

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Biociências

Células granulares do giro denteado recém-geradas em  
ratos epilépticos jovens e idosos apresentam dendritos  
basais.

Renata Della Torre Avanzi

Botucatu  
2009

Renata Della Torre Avanzi

Células granulares do giro denteado recém-geradas em  
ratos epilépticos jovens e idosos apresentam dendritos  
basais.

Trabalho Científico apresentado ao Departamento  
de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP,  
Campus de Botucatu, para a obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas-Modalidade Médica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciene Covolan  
Co-orientadora: Doutoranda Clarissa F. Cavarsan

Botucatu

2009

Células granulares do giro denteado recém-geradas em  
ratos epilépticos jovens e idosos apresentam dendritos  
basais.

Secção do Periódico Experimental Neurology: Doenças Neurológicas.

Autores: Renata Della Torre Avanzi, Clarissa F. Cavarsan e Luciene Covolan\*.

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,  
Brasil

\*Autor para correspondência:

Dra Luciene Covolan  
Departamento de Fisiologia  
Rua Botucatu, n° 862  
CEP: 04023-062  
Tel/Fax: 55 - 11 5579 2033  
Universidade Federal de São Paulo  
São Paulo - SP - Brasil  
Endereço eletrônico: [lcovolan@unifesp.br](mailto:lcovolan@unifesp.br)

Figuras: 4

Páginas: 21

Palavras-chave: Epilepsia de Lobo Temporal, hipocampo, giro denteado, célula granular, dendrito basal e envelhecimento.

**Resumo:** As células granulares do giro denteado do hipocampo são continuamente geradas na zona subgranular em mamíferos. Condições como epilepsia e envelhecimento podem alterar a proliferação celular e também certas características morfológicas das células granulares, como a formação de dendritos basais. Através da imunohistoquímica para *doublecortin*, marcador neuronal de células granulares imaturas, o estudo visa avaliar a proliferação destas células e quantificar o número de dendritos basais em animais epiléticos crônicos usando o modelo de Epilepsia de Lobo Temporal induzido por pilocarpina. Constatamos que a relação de células granulares com dendritos basais permanece constante no decorrer da vida do animal epilético de forma que esta alteração plástica das células granulares não seja fator determinante na patologia.

## Introdução

Um grande número de novas células granulares é gerado continuamente no giro denteado de um mamífero adulto em condições normais. A neurogênese no animal adulto envolve uma série de processos de maturação das células granulares recém-geradas que incluem a proliferação e a diferenciação celular. Apenas uma fração das células granulares recém-geradas sobrevive e integra-se à circuitaria hipocampal existente através do estabelecimento de sinapses maduras entre dendritos e axônios de células maduras (Zhao & Overstreet-Wadiche, 2008).

A neurogênese das células granulares em um cérebro adulto é observada na borda hilar próxima à camada granular do giro denteado, região da camada subgranular (Altman & Das, 1965; Bayer et al., 1982; Spigelman et al., 1998). Alinhadas ao longo de processos emitidos pela glia radial, as células granulares recém-geradas são guiadas em direção à camada molecular. Esse deslocamento celular ocorre posteriormente ao início do crescimento axonal e simultaneamente ao crescimento da arborização dendrítica (Shapiro & Ribak, 2005).

As células recém-geradas no hipocampo de um cérebro epiléptico adulto também estão localizadas próximas à camada subgranular. Contudo, Parent e colaboradores (1997) demonstraram que estas células recém-geradas podem ainda migrar para regiões ectópicas no hilo e na porção interna da camada molecular do giro denteado, constituindo assim as células granulares ectópicas. Adicionado ao aumento da taxa de neurogênese em animais epilépticos, a formação de *clusters* de células granulares é mais numerosa quando comparado com animais controle e estão distribuídos ao longo da camada subgranular e granular interna (Parente et al., 1997).

Em sua morfologia normal, as células granulares apresentam um axônio basal, que se prolonga em direção ao hilo e um tufo de dendritos apicais que se prolongam em direção à camada molecular. Recentemente, não apenas nas células granulares recém-geradas após o *Status epilepticus* (SE), mas em outras, já maduras, foram descritos dendritos basais. Esses dendritos basais originam-se do polo hilar do corpo celular das células granulares e estendem-se para o interior da camada polimórfica do hilo (Spigelman et al., 1998).

