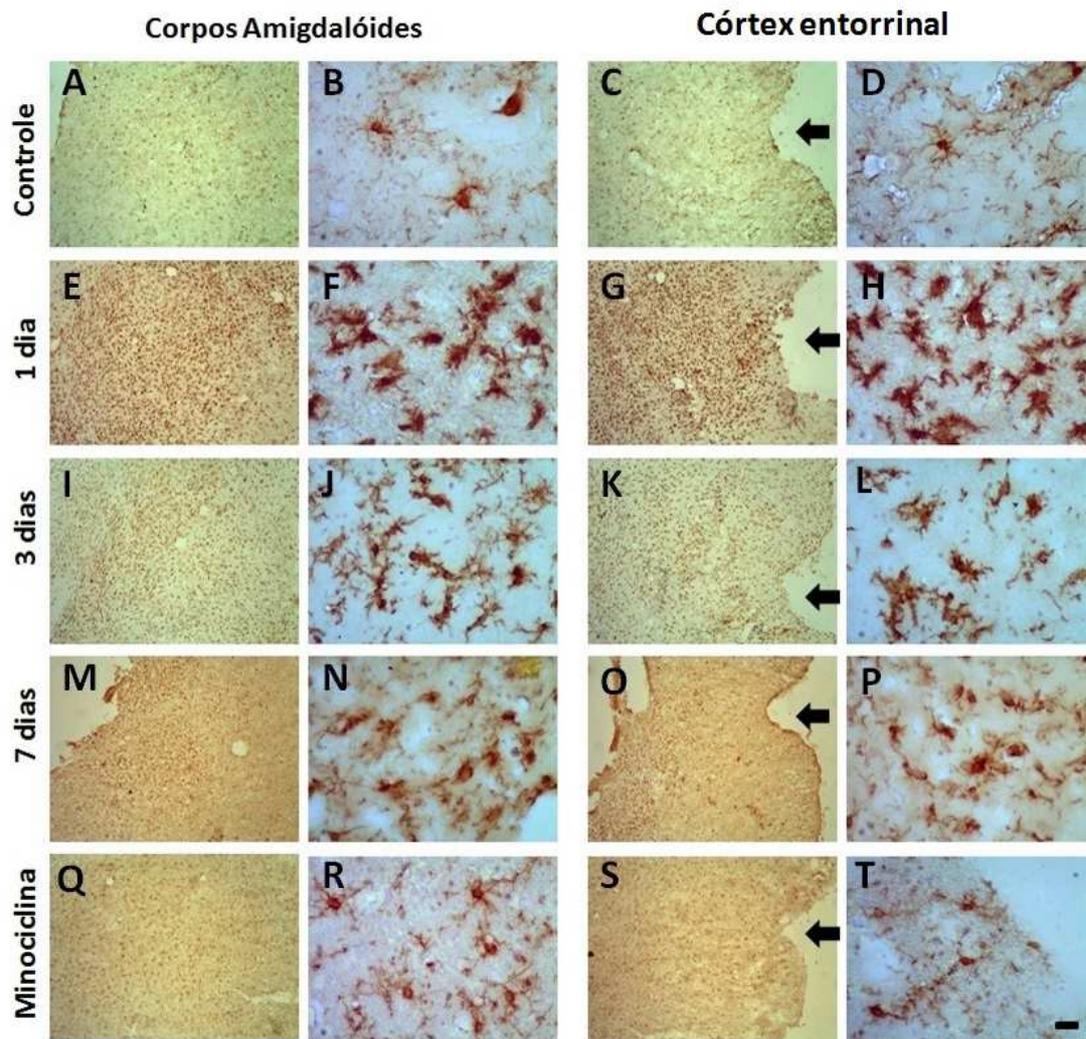


Figura 10: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para Iba1 nos corpos amigdalóides e córtex entorrinal. Animais controle sem epilepsia (A, B, C e D) e epiléticos tratados com solução salina 1 (E, F, G e H), 3 (I, J, K e L) e 7 dias (M, N, O e P) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (Q, R, S e T). Escala= 200 μ m (A, C, I, K, M, O, Q e S); 20 μ m (B, D, F, H, J, L, N, P, R e T).

3.3 ASPECTOS QUANTITATIVOS DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL NO HIPOCAMPO E INIBIÇÃO MICROGLIAL COM MINOCICLINA

Considerando a importância do hipocampo durante o processo epiléptico, investigamos quantitativamente os padrões de ativação microglial em diferentes tempos de sobrevivência após SE, nas regiões CA1, CA3 e hilo do giro dentado do hipocampo (Figuras 11-16). Não realizamos quantificação nas outras regiões límbicas anteriormente mencionadas (córtices peririnal, entorrinal lateral, piriforme e complexo amigdaloide).

As células microgliais/macrofágicas ativadas foram marcadas pelo anticorpo ED1, um marcador clássico de ativação microglial (GOMES-LEAL *et al.*, 2005). Este anticorpo marca principalmente fagócitos, ou seja, células extremamente ativadas com um formato arredondado, enquanto que o Iba1, cujo padrão de marcação foi previamente descrito, marca células microgliais ramificadas, com ativação intermediária, ameboide e arredondada (THORED *et al.*, 2008).

Os padrões de ativação microglial seguiram, no geral, os anteriormente descritos utilizando o anticorpo Iba1 (Figuras 5-7). O número de células ED1+ aumentou progressivamente nas regiões CA1, CA3 e hilo do giro dentado entre 1 e 7 dias após a indução de SE (Figuras 11-16), o que foi confirmado por análise quantitativa (Figuras 12, 14 e 16).

Em CA1, o número de células ED1+ em animais epilépticos não diferiu entre os tempos de sobrevivência de 1 e 3 dias ($p > 0,05$, Figura 11). No entanto, houve um aumento estatisticamente significativo em ambos os hemisférios cerebrais ($p < 0,05$, Figura 12) no número de células ED1+ de animais tratados com pilocarpina no tempo de 7 dias (HD:

17.97± 2.79; HE: 15.00± 2.74) em relação aos animais controle (HD: 1.63± 0.25; HE: 1.74± 0.30). Resultados similares foram obtidos em CA3 (Figura 14), onde o aumento do número de células ED1+ foi mais significativo em 7 dias (epiléticos:HD: 9.71± 1.15; HE: 7.97± 1.27) em relação aos animais controle (HD: 1.40± 0.28; HE: 1.81± 0.35).

A análise quantitativa do número de células ED1+ no hilo do giro denteado revelou um aumento progressivo da ativação microglial em função do tempo de sobrevivência em animais epiléticos. Estes resultados foram confirmados com a contagem de células ED1+ no hilo do giro denteado ($p < 0,05$, Figura 16), a qual revelou um aumento progressivo do número de células ED1+ entre 1 (HD: 5.06± 0.50; HE: 6.28± 0.761), 3 (HD: 13.53± 1.879; HE: 10.51± 1.56) e 7 dias (HD: 9.38± 1.51; HE: 8.69± 1.44).

Para investigarmos a eficácia da minociclina como inibidora da ativação microglial no modelo experimental estudado, tratamos animais com esta tetraciclina ou com solução salina estéril durante 6 dias para avaliação das diferenças, 7 dias após a indução de SE. Os resultados mostram que a minociclina diminuiu significativamente a ativação microglial em todas as regiões estudadas, o que foi revelado pelas análises com os anticorpos Iba1 (Figuras 5-9I-J e 12Q-T) e ED1 (Figuras 11M-N, 12, 13MN-N, 14, 15-M-N e 16).

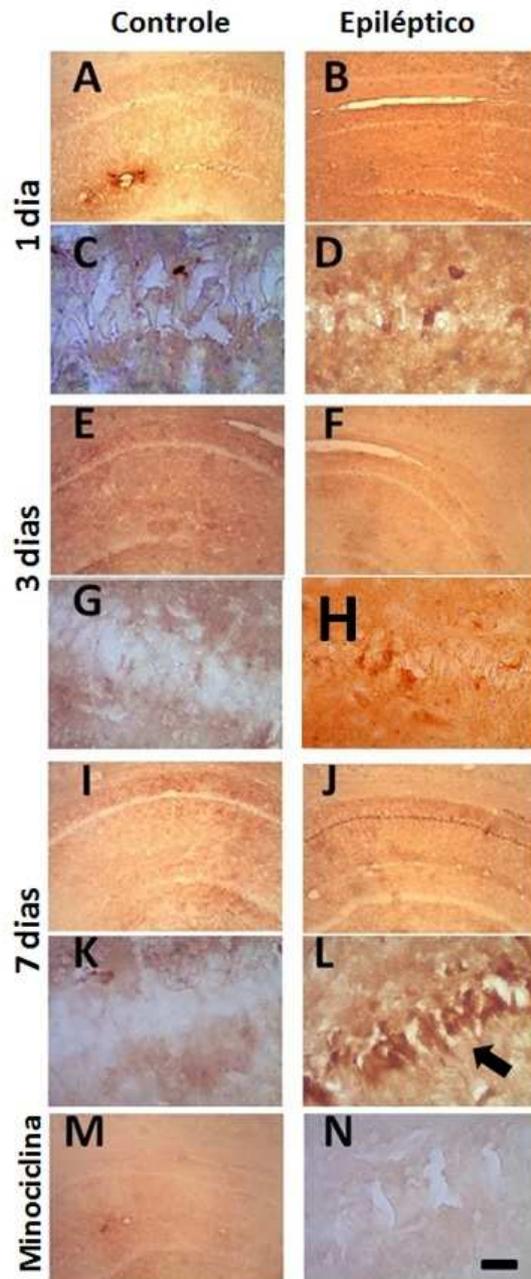


Figura 11: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para ED1 na região CA1 do hipocampo. Um dia: A e C, controle; B e D, epilépticos sem tratamento com minociclina. Três dias: E e G, controle; F e H, epilépticos sem tratamento com minociclina. Sete dias: I e K, controle, J e L, epilépticos sem tratamento com minociclina. Um grupo de animais epilépticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (M-N). Escala= 200µm (A, B, E, F, I, J e M); 20µm (C, D, G, H, K, L e N).

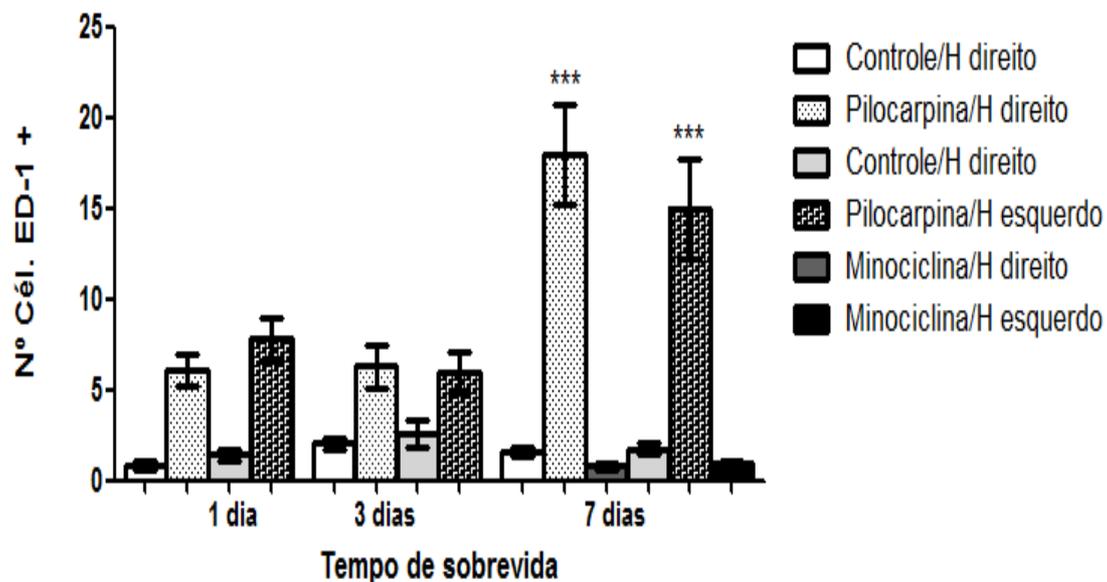


Figura 12: Número de células ED1+ (microglia ativada) na região CA1 do hipocampo de animais controle, epiléticos sem tratamento (1, 3 e 7 dias após indução de SE) e epiléticos tratados com minociclina (7 dias), em ambos os hemisférios. Houve inibição da ativação microglial em animais tratados com minociclina em comparação com animais epiléticos sem tratamento, em 7 dias de sobrevida (***) $p < 0,001$).

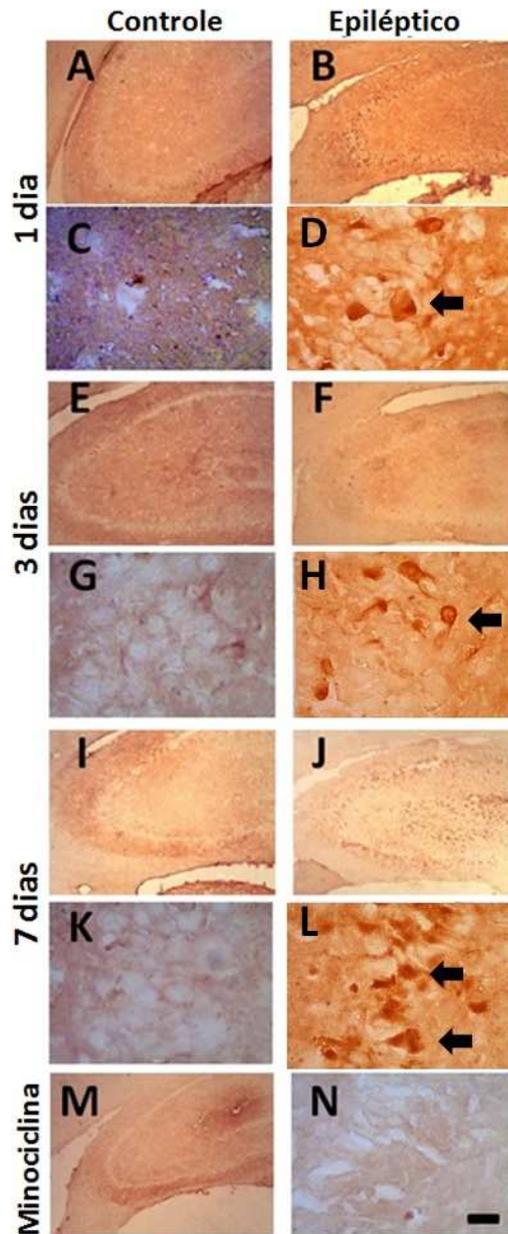


Figura 13: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para ED1 na região CA3 do hipocampo. Um dia: A e C, controle; B e D, epilépticos sem tratamento com minociclina. Três dias: E e G, controle; F e H, epilépticos sem tratamento com minociclina. Sete dias: I e K, controle, J e L, epilépticos sem tratamento com minociclina. Um grupo de animais epilépticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (M-N). Escala= 200µm (A, B, E, F, I, J e M); 20µm (C, D, G, H, K, L e N).

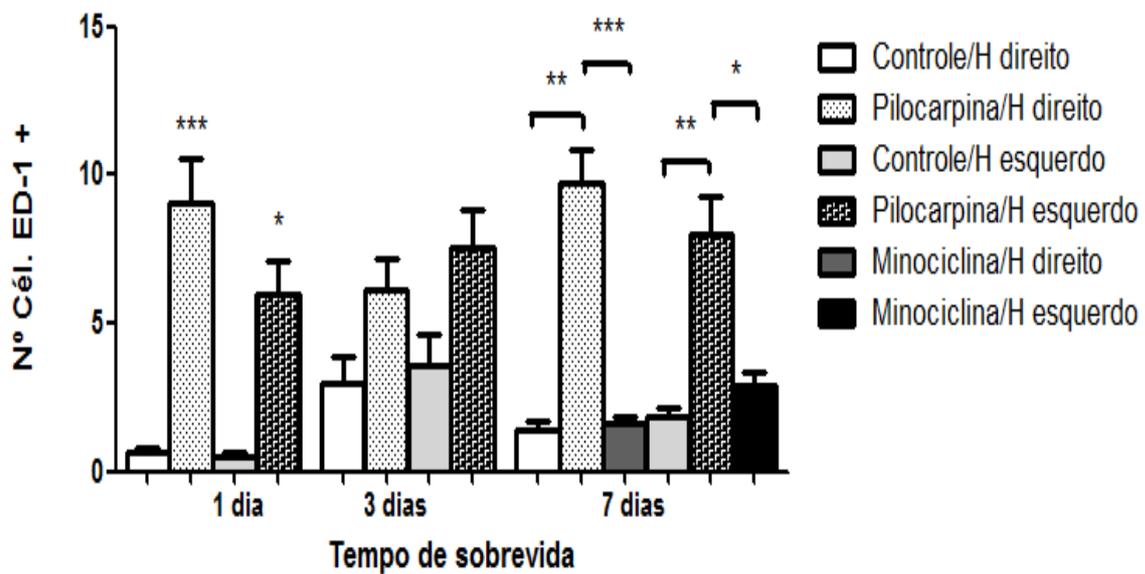


Figura 14: Número de células ED1+ (microglia ativada) na região CA3 do hipocampo de animais controle, epiléticos sem tratamento (1, 3 e 7 dias após indução de SE) e epiléticos tratados com minociclina (7 dias). SE induziu aumento da ativação microglial em 1 e 7 dias, e o tratamento com a minociclina inibiu ativação microglial, em ambos os hemisférios, em comparação à animais que não receberam tratamento (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

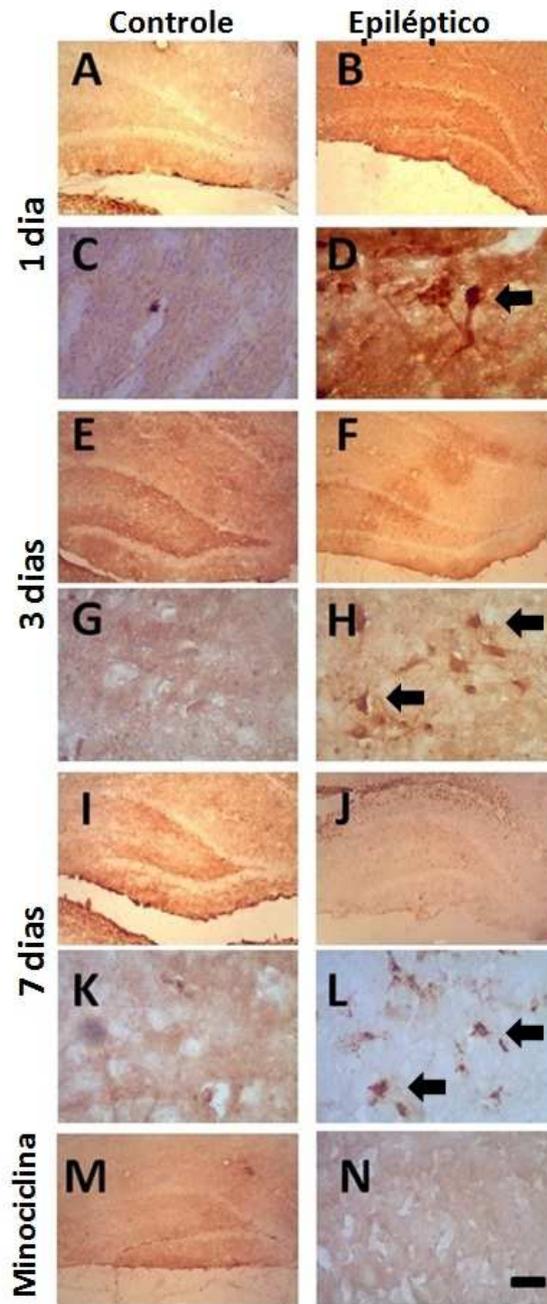


Figura 15: Imunoreatividade microglial revelada pela imunohistoquímica para ED1 na região do hilo hipocampal. Um dia: A e C, controle; B e D, epiléticos sem tratamento com minociclina. Três dias: E e G, controle; F e H, epiléticos sem tratamento com minociclina. Sete dias: I e K, controle, J e L, epiléticos sem tratamento com minociclina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (M-N). Escala= 200 μ m (A, B, E, F, I, J e M); 20 μ m (C, D, G, H, K, L e N).

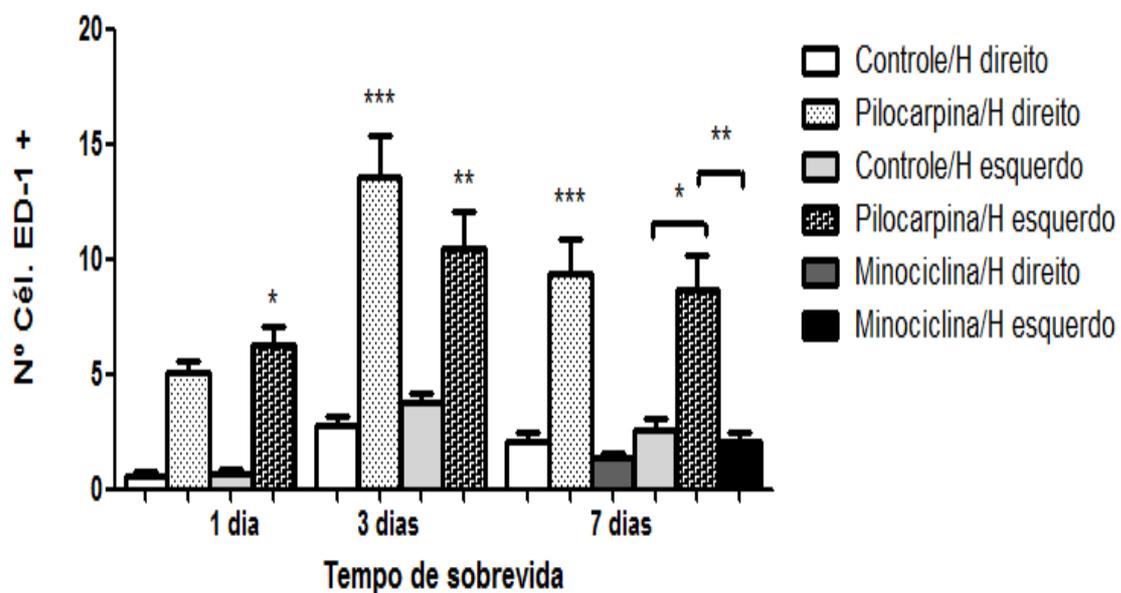


Figura 16: Número de células ED1+ (microglia ativada) na região do hilo hipocampal de animais controle, epiléticos sem tratamento (1, 3 e 7 dias após indução de SE) e epiléticos tratados com minociclina (7 dias), em ambos os hemisférios. SE induziu aumento da ativação microglial em 1, 3 e 7 dias, e o tratamento com a minociclina inibiu ativação microglial, em ambos os hemisférios, em comparação à animais que não receberam tratamento (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

3.4 A INDUÇÃO DE “STATUS EPILEPTICUS” INDUZ INTENSA ASTROCITOSE EM DIVERSAS REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Nós investigamos os padrões de ativação de astrócitos (astrocitose) na primeira semana após SE, utilizando o anticorpo anti-GFAP, um marcador clássico de astrócitos (GOMES-LEAL *et al.*, 2004).

Nos animais controle, tanto os astrócitos da SC (protoplasmáticos) como os da SB (fibrosos) da região hipocampal apresentaram características morfológicas de células não ativadas, cuja principal característica é a presença de ramificações profícuas e corpos celulares não hipertróficos (Figuras 17-19A-B). Este resultado foi observado nas regiões límbicas previamente mencionadas (não ilustrado).

Nas regiões CA1 (Figura 17C-H), CA3 (Figura 18C-H) e hilo do giro denteado (Figura 19C-H) houve conspícua ativação astrocitária que aumentou progressivamente entre 3 e 7 dias após a indução de SE. A ativação astrocitária mencionada foi caracterizada por aumento da imunoreatividade para GFAP, com astrócitos apresentando processos curtos e mais espessos, com hipertrofia do corpo celular (Figuras 17-19C-H). Resultados similares foram observados nas outras regiões límbicas investigadas (não ilustrado).

3.5 O TRATAMENTO COM MINOCICLINA NÃO ALTEROU O PADRÃO DE ASTROCITOSE APÓS A INDUÇÃO DE “STATUS EPILEPTICUS.”

Diferente do que ocorreu para a microgliose, o tratamento com minociclina não alterou o padrão de astrocitose ao sétimo dia (Figuras 17-19I-J). Nos animais tratados com minociclina, os astrócitos apresentaram morfologia bem ativada, compara à dos animais tratados com solução salina (Figuras 17-19I-J).