A formação dos dendritos basais nas células granulares é considerada transitória em ratos durante o desenvolvimento pós-natal, porém é uma característica normal das células granulares do giro denteado durante o desenvolvimento e em macacos e humanos adultos. Nos modelos experimentais de epilepsia de lobo temporal (ELT) foi observado que não só os dendritos basais persistem ao longo de toda a vida do animal como também estão aumentados em número (Shapiro & Ribak, 2005).

A formação dos dendritos basais nas células granulares ainda é desconhecida quanto a sua funcionalidade, contudo há hipóteses que sugerem que os dendritos basais possam fazer parte de um circuito excitatório recorrente adicional no hipocampo de ratos epiléticos, aumentando a possibilidade de ocorrência das crises espontâneas. Neste caso, seria de se esperar que todas as células granulares geradas após o SE e ao longo de toda a vida epilética do animal apresentassem dendritos basais. No entanto, até o momento, as descrições sobre a presença dos dendritos basais se restringem ao período máximo de 20 semanas após a indução do SE (Dashtipour et al., 2003, Walter et al., 2007).

Dessa forma, objetivo do presente estudo é avaliar a proliferação de células granulares no período crônico do modelo da pilocarpina em animais com diferentes

durações de vida epiléptica. Além disso, também se pretende avaliar a presença ou ausência de dendritos basais nas células granulares recém-geradas.

## **Materiais e Métodos**

### Animais

Ratos machos, adultos Wistar (n=40; 250-280 g) fornecidos pelo CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia) foram mantidos em condições controladas de ciclo escuro/claro de 12h, com ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (1341/06).

Os animais foram submetidos ao modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina. Os ratos experimentais (n=29) foram inicialmente injetados com uma solução de brometo de metil-escopolamina (1mg/kg, i.p.) diluído em salina 0,9% para bloquear os efeitos periféricos da pilocarpina. Cerca de 30 minutos após, receberam a injeção de hidrocloreto de pilocarpina (320 mg/kg, i.p) diluída salina 0,9%. Os animais que entraram em SE, permaneceram nesta condição por pelo menos 90 minutos, tempo suficiente para induzir alterações histopatológicas condizentes com a patologia da ELT (Lemos & Cavalheiro, 1995). Após este período, os animais receberam injeção de tiopental sódico (25 mg/kg, i.p.), com o objetivo de reduzir a mortalidade associada ao modelo.

Além disso, os animais também receberam múltiplas injeções subcutâneas de salina 0,9% e glicose 5% para hidratação. Animais controles, de mesma idade para todos os grupos experimentais receberam apenas salina e foram usados para comparação com os epilépticos.

Após a pilocarpina, 14 ratos desenvolveram e sobreviveram ao SE e são aqui denominados como epiléticos (E), para diferenciá-los dos controles CTR (n=15).

De acordo com o tempo decorrido desde o início do tratamento até o sacrifício, os animais foram separados em dois grupos experimentais: jovens (J) e idosos (I). O grupo jovem epilético (JE) desenvolveu o SE aos 3 meses de idade e foi sacrificado 2 meses após, aos 5 meses de idade. O grupo idoso (IE) foi subdividido em dois: 1) os idosos que desenvolveram o SE aos 3 meses de idade e foram sacrificados entre 15 e 19 meses (grupo IE-1), portanto tiveram um período de vida epilética que variou entre 12 a 16 meses; e 2) animais idosos que foram submetidos ao SE com 20 meses de idade, foram sacrificados aos 22 meses e compõem o grupo IE-2. Dessa forma, o último grupo (IE-2) teve o mesmo tempo de vida epilética que o JE. Os grupos idosos controle receberam salina 0,9% nas mesmas idades que os grupos IE-1 e IE-2 foram submetidos ao SE.

#### Perfusão dos animais

Após anestesia profunda (*overdose*) com solução de tionembutal (50mg/kg, i.p), os animais foram perfundidos por via transcardíaca com um volume de 150 mL de salina 0,9% e, em seguida, com 300 mL de paraformaldeído 4% (PFA) diluído em tampão fosfato a 0,1M. Ao final da perfusão, os encéfalos foram removidos e armazenados em solução de PFA 4% por 2 dias e, a seguir, foram colocados em solução de PFA 4% com 30% de sacarose para crioproteção. Os encéfalos foram então congelados e secções coronais foram obtidas com auxílio de um criostato a espessura de 35 µm.

#### Imunohistoquímica



A *doublecortin* (DCX) é uma proteína associada á microtúbulos e é expressa por neurônios recém-gerados. É considerado um excelente marcador neuronal para elucidar a morfologia de neurônios imaturos de até 3 semanas após serem gerados. Esta proteína delimita o citoplasma das células granulares e tem sido a proteína de escolha para delimitar os processos neuronais e cones de crescimento (Shapiro & Ribak, 2006).

Para a identificação imunohistoquímica de DCX foram selecionados, de cada animal, seis cortes cerebrais coronais contendo o hipocampo, de modo que todos os cortes fossem correspondentes aos níveis hipocampais das pranchas 28, 30, 32, 34, 36 e 38 do atlas “Brain Maps: Structure of the rat brain” (Swanson, 1992).

Todas as reações do protocolo de imunohistoquímica DCX foram executadas simultaneamente para todos os animais. Os cortes selecionados foram lavados em tampão fosfato em salina 0,1M (PBS, pH=7,4) por 30 minutos. Em seguida as secções foram incubadas, sob agitação, em PBS 0,1M com 0,5%, 1,0% e 0,5% de água oxigenada por 30, 60 e 30 minutos respectivamente.

Após este procedimento, os cortes foram lavados em PBS 0,1M por 30 minutos e então incubados sob agitação por 48 horas na temperatura de 4°C em anticorpo primário anti-DCX policlonal (1:500, Cell Signaling Technology®), produzido em coelho, em solução contendo 5% de soro normal bovino e PBS 0,1M.

Finalizada a incubação primária, os cortes foram lavados em PBS 0,1M em 0,05% tween 20 por 15 minutos e posteriormente incubados sob agitação por 60 minutos em anticorpo secundário anti-coelho IgG biotilado (1:200, Vector Labs®) em PBS 0,1M e 5% de soro normal bovino. Após esta etapa, seguiu outra lavagem dos cortes por 15 minutos em PBS 0,1M com 0,05% de tween 20. As secções foram então incubadas no complexo avidina-biotina (ABC, Vectastain Standard ABC Kit,

Vector Laboratories®) por 60 minutos. Após a esta etapa de lavagem dos cortes em PBS 0,1M por 15 minutos, o conjugado antígeno anticorpo foi revelado e visualizado na incubação com diaminobezidina (DAB). Esta reação foi finalizada em uma série de lavagens dos cortes em PBS 0,1M.

Finalmente, os cortes foram montados em lâminas gelatinadas, e após secagem, foram submetidos a uma seqüência de desidratações em álcool 70%, 96% e 100% e em xilol, para então serem cobertos com lamínula.

#### Contagem das células imunorreativas para DCX

As secções hipocampais imuno-marcadas para DCX foram analisadas com microscópio Nikon Eclipse E600FN no aumento de 40X. Imagens foram capturadas usando câmera digital Nikon DXM 1200. As células granulares DCX+ (positivas) foram quantificadas por uma pessoa que desconhecia a identidade dos grupos experimentais. Foram consideradas apenas as células granulares marcadas situadas na camada subgranular e na camada granular do giro denteado.

A medida a área da camada subgranular/granular de cada secção hipocampal dos animais foi obtida através das ferramentas de contorno do programa Image J. Obtivemos, para cada animal, a média das áreas por corte. Dessa forma, foi possível assegurar que dentre os níveis coronais específicos estudados eram homogêneos. Assim, a quantificação das células DCX+ de todos os seis cortes por animal foi somada, obtendo se um valor numérico de células DCX+ que foi dividido pela média da área (mm<sup>2</sup>).