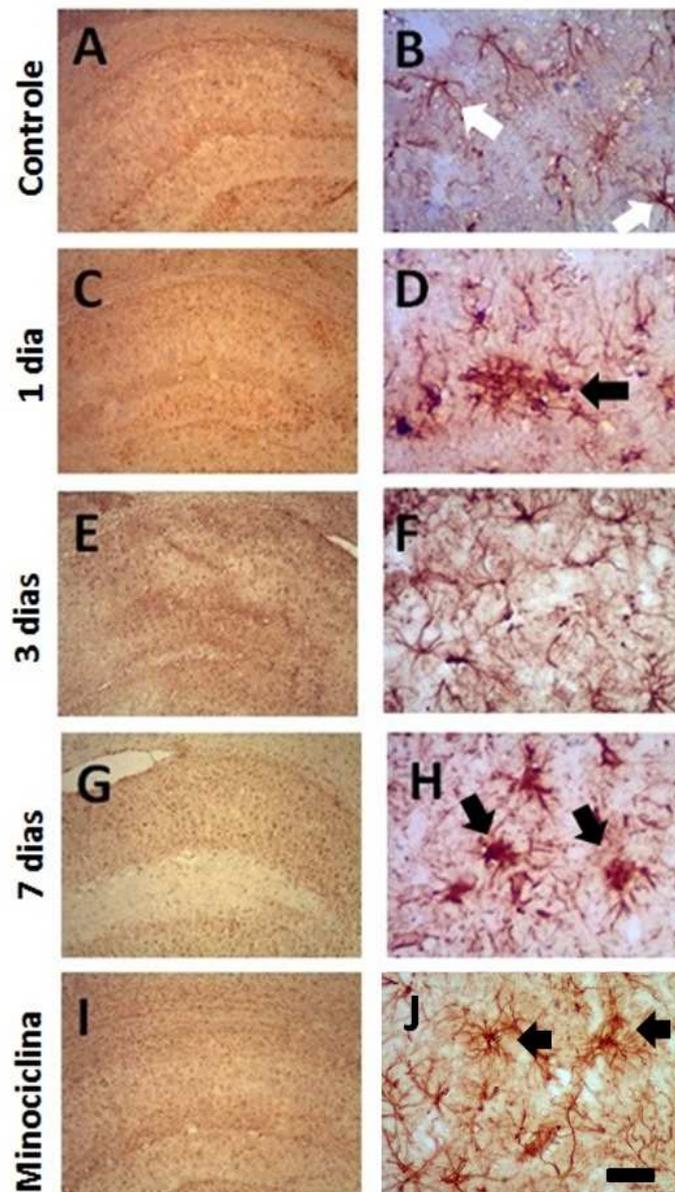


Figura 17: Imunoreatividade astrocitária revelada pela imunohistoquímica para GFAP na região CA1 do hipocampo. Animais controle sem epilepsia (A e B) e epiléticos tratados com solução salina 1 (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (I-J). As setas brancas indicam astrócitos fibrilares. Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I); 20 μ m (B,D,F,H,J).

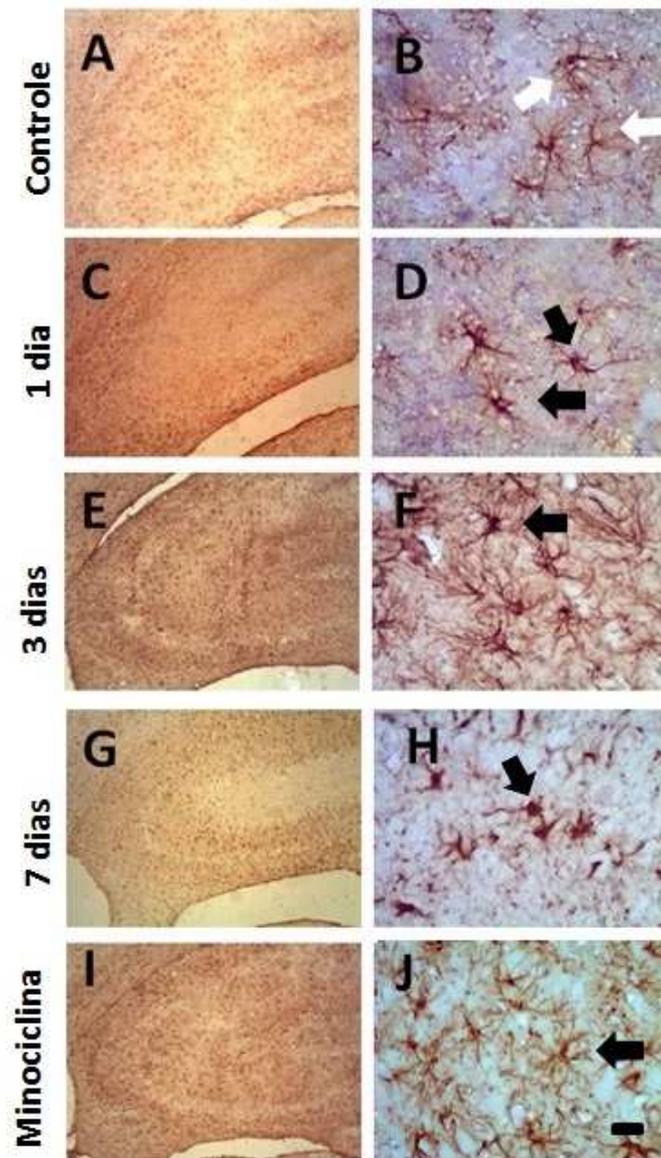


Figura 18: Imunoreatividade astrocitária revelada pela imunohistoquímica para GFAP na região CA3 do hipocampo. Animais controle sem epilepsia (A e B) e epiléticos tratados com solução salina 1 (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (I-J). As setas brancas indicam astrócitos fibrilares. Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I); 20 μ m (B,D,F,H,J).

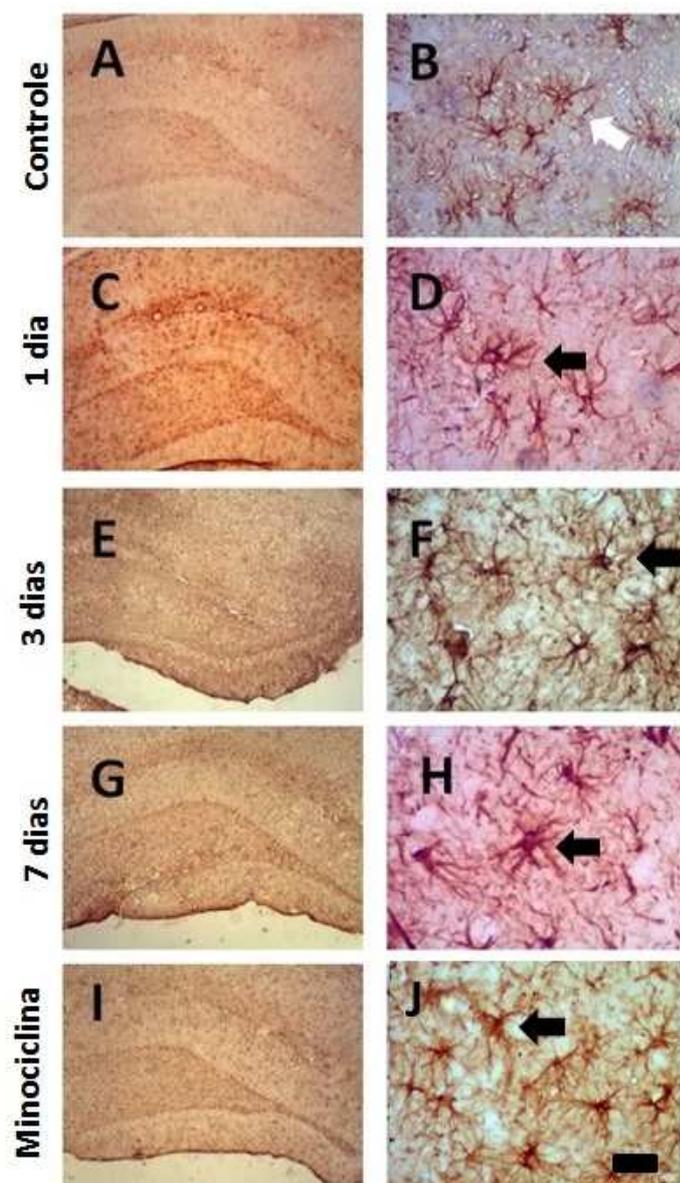


Figura 19: Imunoreatividade astrocitária revelada pela imunohistoquímica para GFAP na região do hilo hipocampal. Animais controle sem epilepsia (A e B) e epiléticos tratados com solução salina 1 (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução de SE com pilocarpina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (I-J). As setas brancas indicam astrócitos fibrilares. Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I); 20 μ m (B,D,F,H,J).

3.6 A INDUÇÃO DE *STATUS EPILÉPTICUS* NÃO INDUZ PERDA NEURONAL NAS REGIÕES CA1, CA3 E HILO DO GIRO DENTEADO DO HIPOCAMPO NA PRIMEIRA SEMANA APÓS “STATUS EPILEPTICUS”

Como descrito na metodologia, os neurônios piramidais das regiões hipocâmpais de CA1, CA3 e hilo do giro dentado foram contados para se avaliar se ocorre perda celular na primeira semana após indução de SE. Apesar de algumas alterações morfológicas esporádicas (Figuras 20, 22 e 24), não houve perda celular evidente nas regiões hipocâmpais investigadas, em relação aos animais controle, segundo a análise quantitativa implementada (Figuras 21, 23 e 25). Resultados qualitativos similares foram observados nos córtices peririnal, entorrinal latera, piriforme e motor (não ilustrado), mas estes resultados não foram quantificados.

O tratamento com minociclina não alterou o padrão de citoarquitetura neuronal previamente descrito (Figuras 20M-N, 21, 22M-N, 23, 24M-N e 25).

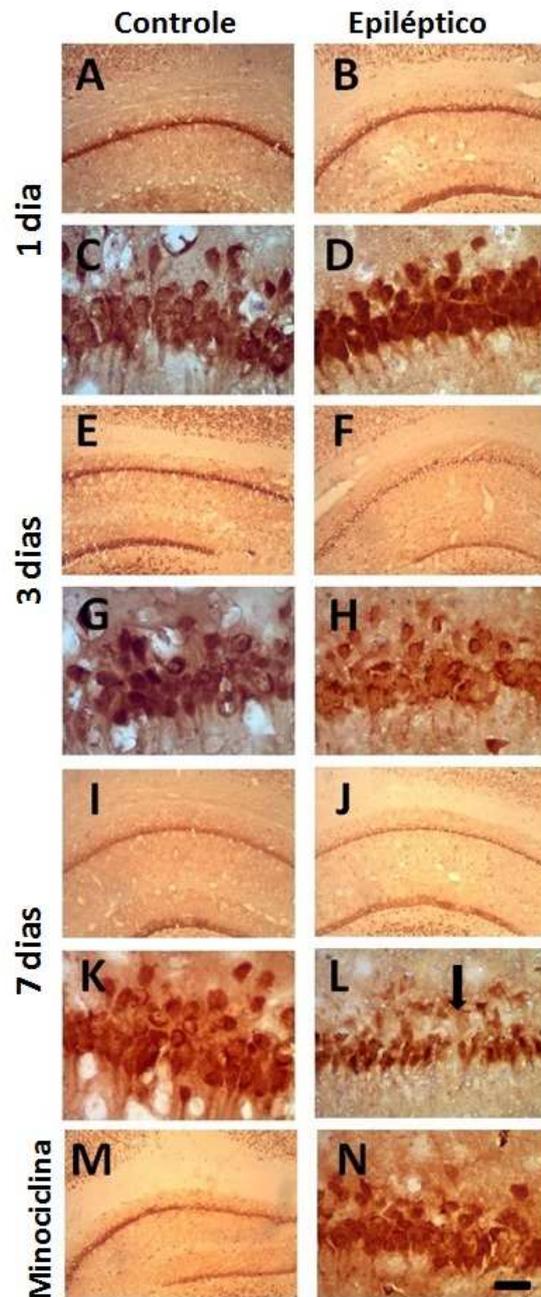


Figura 20: Imunoreatividade neuronal revelada pela imunohistoquímica para NeuN na região de CA1 do hipocampo. Um dia: A e C, controle; B e D, epiléticos sem tratamento com minociclina. Três dias: E e G, controle; F e H, epiléticos sem tratamento com minociclina. Sete dias: I e K, controle, J e L, epiléticos sem tratamento com minociclina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (M-N). Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I, K e M); 20 μ m (B, D, F, H, J, L e N).

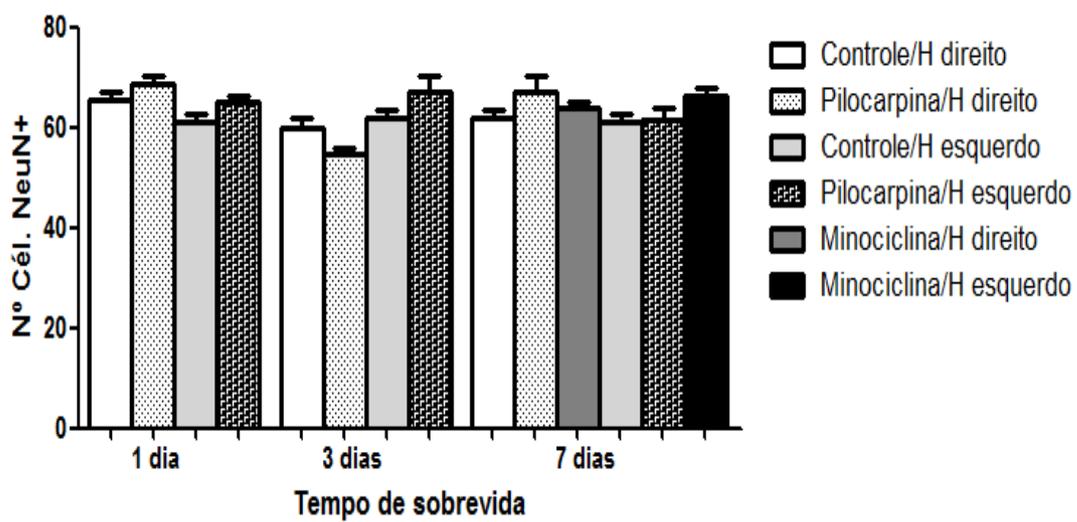


Figura 21: Número de células NeuN+ (neurônios adultos) na região CA1 de animais controle, epiléticos sem tratamento (1, 3 e 7 dias após indução de SE) e epiléticos tratados com minociclina (7 dias), em ambos os hemisférios. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

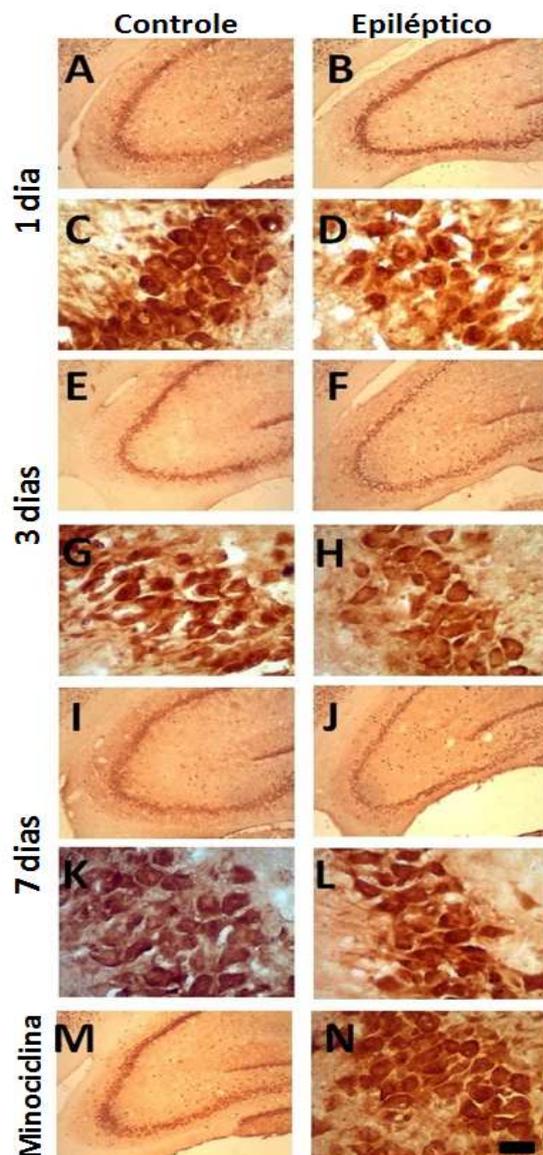


Figura 22: Imunoreatividade neuronal revelada pela imunohistoquímica para NeuN na região de CA3 do hipocampo. Um dia: A e C, controle; B e D, epiléticos sem tratamento com minociclina. Três dias: E e G, controle; F e H, epiléticos sem tratamento com minociclina. Sete dias: I e K, controle, J e L, epiléticos sem tratamento com minociclina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (M-N). Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I, K e M); 20 μ m (B, D, F, H, J, L e N).

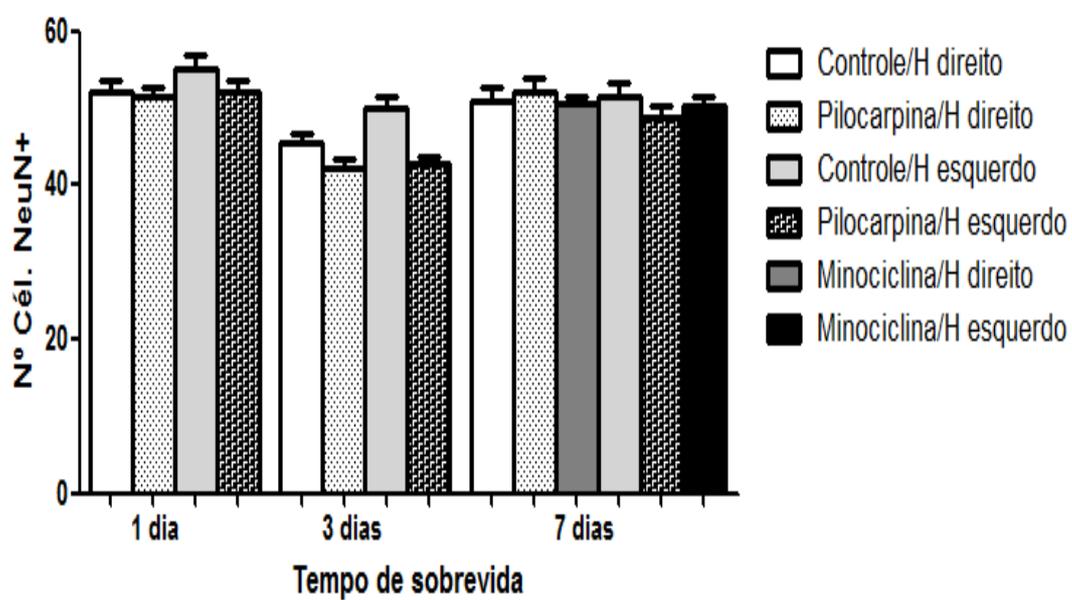


Figura 23: Número de células NeuN+ (neurônios adultos) na região CA3 de animais controle, epiléticos sem tratamento (1, 3 e 7 dias após indução de SE) e epiléticos tratados com minociclina (7 dias), em ambos os hemisférios. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

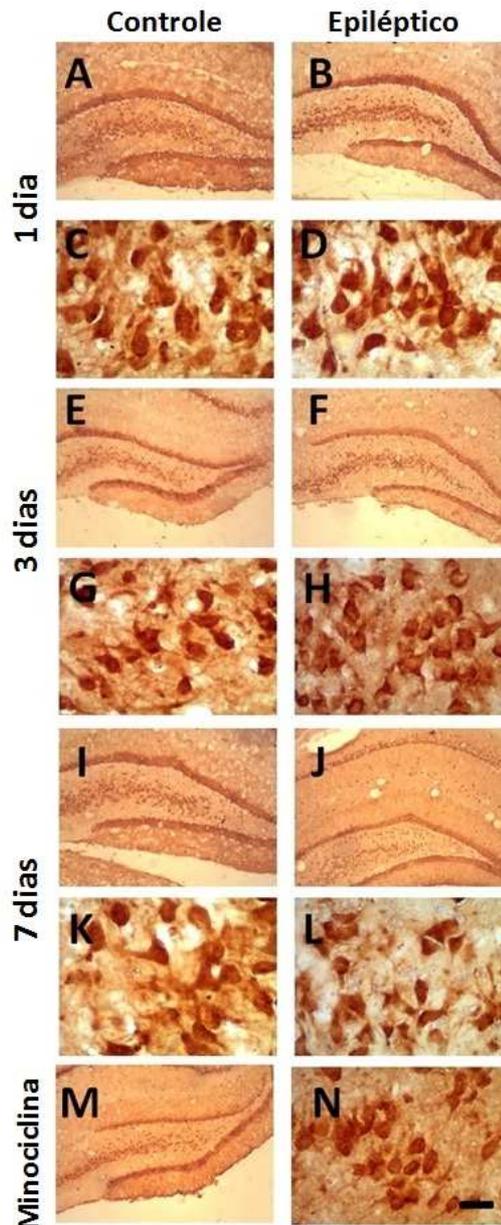


Figura 24: Imunoreatividade neuronal revelada pela imunohistoquímica para NeuN na região do hilo hipocampal. Um dia: A e C, controle; B e D, epiléticos sem tratamento com minociclina. Três dias: E e G, controle; F e H, epiléticos sem tratamento com minociclina. Sete dias: I e K, controle, J e L, epiléticos sem tratamento com minociclina. Um grupo de animais epiléticos foi tratado com minociclina no tempo de 7 dias (M-N). Escala= 200 μ m (A, C, E, G, I, K e M); 20 μ m (B, D, F, H, J, L e N).

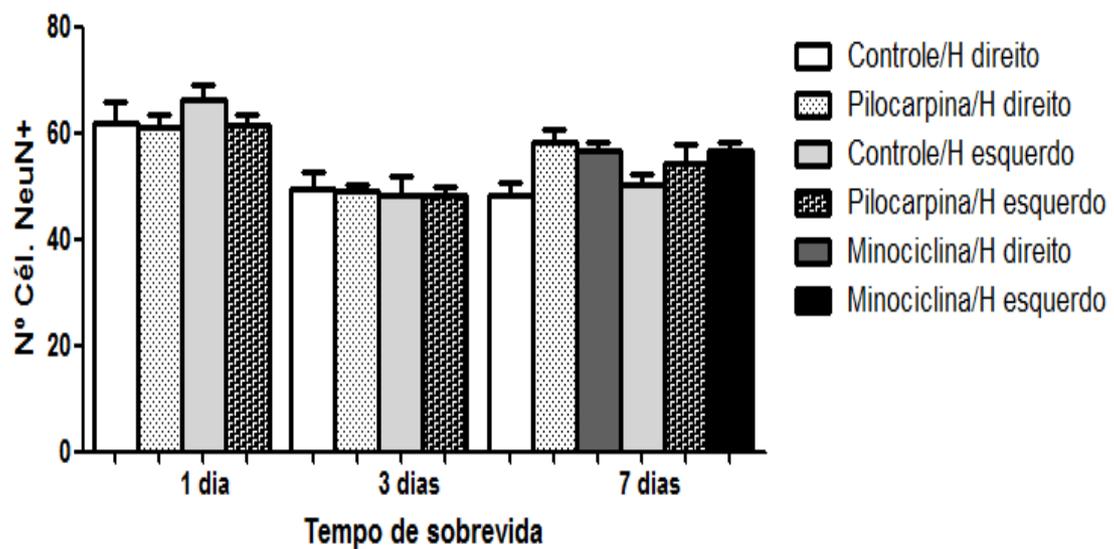


Figura 25: Número de células NeuN+ (neurônios adultos) no hilo do giro denteado de animais controle, epiléticos sem tratamento (1, 3 e 7 dias após indução de SE) e epiléticos tratados com minociclina (7 dias), em ambos os hemisférios. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nesta dissertação, realizou-se indução de epilepsia do lobo temporal em ratos adultos com o uso de injeções do agonista muscarínico pilocarpina, para se estudar os padrões de ativação microglial, astrocitose e perda neuronal em diferentes regiões do SNC, incluindo hipocampo, tálamo, e córtices motor, peririnal, entorrinal lateral e piriforme na primeira semana após a indução de SE.

Animais com SE, apresentando 60 min de crises convulsivas, desenvolveram conspícua reposta inflamatória, caracterizada por intensa ativação microglial e astrocitose em áreas motoras e límbicas. Os padrões de microgliose e astrocitose foram progressivos, principalmente nas regiões hipocampais, atingindo seu ápice em 7 dias após a indução de SE. Nas regiões peririnais e complexo amigdalóide, a reposta inflamatória pareceu mais precoce, com pico nos primeiros dias, diminuindo em 7 dias. Não houve perda neuronal nos tempos de sobrevivência investigados. A tetraciclina minociclina foi eficaz em diminuir a ativação microglial em todas as áreas investigadas, mas não diminuiu os níveis de astrocitose.

O modelo da pilocarpina é um dos mais usados como modelo experimental de epilepsia do lobo temporal, por mimetizar a condição humana, principalmente no que se refere à recorrência das crises e aos padrões histopatológicos (TURSKI *et al.*, 1989; CURIA *et al.*, 2008). Assim, apenas uma administração da droga possibilita a ocorrência de crises espontâneas, com alterações comportamentais típicas, progredindo até SE (TURSKI *et al.*, 1984; MELLO *et al.*, 1993; CURIA *et al.*, 2008).

A indução das crises convulsivas depende da ativação de receptores muscarínicos do tipo M1, o que generaliza a ativação colinérgica, principalmente em áreas límbicas (HAMILTON *et al.*, 1997; CURIA *et al.*, 2008). A ativação de vias colinérgicas é apoiada pelo fato de que outros agonistas colinérgicos, bem como bloqueadores da função colinérgica, como a atropina, induzem crises convulsivas em um padrão similar ao induzido pela pilocarpina (TURSKI *et al.*, 1984; EVANS *et al.*, 1990).

Apesar do modelo da pilocarpina ser amplamente estabelecido, uma importante contribuição desta dissertação foi a implementação do modelo da pilocarpina no Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Este é um passo fundamental para estudos futuros sobre a fisiopatologia e terapêutica da epilepsia.