Dentro dos critérios de inclusão para quantificar os dendritos basais DCX-positivos foram considerados os dendritos basais que emergiam da base do corpo celular das células granulares DCX+ e que possuíam curso em direção ao hilo do

giro denteado. Não foram contados os dendritos basais DCX+ que se direcionavam para a camada granular.

### Estatística

O número total de células granulares DCX+/mm<sup>2</sup>, o número de dendritos basais DCX+ e também a relação desses dois dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida por Fisher PLSD, considerando o nível de significância  $p < 0,05$ .

### Resultados

Nossos resultados corroboram dados prévios a respeito da proliferação das células granulares na zona subgranular, na borda entre a camada subgranular e granular de ratos epiléticos (Parent et al., 1997, Covolan et al., 2000, Dashtipour et al., 2003). Além disso, mostram pela primeira vez a taxa de proliferação dessas células em diversos momentos da fase crônica do modelo da pilocarpina. Os resultados aqui apresentados indicam uma tendência ao aumento da taxa de proliferação do giro denteado do animal epilético crônico, porém este não difere dos ratos controles de mesma idade.

Independente da idade analisada, morfológicamente estas células apresentam o corpo celular com formato arredondado, têm localização preferencial na zona subgranular ou no terço mais proximal a ela, dentro da camada granular propriamente dita. Quanto à sua distribuição na camada granular, as células granulares recém-divididas localizam-se preferencialmente próximas à crista do giro denteado.

As células granulares DCX+ podem estar distribuídas isoladamente, mas também é freqüente a presença de *clusters*. Nestas células é possível distinguir claramente pelo menos dois (ou mais) dendritos apicais que emergem do corpo celular e se estendem em direção à camada molecular (Figura 1).

O comprimento desses dendritos apicais não foi mensurado. Em alguns dos grupos estudados (Tabela 1), uma porcentagem das células granulares DCX+ apresenta dendritos basais voltados para o hilo. Ainda quanto à sua morfologia, os dendritos basais, quando presentes, emergem da porção basal do corpo celular, são geralmente únicos e após curta distância, podem ou não se ramificar (Figura 2).

O número de células granulares DCX+/mm<sup>2</sup> de camada granular é muito maior em animais controles jovens que idosos ( $p=0,007$ , Figura 3), indicando que o avanço da idade, considerado isoladamente, é um redutor da capacidade proliferativa de neurônios nessa camada. Ao investigar se, entre jovens de mesma idade, a condição epiléptica é capaz de alterar a taxa de proliferação observamos que não há diferença entre os grupos.

Esse resultado reforça os achados descritos acima, que a idade é um fator redutor sobre a capacidade proliferativa das células granulares do giro denteado.

Na comparação entre animais epilépticos jovens e idosos, com mesma duração de vida epiléptica (2 meses) observamos uma redução de células granulares DCX+ estatisticamente significativa para os idosos ( $p=0,0023$ ). O mesmo ocorre quando os jovens epilépticos são comparados aos idosos epilépticos, cuja duração da vida epiléptica foi maior que 12 meses. Portanto, ao contrário do observado em jovens, a condição epiléptica provoca redução na proliferação das células granulares. Por outro lado, ao isolarmos o fator idade e compararmos os animais quanto à duração da vida epiléptica (grupo IE-1 e IE-2) não encontramos diferenças

estatisticamente significantes. Esse resultado indica que uma vez que o animal é idoso, a maior ou menor duração da vida epiléptica não altera a taxa de proliferação de suas células granulares, sendo esta reduzida quando comparada aos controles de mesma idade. A tabela 2 ilustra os valores obtidos para cada um dos animais de cada grupo.

Similar ao número de células granulares recém-geradas o número de dendritos basais em animais controles também é maior em jovens que idosos ( $p=0,03$ , Tabela 3). No entanto, para o grupo de jovens não foram encontradas diferenças entre controles e epilépticos, embora haja uma tendência a um maior número de dendritos basais entre os epilépticos. Animais idosos controles não apresentam dendritos basais (Figura 4).