4.2 OS PADRÕES DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL SUGEREM DIFERENTES PADRÕES TEMPORAIS DE COMPROMETIMENTO TECIDUAL EM DIVERSAS ÁREAS MOTORAS E LÍMBICAS APÓS A INDUÇÃO DE “*STATUS EPILÉPTICOS*”

Neste estudo, avaliamos os padrões de resposta microglial na primeira semana após a indução de SE. Observamos intensa ativação microglial no hipocampo em diversas regiões motoras e do sistema límbico, incluindo córtices motor, piriforme, entorrinal lateral, peririnal e complexo amigdalóide. O padrão inflamatório pareceu diferente entre algumas regiões, com reação inflamatória mais intensa em tempos precoces nas regiões rinais e complexo amigdalóide, e ativação microglial progressiva

em tempos mais tardios nas outras regiões, incluindo tálamo e hipocampo. Estes padrões inflamatórios não foram descritos sistematicamente em estudos anteriores, apesar do relato clássico que estas regiões motoras e límbicas são afetadas no modelo de pilocarpina (TURSKI *et al.*, 1984).

Essa diferença temporal na ativação microglial das diferentes regiões hipocámpais pode estar diretamente relacionada com a ordem em que as regiões sofrem o dano e/ou à importância que elas possam vir a apresentar no momento da descarga epileptogênica. Uma região envolvida em um momento inicial da crise pode sofrer alterações estruturais e induzir ativação microglial precocemente. Regiões lesionadas tardiamente, podem apresentar um padrão de ativação microglial tardio. Segundo esta hipótese, os padrões de ativação microglial servem como um índice histopatológico importante do padrão espacial e temporal de comprometimento tecidual durante a epilepsia.

No modelo experimental estudado, os resultados sugerem que regiões límbicas presentes nas regiões peririnais e complexo amigdalóide são lesionadas primeiro, para depois ocorrer lesão em regiões talâmicas, hipocámpais e do córtex motor. Estudos recentes apoiam esta hipótese, pelo menos no que concerne ao córtex entorrinal, onde sugeriu-se que hiperexcitabilidade em regiões profundas desta região, pode ser um foco importante de alterações elétricas que irão propagar-se tardiamente para outras regiões límbicas (BRAGIN *et al.*, 2009).

Relatou-se ativação microglial em regiões isoladas após indução de SE em diversos modelos experimentais, incluindo o modelo experimental por abrasamento (EKDAHL *et al.*, 2003; BONDE *et al.*, 2006), injeções de ácido cáínico (AVIGNONE *et al.*, 2008) e pilocarpina (SHAPIRO *et al.*, 2008). Nestes estudos, observou-se intensa

e progressiva ativação microglial a partir da primeira semana após a indução de SE. Existem evidências experimentais (EKDAHL *et al.*, 2003; SOMERA-MOLINA *et al.*, 2007) e após epilepsia humana (CHOI *et al.*, 2009) que a ativação microglial excessiva pode exacerbar o processo lesivo após epilepsia. Ekdahl *et al.* (2003) propuseram que inflamação prejudica a neurogênese basal que ocorre continuamente na SGZ do giro denteado no hipocampo e que tratamento antiinflamatório com a tetraciclina minociclina, um inibidor microglial clássico, pode restaurar os níveis basais de neurogênese nessa região (EKDAHL *et al.*, 2003). Além disso, estudos recentes sugerem a ativação microglial excessiva contribui para a neurogênese anômala que ocorre no hipocampo após crises convulsivas (YANG *et al.*, 2010), o que pode exacerbar o processo lesivo.

A resposta inflamatória pode aumentar a susceptibilidade de animais a apresentar mais crises epiléticas (SOMERA-MOLINA *et al.*, 2007; GALIC *et al.*, 2008). A indução de inflamação em uma fase precoce da vida de animais, fez com que os mesmos apresentassem uma maior susceptibilidade a crises convulsivas e aumento da excitabilidade neuronal na vida adulta (SOMERA-MOLINA *et al.*, 2007; GALIC *et al.*, 2008). Este fenômeno pode estar relacionado à ativação microglial (SOMERA-MOLINA *et al.*, 2007) e astrocítica (GALIC *et al.*, 2008). Outros estudos sugerem que eventos inflamatórios periféricos podem contribuir para o aumento da suscetibilidade de animais à crises convulsivas, através da indução do aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias por astrócitos e microglia no SNC (RIAZI *et al.*, 2010).

Eventos inflamatórios podem contribuir para a gênese de alguns tipos de epilepsia humana (CHOI *et al.*, 2009). Demonstrou-se que no encéfalo de crianças com epilepsia intratável o padrão de morte neuronal difusa correlaciona-se com intensa

ativação microglial e astrocítica, bem como com níveis maiores de citocinas pró-inflamatórias no parênquima neural (CHOI *et al.*, 2009).

As alterações teciduais nas circunstâncias mencionadas podem ser a base neural para diversas alterações funcionais relatadas em modelos experimentais de epilepsia, bem como em humanos. Após injeção de pilocarpina, um evento histopatológico marcante é a esclerose hipocampal, uma característica fundamental da epilepsia humana do lobo temporal (SLOVITER *et al.*, 2005; CURIA *et al.*, 2008). As reações inflamatórias nas regiões em torno da fissura reinal, córtex piriforme e complexo amigdalóide podem estar relacionadas às alterações teciduais nesta região, que podem ser a base neural para o fato de pacientes apresentarem alucinações olfatórias, medo e outras alterações límbicas na iminência ou após crises convulsivas (CARDOSO *et al.*, 2009; GROTIKKE *et al.*, 2007; CURIA *et al.*, 2008; LESTING *et al.*, 2011).

O tálamo foi uma das regiões na qual a resposta microglial foi mais intensa a partir do terceiro dia após a indução de SE. Este achado histopatológico sugere que alterações talâmicas iniciam na primeira semana após SE. Outros estudos relataram que as alterações talâmicas perduram por diversos meses após SE, principalmente nos núcleos anteriores talâmicos (BORGES *et al.*, 2003). Relatou-se que a estimulação excessiva de núcleos anteriores do tálamo é um fenômeno importante para o aumento da excitabilidade e para a generalização das crises convulsivas após SE (KANDEL, 2000; HAMANI *et al.*, 2008). A injeção de agonistas GABAérgicos, como o muscimol, nesta região não inibe, mas retarda o surgimento de crises convulsivas induzidas por pilocarpina (BITTENCOURT *et al.*, 2010).

No presente estudo, a minociclina foi eficaz em diminuir a ativação microglial em todas as regiões estudadas. Esta tetraciclina vem sendo usada como inibidor

microglial em diversas doenças do SNC (YONG *et al.*, 2004). Após isquemia, o tratamento com minociclina induz neuroproteção, diminuindo em até 65% a área de infarto cortical e 45% a área de infarto estriatal (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999). Após epilepsia, poucos estudos investigaram a eficácia da minociclina como bloqueador microglial. Relatou-se que o tratamento com minociclina diminui a ativação microglial no hipocampo após SE induzido por estimulação elétrica, aumentando a neurogênese endógena hipocampal (EKDAHL *et al.*, 2003). O tratamento com minociclina e outras tetraciclina diminui a perda neuronal no hipocampo após SE induzido por injeção de penicilina (YILMAZ *et al.*, 2006). Além disso, o tratamento com esta tetraciclina diminui a morte celular por vias dependentes e independentes de caspases no hipocampo após a injeção de ácido caínico (HEO *et al.*, 2006) e diminui a neurogênese anômala hipocampal induzida por pilocarpina (YANG *et al.*, 2010).

Os estudos mencionados anteriormente, sugerem que a inibição da ativação microglial é uma terapia promissora para minimizar a perda celular após SE. No entanto, sua eficácia ocorre em tempos tardios após SE, quando a perda neuronal é evidente. Neste estudo, avaliamos a resposta microglial na primeira semana após SE, um período no qual não acontece perda neuronal significativa. No entanto, este estudo mostra que alterações teciduais sutis ocorrem precocemente após SE. Além disso, a resposta inflamatória em regiões extrahipocampais, como regiões próximas à fissura rinal, córtex piriforme e complexo amigdalóide não tinham sido sistematicamente investigadas. Estudos futuros devem investigar, de forma quantitativa, a resposta microglial no hipocampo e em outras regiões límbicas, bem como a eficácia da minociclina como agente neuroprotetor em tempos crônicos após SE induzido por pilocarpina. Um outro aspecto a ser investigado, é como os padrões eletroencefalográficos são alterados pelo tratamento com anti-inflamatórios.

4.3 OS PADRÕES DE ASTROCITOSE ACOMPANHAM OS DE MICROGLIOSE APÓS “*STATUS EPILÉTICUS*”

Após a indução de SE, observamos intensa ativação astrocitária em todas as regiões investigadas. Esta astrocitose acompanhou o padrão de microgliose, o que sugere que a gliose reativa é um excelente parâmetro histopatológico para avaliar temporal e espacialmente as alterações teciduais em fases iniciais após SE.

A astrocitose é um achado proeminente em modelos experimentais de epilepsia, bem como em pacientes com epilepsia do lobo temporal (NISHIO *et al.*, 2000; KHURGEL *et al.*, 1992; MIYAZAKI *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003; SCHWARCZ, 2008; SHAPIRO *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2010). Alguns estudos sugerem que a astrocitose pode contribuir para as alterações eletrofisiológicas ou lesão tecidual após epilepsia experimental (NISHIO *et al.*, 2000; KHURGEL *et al.*, 1992; MIYAZAKI *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003; SCHWARCZ, 2008; SHAPIRO *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2010). Após crises convulsivas induzidas por abrasamento, ocorre intensa astrocitose, o que pode estar relacionado à esclerose hipocampal e ao agravamento da crise convulsiva (KHURGEL *et al.*, 1992). Outros estudos, utilizando o mesmo modelo experimental, sugerem uma correlação direta entre astrocitose e o agravamento das crises convulsivas (MIYAZAKI *et al.*, 2003).

Os astrócitos, além de inúmeras outras funções que mantém a homeostase tecidual normal, são responsáveis pela absorção extracelular de glutamato que, quando em excesso, pode causar excitotoxicidade e morte neuronal (ANDERSON & SWANSON, 2000). Um possível mecanismo do envolvimento astrocitário com a fisiopatologia da epilepsia é a disfunção de transportadores de glutamato presentes na membrana de astrócitos (TANAKA *et al.*, 1997). Camundongos transgênicos que não

possuem o transportador glutamatérgico GLT-1 apresentam crises convulsivas letais e maior suscetibilidade à danos neuronais (TANAKA *et al.*, 1997).

Há relatos de que ativação de receptores ionotrópicos de glutamato do tipo AMPA (VERKHRATSKY e STEINHAUSER, 2000) e alguns receptores metabotrópicos (NOTENBOOM *et al.*, 2006), além de canais iônicos dependentes de cálcio (VOLTERRA & MELDOLESI, 2005) podem estar relacionados à gênese de crises convulsivas. Este último tem recebido especial atenção recentemente pois é sabido que o cálcio pode induzir liberação de glutamato, contribuindo para a propagação da excitabilidade da vizinhança neuronal e aumentando ainda mais o dano neuronal na crise epiléptica (VOLTERRA & MELDOLESI, 2005).

Acredita-se que alterações em astrócitos possam estar relacionadas ao desbalanço entre inibição e excitação neuronal (ALVESTAD *et al.*, 2011). A análise de imagens obtidas por ressonância magnética do encéfalo de animais que sofreram indução de epilepsia do lobo temporal medial pela injeção de ácido caínico revelaram diminuição dos níveis de GABA em diversas regiões hipocampais e nos córtices entorrinal e piriforme (ALVESTAD *et al.*, 2011).

Neste estudo, o tratamento com minociclina não alterou o padrão de astrocitose. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores, confirmando que o tratamento com minociclina possui um efeito sobre as células microgliais, mas não sobre outras células gliais, incluindo astrócitos (YANG *et al.*, 2010).

Estudos futuros devem ser realizados, utilizando tempos de sobrevida mais crônicos, para se estabelecer o perfil temporal de astrocitose no modelo de pilocarpina. Abordagens que inibam a astrocitose devem ser implementadas para esclarecer o papel da ativação de astrócitos na fisiopatologia da epilepsia.

4.4 A INJEÇÃO DE PILOCARPINA NÃO INDUZ PERDA NEURONAL NA PRIMEIRA SEMANA APÓS A INDUÇÃO DE “STATUS EPILEPTICUS”

Neste estudo, não encontrou-se perda de neurônios NeuN⁺ em CA1, CA3 e hilo hipocampal, 1, 3 e 7 dias após indução de SE por pilocarpina. Este resultado está de acordo com estudos prévios (TURSKI *et al.*, 1984; CURIA *et al.*, 2008) que relatam que uma latência de, no mínimo, duas semanas é necessária para a ocorrência de perda neuronal. Mello e colaboradores (1993) descreveram esclerose hipocampal 36 dias após indução de SE. Essa esclerose foi maior na região de CA3 e apresentou correlação positiva com o período silencioso. Isso significa que quanto maior a latência que o animal apresenta para apresentar crises espontâneas e recorrentes, maior é a perda neuronal (MELLO *et al.*, 1993).