Os idosos epilépticos que tiveram a duração da vida epiléptica de apenas 3 meses ou maior que 12 meses não diferem de seus controles de mesma idade, apesar de terem dendritos basais enquanto os idosos controles não terem. O mesmo ocorre na comparação entre os idosos epilépticos entre si. Esse resultado indica que uma vez que o animal é idoso, a duração da vida epiléptica não é um fator capaz de alterar o número de dendritos basais nas células granulares. Ou seja, em geral, a condição epiléptica altera permanentemente o giro denteado, aumentando sua capacidade de gerar novos neurônios e estes, podem ou não ter dendritos basais. Em animais jovens controles, cerca de 37% das células granulares recém-geradas têm dendritos basais. Esse número se altera muito pouco para jovens epilépticos (33%), se reduz em idosos com 2 meses de vida epiléptica (25%) e em idosos com mais de 12 meses de vida epiléptica (20%) e está ausente nos idosos controles (Tabela 1).

## **Discussão**

Os principais achados deste estudo são que no modelo animal de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina dendritos basais estão presentes em células granulares recém-geradas mesmo após longos períodos de tempo após o SE. Os dendritos basais ocorrem em células granulares de todos os animais epiléticos cujo lapso temporal entre o desenvolvimento do SE e a perfusão variou entre 2 a 18 meses. Além disso, outro achado importante foi que os dendritos basais também ocorrem nas células granulares, recém-geradas, 2 meses após a indução do SE em animais com idades acima de 15 meses de vida. Esse estudo representa a primeira demonstração da ocorrência de dendritos basais em animais epiléticos idosos.

Os dendritos basais são fisiologicamente encontrados em 20% das células granulares do giro denteado de humanos (Lauer et al., 2003), mas em roedores, têm sido correlacionados à condições patológicas, como na epilepsia (Rao e Shetty, 2004). Por outro lado, a análise do tecido cerebral de pacientes epiléticos demonstrou que o insulto promove um aumento de cerca de 40% na população de células granulares que contêm dendritos basais (von Campe et al., 1997). Em roedores normais, na faixa etária de 4 meses, o giro denteado contém cerca de 31% dos neurônios recém-gerados com dendritos basais (Rao e Shetty, 2004). Em estudo recente, onde o SE foi induzido por pilocarpina em animais com 12 semanas de vida e perfundidos na vigésima semana, foi observado que 46,2% das células granulares recém-geradas apresentaram com dendritos basais (Walter et al., 2007). No presente estudo, identificamos que 33% das células granulares DCX+, em animais jovens epiléticos, apresentavam dendritos basais.

Com base nos dados de animais controles e epiléticos verificamos que a taxa de proliferação de células granulares está aumentada em animais epiléticos,

provavelmente em decorrência do insulto inicial, porém a relação entre células granulares recém-geradas com dendritos basais em epiléticos versus controles permanece inalterada entre os animais jovens. Isso indica que a presença de dendritos basais é uma característica de células granulares imaturas de roedores. Da mesma forma, isso ocorre entre os animais idosos. Encontramos que, independente da duração de vida epilética ou o momento em que o insulto epileptogênico teve início, os grupos de animais epiléticos não diferem entre si quanto a quantidade de células granulares com dendritos basais. Assim, sugerimos que a diferença entre proliferação celular e células granulares com dendritos basais encontrada em animais jovens e idosos seja principalmente decorrente do envelhecimento do animal. Assim, a proporção de células com dendritos basais permanece constante no decorrer do tempo, pois o menor número de dendritos basais nos idosos ocorre em concomitância com a redução da proliferação celular.

Por outro lado, apesar de serem relatados dendritos basais em células granulares DCX+ de animais jovens, encontramos que os animais controles idosos não apresentam dendritos basais, sugerindo que esta forma de plasticidade das células granulares seja uma característica das células imaturas. Não encontramos diferenças significativas entre animais jovens controles e epiléticos, nem mesmo entre os animais idosos controles e epiléticos. Dessa forma, embora estatisticamente não haja diferença entre idosos controles e epiléticos, ressaltamos que foram encontrados alguns dendritos basais em idosos epiléticos IE-1 e IE-2. Em outras palavras, 19% e 25% (respectivamente para IE-1 e IE-2) das células granulares apresentaram dendritos basais, o que sugere que a condição epilética também contribui para esta plasticidade das células granulares.