O modelo da pilocarpina apresenta três fases de implementação da epilepsia: (1^a) Fase aguda, dura de um a dois dias e é onde ocorre o status epiléptico; (2^a) Período silencioso, que dura de 4 e 44 dias, o animal não tem crises epiléticas e (3^a) Fase crônica, em que o animal apresenta convulsões espontâneas e recorrentes, que manifesta-se entre 5 e 45 dias após o SE (CURIA *et al.*, 2008). O declínio do número de neurônios após SE, amplamente relatado em humanos e modelos animais de epilepsia, é conhecido como esclerose hipocampal. Durante esta doença, alguns neurônios hipocampais são mais vulneráveis, como por exemplo os interneurônios inibitórios do hilo hipocampal, o que gera um declínio da função inibitória no local (CURIA *et al.*, 2008).

Provavelmente, a morte seletiva de certas populações de interneurônios inibitórios do hipocampo contribua para o alastramento das crises convulsivas por diminuir a inibição em torno do foco epilético (CURIA *et al.*, 2008).

Em tempos mais tardios após a indução de SE pode haver perda neuronal através de mecanismos excitotóxicos (LIPTON & ROSENBERG, 1994; TANAKA *et al.*, 1997; WEISS *et al.* 2000). Indiretamente, a pilocarpina parece influenciar, em fase tardia, no aumento de concentrações extracelulares de glutamato, que pode levar a uma cascata de reações culminando na morte de neurônios (MELDRUM, 1994).

Os padrões de perda neuronal devem ser investigados em tempos crônicos após a indução de SE por pilocarpina. É possível que estes padrões sejam diferentes em regiões hipocâmpais e extra-hipocâmpais, considerando o que foi anteriormente descrito com relação à resposta inflamatória. Estes padrões podem ser influenciados pela perda de aferência e eferência hipocâmpal após SE. Estudos futuros devem investigar o papel da inibição microglial e astrocitária sobre a perda celular nas diversas regiões motoras e límbicas investigadas nesta dissertação.

5. CONCLUSÕES

- A administração de pilocarpina foi eficaz para induzir SE em ratos Wistar adultos, o que levou à implementação deste modelo experimental em nosso laboratório ;
- Após SE, ocorre resposta inflamatória precoce e generalizada, caracterizada por microgliose e astrocitose em diversas regiões motoras e límbicas, com ápice na primeira semana no hipocampo e córtex motor e nos primeiros dias em outras regiões límbicas;
- A injeção de pilocarpina não induz perda neuronal no hipocampo na primeira semana após a indução de SE;
- A tetraciclina minociclina é um inibidor eficaz de ativação microglial, mas não de astrocitose no modelo experimental investigado.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudos futuros devem investigar os padrões de astrocitose, microgliose e perda neuronal em tempos de sobrevivência crônicos após SE induzido por injeção de pilocarpina, avaliando o potencial da minociclina e de inibidores de astrócitos como agentes neuroprotetores. Deve-se investigar, nestes experimentos, os efeitos destes procedimentos sobre a neurogênese hipocampal, bem como os efeitos funcionais do tratamento anti-inflamatório com o uso de testes comportamentais para a avaliação de déficits hipocampais e motores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGWUH, K.N. & MACGOWAN, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.2, p.256-265, Aug. 2006.

ALOISI, F. Cytokine production. In Neuroglia, H.R, B.R. Kettenmann, ed. **New York: Oxford UP**, pp. 285-301. 2005.

ALVESTAD, S.; HAMMER, J.; QU,H.; HÅBERG, A.; OTTERSEN, O. P.; SONNEWALD, U. Reduced astrocytic contribution to the turnover of glutamate, glutamine, and GABA characterizes the latent phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* :10.1038/jcbfm.2011.36. 2011.

ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T.; O'KEEFE, J. The Hippocampus book, **Oxford University Press**, 1^a Edição, paginas 3-832. 2007.

ANDERSON, C. M., & SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1-14. 2000.

ANDERSON, M. F.; BLOMSTRAND, F.; BLOMSTRAND, C.; ERIKSSON, P. S.; NILSSON, M. strocytes and stroke: networking for survival? **Neurochem Res** :28, 293-305. 2003.

ANDES, D. & CRAIG, W.A., Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.19, n.4, p.261-268, Apr. 2002.

ARVIDSSON, A.; COLLIN, T.; KIRIK, D.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nat Med**, 8:963-970. 2002.

AVIGNONE, E.; ULMANN, L.; LEVAVASSEUR, F.; RASSENDREN, F.; AUDINAT, E. Status Epilepticus Induces a Particular Microglial Activation State Characterized by Enhanced Purinergic Signaling. **The Journal of Neuroscience**, September 10• 28(37):9133–9144. 2008.

BABB, T.L. Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. **Adv Neurol**, 79: 763–779. 1999.

BABB, T.L., KUPFER, W.R., PRETORIUS, J.K., ISOKAWA-AKESSON, M., LEVESQUE, M.F. Synaptic recurrent excitation of granule cells by mossy fibers in human epileptic hippocampus. **Neuroscience**, 42:3S 1-63. 1991.

BADAN, I.; BUCHHOLD, B.; HAMM, A.; GRATZ, M.; WALKER, L.C.; PLATT, D.; KESSLER, C.; POPA-WAGNER, A.; Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. **J Cereb Blood Flow Metab** 23:845–854. 2003.

BARABAN, S.C.; SOUTHWELL, D.G.; ESTRADA, R.C.; JONES, D.L.; SEBE, J.Y.; ALFARO-CERVELLO, C.; GARCIA-VERDUGO, J.M. Reduction of seizures by transplantation of cortical GABAergic interneuron precursors into Kv1.1 mutant mice. **Proc Natl Acad Sci**, 106:15472–15477. 2009.

BAUER, G.; DAO, M.A.; CASE, S.S.; In vivo biosafety model to assess the risk of adverse events from retroviral and lentiviral vectors, **Mol. Ther**, 16:1308–1315. 2008.

BEACH, T. G.; WOODHURST, W. B.; MACDONALD, D. B. & JONES, M. W. Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. **Neurosci. Lett.** 191; 27–30. 1995.

BELL, B.D. & GIOVAGNOLI, A.R. Recent innovative studies of memory in temporal lobe epilepsy. **Neuropsychol Rev**;17:455–76. 2007.

BERG, A.T.; TESTA, F.M.; LEVY, S.R.; SHINNAR, S.; The epidemiology of epilepsy. Past, present, and future. **Neurol Clin** 14:383-398. 1996.

BITTENCOURT, S.; DUBIELA, F. P.; QUEIROZ, C.; COVOLAN, L.; ANDRADE, D.; LOZANO, A.; MELLO, L. E.; & HAMANI, C. Microinjection of GABAergic agents into the anterior nucleus of the thalamus modulates pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. **Seizure** 19, 242-246. 2010.

BLANKE, M.L.; VANDONGEN, A.M.J. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. *Frontiers in Neuroscience*, **CRC Press**, Chapter 13. 2009.

BLIGHT, A.R. & ZIMBER, M.P. Acute Spinal Cord Injury: Pharmacotherapy and Drug Development Perspectives. **Curr Opin Investig Drugs**, 2:801-808., 2001.

BLOCK, M. L. & HONG, J. S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. **Progress in Neurobiology**: 76, 77-98. 2005.

BLOCK, M.L.; ZECCA, L. & HONG, J.S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v.8, n.1, p.57-69, Jan. 2007.

BLUM, D.; CHTARTO, A.; TENENBAUM, L.; BROTCHE, J. & LEVIVIER, M. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. **Neurobiology of Disease**, v.17, n.3, p.359-366, Dec. 2004.

BONDE, S.; EKDAHL, C.T.; LINDVALL, O. Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation. **Eur J Neurosci** 23:965-974. 2006.

BORGES, K.; GEARING, M. ; MCDERMOTT, D. L.; SMITH, A. B.; ALMONTE, A. G.; WAINER, B. H.; & DINGLEDINE, R. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. **Exp Neurol** 182, 21-34. 2003.

BRAGIN, D. E.; SANDERSON, J. L.; PETERSON, S.; CONNOR, J. A.; MULLER, W. S. Development of epileptiform excitability in the deep entorhinal cortex after status epilepticus. **Eur J Neurosci** 30, 611-624. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistemas de Informações sobre Mortalidade (SIM) e Nascidos Vivos (Sinasc) para os profissionais do Programa Saúde da Família. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. /Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª ed.** Brasília: Ministério da Saúde. 2005.

BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX, C.S., JR.; ARONOWSKI, J.; GROTTA, J.C. & SAVITZ, S.I. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.30, n.1, p.140-149, Jan. 2010.

BRODAL, A. Anatomia neurológica com correlações clínicas. São Paulo: **Roca**, 1997.

BRUCHEZ, M. P. Turning all the lights on: quantum dots in cellular assays. **Curr Opin Chem Biol**, 9(5):533-7. 2005.

BRUNDULA, V.; REWCASTLE, N.B.; METZ, L.M.; BERNARD, C.C.; YONG, V.W. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. **Brain**, 125:1297–1308. 2002.

BUCKLEY, M.J. The role of the perirhinal cortex and hippocampus in learning, memory, and perception. **Q J Exp Psychol B**. Jul-Oct;58(3-4):246-68. 2005.

BUFFO, A.; ROLANDO, C.; CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochemical Pharmacology**. 79: 77–89. 2010.

BURGUILLOS, M.; DEIERBORG, T.; KAVANAGH, E.; PERSSON, A.; HAJJI, N.; GARCIA-QUINTANILLA, A.; CANO, J.; BRUNDIN, P.; ENGLUND, E.; VENERO, J. L.; JOSEPH, B. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. doi:10.1038/ **Nature**09788. 2011.

CARDOSO, A.; CARVALHO, L. S.; LUKOYANOVA, E. A. & LUKOYANOV, N. V. Effects of repeated electroconvulsive shock seizures and pilocarpine-induced status epilepticus on emotional behavior in the rat. **Epilepsy & behavior** : E&B 14, 293-299. 2009.

CAVALHEIRO, E.A. Epilepsia: uma janela para o cérebro. A mente humana, **Revista Multiciência**,(3) 2004.

CAVANNA, A.E. Epilepsy: The quintessential pathology of consciousness. **Behav Neurol.**, Jan 1; 24(1):3-10. 2011.

CHEN, J.R.; CHENG, G.Y.; SHEU, C.C.; TSENG, G.F.; WANG, T.J. & HUANG, Y.S. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. **Journal of Anatomy**, v.213, n.3, p.249-258, Sep. 2008.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised clinical and electrographic classification of epileptic seizures. **Epilepsia** 22:489–501. 1981.

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

CHEN, M.; ONA, V.O.; Li, M.; FERRANTE, R.J.; FINK, K.B.; ZHU, S.; BIAN, J.; GUO, L.; FARRELL, L.A.; HERSCH, S.M.; Hobbs, W.; Vonsattel, J.P.; CHA, J.H. & FRIEDLANDER, R.M. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease, **Nat. Med.**, 6:797–801. 2000.

CHOI, J.; NORDLI JR, D. R.; ALDEN, T. D.; DIPATRI JR, A.; LAUX, L.; KELLEY, K.; ROSENOW, J.; SCHUELE, S.U.; RAJARAM, V.; KOH, S. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. **Journal of Neuroinflammation** , 6:38. 2009.

CURIA, G.; LONGO, D.; BIAGINI, G.; JONES, R.S.; AVOLI, M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods**. 172(2):143-57. 2008.

DANIELSON, N.B.; GUO, J.N.; BLUMENFELD, H. The default mode network and altered consciousness in epilepsy. **Behav Neurol**. 24(1):55-65. 2011.

DATICHE, F.; ROULLET, F.; CATARELLI, M. Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: an immunohistochemical study in the rat. **Brain Res Bull** 55: 95-99, 2001.

DA SILVA, A.V. & CABRAL, F.R. Ictogênese, Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**; 14(Suppl 2):39-45. 2008.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J.V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D.R.; DUSTIN, M.L. & GAN, W.B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience**, v.8, n.6, p.752-758, Jun. 2005.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A.; DA COSTA REIS, J.; DIAZ PAREDES, B.; MORAES, L.; JASMIN; GIRALDI-GUIMARAES, A. & MENDEZ-OTERO, R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Research**, v.1306, p.149-158, Jan 8. 2010.

DHARMASAROJA, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.16, n.1, p.12-20. 2009.

DICHTER, M.A. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development. **Epilepsia**, 35 (Suppl 4): S51–S57. 1994.

DOMERCQ, M. & MATUTE, C. Neuroprotection by tetracyclines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.25, n.12, p.609-612, Dec. 2004.

DU, Y.; MA, Z.; LIN, S.; DODEL, R.C.; GAO, F.; BALES, K.R.; TRIARHOU, L.C.; CHERNET, E.; PERRY, K.W.; NELSON, D.L.; LUECKE, S.; PHEBUS, L.A.; BYMASTER, F.P. & PAUL, S.M. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 98:14669–14674. 2001.

EKDAHL, C.T.; CLAASEN, J.H.; BONDE, S.; KOKAIA, Z. & LINDVALL, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100:13632-13637. 2003.

ENGLAND, T.; MARTIN, P. & BATH, P.M. Stem cells for enhancing recovery after stroke: a review. **International Journal of Stroke**, v.4, n.2, p.101-110. 2009.