Em virtude dessa alteração plástica, acredita-se que os dendritos basais voltados para o hilo podem compor funcionalmente um circuito excitatório recorrente adicional no hipocampo, o que sugere uma manutenção da excitabilidade das células granulares (Shapiro et al., 2007). Shapiro e colaboradores (2006) demonstram por técnicas de microscopia eletrônica que animais controle não apresentavam contatos sinápticos nos seus dendritos basais, enquanto que o inverso foi verificado em animais epiléticos. Assim, como encontramos dendritos basais presentes em animais idosos epiléticos, mesmo que em números baixos, eles provavelmente podem estabelecer contatos sinápticos anormais no hilo, adquirindo funções incomuns no giro denteado. Provavelmente as alterações patológicas da ELT não estejam restritas à presença ou à ausência de dendritos basais nas diferentes idades de vida epilética, mas também à conexão que estes dendritos possam estabelecer com outros processos celulares na circuitaria hipocampal

Estudos realizados em animais jovens, sacrificados nos períodos de 1, ou 2, ou 3, ou 4 ou 5 dias após SE mostraram que os dendritos basais estão presentes nas células granulares recém-geradas no segundo dia pós-SE. No quarto dia pós-SE, esses dendritos basais recebem contatos sinápticos (Shapiro et al., 2007). Uma estimativa do número de sinapses excitatórias e inibitórias sobre os dendritos basais das células granulares recém geradas em animais epiléticos indica 19% do total de sinapses excitatórias e 14% das inibitórias de uma célula granular ocorrem nos dendritos basais (Thind et al., 2008). O significado funcional dessas projeções ainda não é claro. Sinapses excitatórias poderiam ser resultantes de projeções de células musgosas remanescentes no hilo enquanto as inibitórias, das projeções de axônios das próprias células granulares (Thind et al., 2008). As duas possibilidades pesariam a favor da sincronização dos circuitos sinápticos do giro denteado, o que poderia se



relacionar a geração das crises epiléticas espontâneas. Daí a importância da observação dos dendritos basais no hipocampo epilético. No entanto, é interessante notar que, no presente estudo não observamos alteração significativa no número de células granulares recém-geradas que apresentam dendritos basais entre animais crônicos entre dois e 18 meses de vida epilética. Dessa forma, os dendritos basais parecem estar mais relacionados ao fenômeno desencadeador da condição epilética do que com a progressão ou manutenção desta patologia. Possivelmente, frente a outros fatores ou eventos que normalmente desencadeiam o aumento na proliferação celular na camada granular do giro denteado, a porcentagem de células recém-geradas que terão dendritos basais seja mantida constante. No caso acima, a comparação é feita entre animais de idades e durações de vida epilética muito distintas entre si. Mas o mesmo ocorre na comparação entre idosos de mesma idade, com diferente duração de vida epilética.

## **6. Conclusão**

Os resultados deste estudo mostram que existe aumento da proliferação celular no giro denteado e da formação de dendritos basais em animais jovens devido à fatores como a idade e o insulto epilético inicial. Contudo avaliamos que a relação de células granulares com dendritos basais permanece constante no decorrer da vida do animal controle e epilético e que, portanto, a presença ou a ausência de dendritos basais não deve ser o fator determinante para a ocorrência das crises repetitivas e alterações funcionais na circuitaria hipocampal. Por outro lado, essa possibilidade só poderá ser investigada em estudos que impeçam a formação dos dendritos basais em animais epiléticos crônicos.