EVANS, J.H. Post-traumatic epilepsy. **Neurology**,12:665-74. 1962.

EVANS, M. S.; ZORUMSKI, C. F.; CLIFFORD, D. B. Lithium enhances neuronal muscarinic excitation by presynaptic facilitation. **Neuroscience** 38, 457-468. 1990.

FAWCETT, J.W. & ASHER, R.A. The Glial Scar and Central Nervous System Repair. **Brain Research Bulletin**, 49: 377-391, 1999.

FERREIRA, I.L.M. & TABOSA E SILVA, T. P. Mortalidade por epilepsia no Brasil, 1980-2003. **Ciência e Saúde Coletiva**, 14 (1):89-94. 2009.

FISHER, R.S.; VAN EMDE, B.W. & BLUME W. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, 46: 470-72. 2005.

FRANCO, ECS. **Resposta Inflamatória e Neuroproteção Após Transplante Endovenoso de Células Tronco da Medula Óssea em Ratos Submetidos à Isquemia Focal do Córtex Motor**. Tese (Doutorado em Biologia Celular). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/ UFPA. 109 f. Abr. 2009.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V. H. What is immune privilege (not)? **Trends Immunol** 28, 12-18. 2007.

GALIC, M.; RIAZI, K.; HEIDA, J.G.; MOUIHATE, A.; FOURNIER, N. M.;SPENCER, S.J.; KALYNCHUK, L.E.; TESKEY, G. C.; PITTMAN. Q.J. Postnatal

nflammation Increases Seizure Susceptibility in Adult Rats. **The Journal of Neuroscience**, 28(27):6904–6913. 2008.

GAO, J.; DENNIS, J.E.; MUZIC, R.F.; LUNDBERG, M.; CAPLAN, A.I. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion, **Cells Tissues Organs** 169: 12–20. 2001.

GIRALDI-GUIMARAES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F.P. & MENDEZ-OTERO, R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain Research**, Feb 9. 2009.

GOMES, M. M. História da Epilepsia: Um Ponto de Vista Epistemológico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiol**, 12(3):161-167. 2006.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; FREIRE, M.A; PICANÇO-DINIZ, C.W.; PERRY, V. H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Experimental Neurology** Volume 190, Issue 2, Pages 456-467. 2004.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D.J.; PICANÇO-DINIZ, C.W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res** 1066:57-70. 2005.

GORDON, S. Macrophage Function Disorders. **Encyclopedia of Life Sciences**:1-11. 2001.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev.** 3:23–35. 2003.

GROTICKE, I.; HOFFMANN, K. & LOSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Experimental neurology**: 207, 329-349. 2007.

GUNSILIUS, E.; GASTL, G. & PETZER, A.L. Hematopoietic stem cells. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v.55, n.4, p.186-194. 2001.

HAMANI, C.; HODAIE, M.; CHIANG, J.; DEL CAMPO, M.; ANDRADE, D.M.; SHERMAN, D. Deep brain stimulation of the anterior nucleus of the thalamus: effects of electrical stimulation on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. **Epilepsy Res**: 78:117–23. 2008.

HAMILTON, S. E.; LOOSE, M. D.; QI, M.; LEVEY, A. I.; HILLE, B. ; MCKNIGHT, G. S.; IDZERDA, R. L.; NATHANSON, N. M. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 94, 13311-13316. 1997.

HAYAKAWA, K.; MISHIMA, K.; NOZAKO, M.; HAZEKAWA, M.; MISHIMA, S.; FUJIOKA, M.; ORITO, K.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. **Stroke**, 39:951-958. 2008.

HEO, K.; CHO, Y. J.; CHO, K. J.; KIM, H. W.; KIM, H. J.; SHIN, H. Y.; LEE, B. I.; & KIM, G. W. Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. **Neurosci Lett**: 398, 195-200. 2006.

HERMANN, G.E.; ROGERS, R.C.; BRESNAHAN, J.C. & BEATTIE, M.S. Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces Cfos and Strongly Potentiates Glutamate-Mediated Cell Death in the Rat Spinal Cord. **Neurobiology of Disease**, **8**:590-599. 2001.

HEWLETT, K.A. & CORBETT, D. Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. **Neuroscience**, v.141, n.1, p.27-33, Aug 11. 2006.

HOSHIDA, T. Surgery for Temporal Lobe Epilepsy: Historical Review and Postoperative Results. **Brain Nerve**. (4):313-320. 2011.

ITO, D.; IMAI, Y.; OHSAWA, K. ; NAKAJIMA, K.; FUKUUCHI, Y.; & KOHSAKA, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res Mol Brain Res** 57, 1-9. 1998.

JAMALI, S.; BARTOLOMEI, F.; ROBAGLIA-SCHLUPP, A.; MASSACRIER, A.; PERAGUT, J.C.; RÉGIS, J.; DUFOUR, H.; RAVID, R.; ROLL, P.; PEREIRA, S.; ROYER, B.; ROECKEL-TREVISIOL, N.; FONTAINE, M.; GUYE, M.; BOUCRAUT, J.; CHAUVEL, P.; CAU, P.; SZEPETOWSKI, P. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. **Brain**. Mar;129(Pt 3):625-41. 2006.

JANUS, C. Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. **Learn Mem.**, May-Jun;11(3):337-46. 2004.

JARRARD, L.E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. **Behav Neural Biol**. Jul;60(1):9-26. 1993.

JUNG, K.; CHU, K.; LEE, S.; KIM, J.; KANG, K.; SONG, E.; KIM, S.; PARK, H.; KIM, M.; LEE, S.; ROH, J. Region-specific plasticity in the epileptic rat brain: A hippocampal and extrahippocampal analysis. **Epilepsia**, 50(3):537–549, 2009.

KAROLY, N.; MIHÁLY, A. & DOBÓ, E. Comparative immunohistochemistry of synaptic markers in the rodent hippocampus in pilocarpine epilepsy. **Acta Histochemica**. 2010.

KETTENMANN, H. Neuroscience: the brain's garbage men. **Nature** 446, 987–989. 2007.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of Neural Science, 4th Edition. **McGraw-Hill Companies**. 2000.

KÁROLY, N. Comparative immunohistochemistry of synaptic markers in the rodent hippocampus in pilocarpine epilepsy. **Acta Histochemica**, doi:10.1016/j.acthis.2010.08.005. 2010.

KHURGEL, M.; RACINE, R.J.; IVY, G.O. Kindling causes changes in the composition of the astrocytic skeleton. **Brain Res.**592: 338-42. 1992.

KIM, H.S. & SUH, Y.H. Minocycline and neurodegenerative diseases. **Behavioural Brain Research**, v.196, n.2, p.168-179, Jan 23. 2009.

KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neuroscience**, v.19, n.8, p.312-318, Aug. 1996.

KWAN, P.; BRODIE, M.J. Early identification of refractory epilepsy. **N Engl J Med**; 342(5):314–319. 2000.

LAMPL, Y.; BOAZ, M.; GILAD, R.; LORBERBOYM, M.; DABBY, R.; RAPOPORT, A.; ANCA-HERSHKOWITZ, M. & SADEH, M. Minocycline treatment in acute

stroke: an open-label, evaluator-blinded study. **Neurology**, v.69, n.14, p.1404-1410, Oct 2. 2007.

LEEB, C.; JURGA, M.; MCGUCKIN, C.; MORIGGL, R. & KENNER, L. Promising New Sources for Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, Nov 29. 2009.

LEROU, P.H. & DALEY, G.Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. **Blood Reviews**, v.19, n.6, p.321-331, Nov. 2005.

LESTING, J.; GEIGER, M.; NARAYANAN, R. T.; PAPE, H. C. & SEIDENBECHER, T. Impaired extinction of fear and maintained amygdala-hippocampal theta synchrony in a mouse model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**: 52, 337-346. 2011.

LINDVALL, O. & KOKAIA, Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. **Nature**, v.441, n.7097, p.1094-1096, Jun 29. 2006.

LIPTON, S.A. & ROSEMBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med**; 330: 613-622. 1994.

LONG, L.; XIAO, B.; FENG, L.; YI, F.; LI, G.; LI, S.; MUTASEM, M.A.; CHEN, S.; BI, F.; LI, Y. Selective loss and axonal sprouting of GABAergic interneurons in the sclerotic hippocampus induced by LiCl-pilocarpine. **Int J Neurosci**. Feb;121(2):69-85. 2011.

LIU, Z.; FAN, Y.; WON, S.J.; NEUMANN, M.; HU, D.; ZHOU, L.; WEINSTEIN, P.R. & LIU, J. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v.38, n.1, p.146-152, Jan. 2007.

LOPES DA SILVA, F.H., ARNOLDS, D.E.A.T. Physiology of the hippocampus and related structures. **Annual Review of Physiology**.40:185-216, 1978.

MACHADO, L.S.; KOZAK, A.; ERGUL, A.; HESS, D.C.; BORLONGAN, C.V. & FAGAN, S.C. Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. **BioMed Central Neuroscience**, v.7, p.56. 2006.

MAGLÓCZKY, Z. Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. **Epilepsy Research**: 89, 52—59. 2010.

MAJUMDAR, S.; FOSTER, G. & SIKDAR, S.K. Induction of pseudo-periodic oscillation in voltage-gated sodium channel properties is dependent on the duration of prolonged depolarization. **Eur J Neurosci**. Jul; 20(1):127-43. 2004.

MARCHI, N., FAN, Q.; GHOSH, C.; FAZIO, V.; BERTOLINI, F. BETTO, G.; BATRA, A.; CARLTON, E.; NAJM, I.; GRANATA, T.; JANIGRO, D. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. **Neurobiol Dis** 33, 171-181. 2009.

MAROSO, M.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T.; LIU, J.; ARONICA, E.; IYER, A. M.; ROSSETTI, C.; MOLTENI, M.; CASALGRANDI, M.; MANFREDI, A. A.; BIANCHI, M. E.; VEZZANI, A. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. **Nature medicine** 16, 413-419. 2010.

MATYSZAK, M.K. Inflammation in the Cns: Balance between Immunological Privilege and Immune Responses. **Progress in Neurobiology**, 56:19-35., 1998.

MCCORMICK, D.A. & CONTRERAS, D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. **Annu Rev Physiol**, 63:815–46. 2001.

MCINTYRE, D.C.; KELLY, M.E. The parahippocampal cortices and kindling. **Ann NY Acad Sci** 911:343–354. 2000.

MCGEER, P.L. & MCGEER, E.G. The alpha-synuclein burden hypothesis of Parkinson disease and its relationship to Alzheimer disease. **Exp Neurol.** ;212(2):235-8. 2008.

MEDVEDEV, A.V.; MURRO, A.M.; MEADOR, K.J. Abnormal interictal gamma activity may manifest a seizure onset zone in temporal lobe epilepsy. **Int J Neural Syst.**, Apr;21(2):103-14. 2011.

MEEREN, H.; VAN LUIJTELAAR, G.; LOPES, D.S. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. **Arch Neurol**, **62**: 371–76. 2005.

MELLO, L. E. A. M.; CAVALHEIRO, E. A.; TAN, A. M.; KUPFER, W. R.; PRETORIUS, J. K.; BABB, T. L. & FINCH, D. M. Circuit Mechanisms of Seizures in the Pilocarpine Model of Chronic Epilepsy: Cell Loss and Mossy Fiber Sprouting. **Epilepsia**, 34(6):985-995. 1993.

MELDRUM, B. S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology** 44, S14-23. 1994.

MIYAZAKI, T.; MIYAMOTO, O.; JANJUA, N.A.; HATA, T.; TAKAHASHI, F.; ITANO, T. Reactive gliosis in areas around third ventricle in association with epileptogenesis in amygdaloid-kindled rat. **Epilepsy Res.** 56 (Pt 1):5-15. 2003.

MOISSE, K., & STRONG, M. J. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. **Biochim Biophys Acta** 1762, 1083-1093. 2006.

NAERT, G.;& RIVEST, S. The role of microglial cell subsets in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer research** 8, 151-155. 2011.

NAYLOR, D.E. Glutamate and GABA in the balance: Convergent pathways sustain seizures during status epilepticus. **Epilepsia**, 51(Suppl. 3): 106–109, 2010.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science** 308:1314–18. 2005.

NISHIO, S.; MORIOKA, T.; HISADA, K.; FUKUI, M. Temporal lobe epilepsy: a clinicopathological study with special reference to temporal neocortical changes. **Neurosurg Rev.** 23(Pt 2):84-9. 2000.

NOTENBOOM, R.G.; HAMPSON, D.R.; JANSEN, G.H.; VAN RIJEN, P.C.; VAN VEELLEN, C.W.; VAN NIEUWENHUIZEN, O.; DE GRAAN, P.N. Up-regulation of hippocampal metabotropic glutamate receptor 5 in temporal lobe epilepsy patients. **Brain** 129 (Part 1):96–107. 2006.

OTMAKHOVA, N.A. & LISMAN, J.E. Contribution of I_h and GABA_B to synaptically induced afterhyperpolarizations in CA1: a brake on the NMDA response. **J. Neurophysiol.**, 92, 2027–2039. 2004.

OWEN, C.A. & CAMPBELL, E.J. Neutrophil Proteinases and Matrix Degradation. The Cell Biology of Pericellular Proteolysis. **Semin Cell Biol**, 6:367-376., 1995.

PARK, S.A.; KIM, T.S.; CHOI, K.S.; PARK, H.J.; HEO, K.; LEE, B.I. Chronic activation of CREB and p90RSK in human epileptic hippocampus. **Exp Mol Med.** 35(Pt 5):365-70. 2003.

PERRY, V.H. and GORDON, S. Macrophages and the Nervous System. **Int Ver Cytol**, 125:203-244, 1991.

PERRY, V.H.; BELL, M.D.; BROWN, H.C. & MATYSZAK, M.K. Inflammation in the Nervous System. **Current Opinion in Neurobiology**, 5:636-641, 1995.

PERRY, V.H; NICOLL, J.A.R & HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology** 6, 193-201. 2010.

POPOVIC, N.; SCHUBART, A.; GOETZ, B.D.; ZHANG, S.C.; LININGTON, C.; DUNCAN, I.D. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. **Ann Neurol**. Feb;51(2):215-23. 2002.

PRICE, J.L. An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibres to the olfactory cortex. **J Comp Neurol** 150: 87-108, 1973.

PROPERZI, F.; ASHER, R. A.; FAWCETT, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. **Biochem Soc Trans** 31, 335-336. 2003.

RAIVICH, G., BOHATSCHKEK, M., KLOSS, C.U., WERNER, A., JONES, L.L. and KREUTZBERG, G.W. Neuroglial Activation Repertoire in the Injured Brain: Graded Response, Molecular Mechanisms and Cues to Physiological Function. **Brain Research Reviews**, 30:77-105., 1999.

RANSOHOFF, R.M. & PERRY, V.H Microglial Physiology: nique Stimuli, Specialized Responses. **Annu. Rev. Immunol**. 27:119–45. 2009.

RANSOM, B.; BEHAR, T.; NEDERGAARD, M. New roles for astrocytes (stars at last). **Trends in Neurosciences** Vol.26 No.10 October 2003.

RAVIZZA, T.; GAGLIARDI, B.; NOE, F.; BOER, K.; ARONICA, E.; VEZZANI, A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis** 29, 142-160. 2008.

REES, M.I. The genetics of epilepsy--the past, the present and future. **Seizure**. Dec;19(10):680-3. Epub 2010 Nov 20. 2010.

RIAZI, K.; GALIC, M. A.; PITTMAN, Q. J. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. **Epilepsy Res** 89, 34-42. 2010.

ROSSI, B.; ANGIARI, S.; ZENARO, E.; SIMONA LUCIANA BUDUI, S.L.; CONSTANTIN, G. Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial Interactions. **Journal of Leukocyte Biology**. Volume 89, April 2011.

RUFO-CAMPOS, M. Mortalidad en las epilepsias. **Rev Neurol**; 30(Supl 1):S110-114. 2000.

SANDER JW. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, 16: 165-170. 2003.

SANDERS, P., & DE KEYSER, J. Janus faces of microglia in multiple sclerosis. **Brain Res Rev**: 54, 274-285. 2007.

SCHARFMAN, H.E. The neurobiology of epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep**, 7:348-354. 2007.

SCHWARCZ, R. Early glial dysfunction in epilepsy. **Epilepsia** 49 Suppl 2, 1-2. 2008.

SCHWARTZ, M. & MOALEM, G. Beneficial Immune Activity after Cns Injury: Prospects for Vaccination. **Journal of Neuroimmunology**, **113**:185-192. 2001.

SCHWARTZ, M.; BUTOVSKY, O.; BRUCK, W. & HANISCH, U.K. Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends in Neuroscience**, v.29, n.2, p.68-74, Feb. 2006.

SCHWARTING, S.; LITWAK, S.; HAO, W.; BAHR, M.; WEISE, J. & NEUMANN, H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. **Stroke**, v.39, n.10, p.2867-2875. 2008.

SCOVILLE, W.B., MILNER, B., Loss of recent memory after bilateral hippocampus lesions. **The Journal of Neurosurgery and Psychiatry**, 20: 11-21, 1958.

SEBE, J.Y.; BARABAN, S.C. The Promise of an Interneuron-Based Cell Therapy for Epilepsy. **Dev Neurobiol**. Jan 1;71(1):107-17. 2011.

SHANG-DER CHEN; ALICE YW CHANG; YAO-CHUNG CHUANG. The potential role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis. **J Bioenerg Biomembr** 42:461–465. 2010.

SHAPIRO LA, WANG L, RIBAK CE. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. **Epilepsia** 49: 33–41. 2008.

SHARIFI, G.; ALAVI, E.; SAMADIAN, M.; FARAMARZI, F.; HADDADIAN, K. Mesial temporal lobe epidermoid tumour compressing the hippocampal formation caused refractory temporal lobe epilepsy. **Brazilian Journal Neurosurgery**. Dec;24(6):692-4. 2010.

SHORVON, S.D. Epidemiology, classification, natural history, and genetics of epilepsy. **Lancet** 336:93-96. 1990.

SHORVON, S.D. The etiologic classification of epilepsy. **Epilepsia**. Mar 30. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011. 2011.

SLOVITER, R. S. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. **C R Biol** 328, 143-153. 2005.

SOMERA-MOLINA, K. C.; ROBIN, B.; SOMERA, C.A.; ANDERSON, C.; STINE, C.; KOH, S.; BEHANNA, H.A.; VAN ELDIK, L.J.; WATTERSON, D.M.; WAINWRIGHT, M.S. Glial Activation Links Early-life Seizures and Long-term Neurologic Dysfunction: Evidence Using a Small Molecule Inhibitor of Proinflammatory Cytokine Upregulation. **Epilepsia**, 48(9):1785–1800, 2007.

SONMEZTURK, H.H.; MORGAN, V.; ABOU-KHALIL, B. Focal seizure propagation illustrated by fMRI. **Epileptic Disord.** Mar;13(1):92-5. 2011.

SPECCHIO, N.; FUSCO, L.; CLAPS, D.; TRIVISANO, M.; LONGO, D.; CILIO, M.R.; VALERIANI, M.; CUSMAI, R.; CAPPELLETTI, S.; GENTILE, S.; FARIELLO, G.; SPECCHIO, L.M.; VIGEVANO, F. Childhood refractory focal epilepsy following acute febrile encephalopathy. **European Journal of Neurology** 2010: 1468-1331.2010.

STANFIELD, B.B. Excessive intra- and supragranular mossy fibers in the dentate gyrus of tottering (tg/tg) mice. **Brain Res**;480: 294-9. 1989.

STIRLING, D.P.; KHODARAHMI, K.; LIU, J.; MCPHAIL, L.T.; MCBRIDE, C.B.; STEEVES, J.D.; RAMER, M.S. & TETZLAFF, W. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**, v.24, n.9, p.2182-2190, Mar 3. 2004.

STOLL, G. & JANDER, S. The Role of Microglia and Macrophages in the Pathophysiology of the Cns. **Progress in Neurobiology**, **58**:233-247. 1999.

STRAUSS, D.J.; DAY, S.M.; SHAVELLE, R.M.; WU, Y.W. Remote symptomatic epilepsy: does seizure severity increase mortality? **Neurology**; 60(3):395-399. 2003.

STREIT, W.J. Microglial Response to Brain Injury: A Brief Synopsis. **Toxicologic Pathology**, 28:28-30., 2000.

STREIT, W. J.; CONDE, J. R.; FENDRICK, S. E.; FLANARY, B. E.; MARIANI, C. L. Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurol Res**: 27, 685-691. 2005.

TAI, Y. F.; PAVESE, N.; GERHARD, A.; TABRIZI, S. J.; BARKER, R. A.; BROOKS, D. J.; PICCINI, P. Imaging microglial activation in Huntington's disease. **Brain Res Bull** 72, 148-151. 2007.

TANAKA, K.; WATASE, K.; MANABE, T.; YAMADA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, K.; IWAMA, H.; NISHIKAWA, T.; ICHIHARA, N.; KIKUCHI, T.; KUYAMA, S.; KAWASHIMA, N.; HORI, S.; TAKIMOTO, M.; WADA, K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science** 276:1699–1702. 1997.

TENG, Y.D.; CHOI, H.; ONARIO, R.C.; ZHU, S.; DESILETS, F.C.; LAN, S.; WOODARD, E.J.; SNYDER, E.Y.; EICHLER, M.E. & FRIEDLANDER, R.M. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.9, p.3071-3076, Mar 2. 2004.

THORED, P.; GOMES-LEAL, W.; HELDMAN, U.; GISLER, R.; DARSALIA, V.; TANEERA, J.; NYGREEN, J.M.; JACOBSEN, S.E.; EKDAHL, C.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke (in press). **Glia**. 2008.

TOLAR, J.; LE BLANC, K.; KEATING, A.; BLAZAR, B.R.. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. **Stem Cells** 28 (8):1446–1455. 2010.

TORRE, E.R.; LOTHMAN, E.; STEWARD, O. Glial response to neuronal activity: GFAP mRNA and protein levels are transiently increased in the hippocampus after seizures. **Brain Res**. 631:256-64. 1993.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BORTOLOTTA, Z.R.; MELLO, L.M.; SCHWARTZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res** 478: 385-390, 1984.

VAN VLIET, E.A.; DA COSTA, A.S.; REDEKER, S.; VAN SCHAIK, R.; ARONICA, E. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. **Brain** 130: 521–534. 2007.

VERKHRATSKY, A.; STEINHAUSER, C. Ion channels in glial cells. **Brain Res Rev** 32:380–412. 2000.

VAZQUEZ, B. & DEVINSKY, O. Epilepsy and Anxiety. **Epilepsy Behav**; 4:S20–5. 2003.

VEZZANI, A. Innate immunity and inflammation in temporal lobe epilepsy: new emphasis on the role of complement activation. **Epilepsy Curr** 8, 75-77. 2008.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. **Nat Rev Neurosci** 6:626– 640. 2005.

WANG, X.; ZHU, S.; DROZDA, M.; ZHANG, W.; STAVROVSKAYA, I.G.; CATTANEO, E. ; FERRANTE, R.J.; KRISTAL, B.S.; FRIEDLANDER, R.M. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 100 :10483–10487. 2003.

WEISS, J.H.; SENSI, S.L.; KOH, J.Y. Zn(2+): A Novel Ionic Mediator of Neural Injury in Brain Disease. **Trends Pharmacol Sci**: 21:395-401. 2000.

WELLS, J.E.; HURLBERT, R.J.; FEHLINGS, M.G.; YONG, V.W. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. **Brain**, 126:1628-1637. 2003.

YANG, F.; LIU, Z.; CHEN, J.; ZHANG, S.; QUAN, Q.; HUANG, Y.; JIANG, W. Roles of Astrocytes and Microglia in Seizure-Induced Aberrant Neurogenesis in the Hippocampus of Adult Rats. **Journal of Neuroscience Research** 88:519–529. 2010.

YILMAZ, G.; ARUMUGAM, T.V.; STOKES, K.Y. & GRANGER, D.N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. **Circulation**, v.113, n.17, p.2105-2112, May 2. 2006.

YONG, V.W.; WELLS, J.; GIULIANI, F.; CASHA, S.; POWER, C.; METZ, L.M. The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurol** 3:744-751. 2004.

YONG, V.W.; WELLS, J. ; GIULIANI, F.; CASHA, S.; POWER, C.; METZ, L.M. The promise of minocycline in neurology, **Lancet Neurol**. 3: 744– 751. 2004.

YRJANHEIKKI, J.; KEINANEN, R.; PELLIKKA, M.; HOKFELT, T. & KOISTINAHO, J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, n.26, p.15769-15774, Dec 22. 1998.

YRJANHEIKKI, J.; TIKKA, T.; KEINANEN, R.; GOLDSTEINS, G.; CHAN, P.H. & KOISTINAHO, J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.23, p.13496-13500, Nov 9. 1999.

ZATTONI M, MURA ML, DEPREZ F, SCHWENDENER RA, ENGELHARDT B, FREI K, FRITSCHY JM. Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**. Mar 16;31(11):4037-50. 2011.

ZHANG, X.; BOULTON, A.A.; YU, P.H. Expression of heat shock protein-70 and limbic seizure-induced neuronal death in the rat brain. **Eur J Neurosci** , Jul;8(7):1432-40. 1996.

ZHU, S.; STAVROVSKAYA, I.G.; DROZDA, M.; KIM, B.Y. ; ONA, V.; LI, M.; SARANG, S.; LIU, A.S. HARTLEY, D.M.; WU DU, C.; GULLANS, S.; FERRANTE, R.J. ; PRZEDBORSKI, S. ; KRISTAL, B.S.; FRIEDLANDER, R.M. Minocycline inhibits cytochrome *c* release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice, **Nature** 417 :74–78. 2002.