**Agradecimentos:** Este estudo obteve apoio da FAPESP (Projeto 06/60256-5).

## Referências

1. Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124(3), 319-35.
2. Bayer, S.A., Yackel, J.W., Puri, P.S., 1982. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science.* 216(4548), 890-2.
3. Covolan, L., Ribeiro, L.T., Longo, B.M., Mello, L.E., 2000. Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adults rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus.* 10(2), 169-80.
4. Dashtipour, K., Wong, A.M., Obenaus, A., Spigelman, I., Ribak, C.E., 2003. Temporal profile of hilar basal dendrite formation on dentate granule cells after status epilepticus. *Epilepsy. Res.* 54(2-3), 141-51.
5. Lauer, M., Beckmann, H., Senitz, D., 2003. Increased frequency of dentate granule cells with basal dendrites in the hippocampal formation of schizophrenics. *Psychiatry Res.* 122(2), 89-97.
6. Lemos, T., Cavalheiro, E.A., 1995. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp. Brain. Res.* 102(3), 423-8.
7. Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S., Lowenstein, D.H., 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17(10), 3727–3738.
8. Rao, M.S., Shetty, A.K., 2004. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 19(2), 234-46.
9. Shapiro, L.A., Ribak, C.E., 2005. Integration of newly born dentate granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents. *Brain. Res. Rev.* 48(1), 43-56.
10. Shapiro, L.A., Ribak, C.E., 2006. Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. *Epilepsy Res.* 69(1), 53–66.
11. Shapiro, L.A., Figueroa-Aragon, S., Ribak, C.E., 2007. Newly generated granule cells show rapid neuroplastic changes in the adult rat dentate gyrus during the first five days following pilocarpine-induced seizures. *Eur. J. Neurosci.* 26, 583–592.
12. Spigelman, I., Yan, X.X., Obenaus, A., Lee, E.Y., Wasterlain, C.G., Ribak, C.E., 1998. Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 86(1), 109-20.

13. Thind, K.K., Ribak, C.E., Buckmaster, P.S., 2008. Synaptic Input to Dentate Granule Cell Basal Dendrites in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J. Comp. Neurol.* 509(2), 190-202.
14. von Campe, G., Spencer, D.D., de Lanerolle, N.C., 1997. Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus. *Hippocampus.* 7(5), 472-88.
15. Zhao, C.S., Overstreet-Wadiche, L., 2008. Integration of adult generated neurons during epileptogenesis. *Epilepsia.* 49(Suppl. 5), 3–12.
16. Walter, C., Murphy, B.L., Pun, R.Y.K., Spieles-Engemann, A.L., Danzer, S.C., 2007. Pilocarpine-Induced Seizures Cause Selective Time-Dependent Changes to Adult-Generated Hippocampal Dentate Granule Cells. *J. Neurosci.* 27(28), 7541-52.

## Lista de Figuras

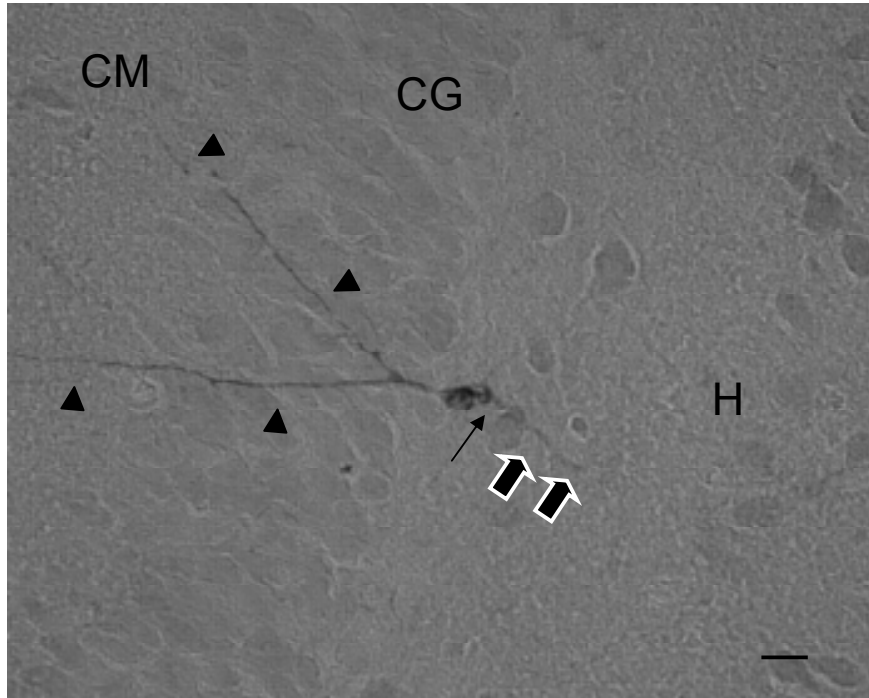


Figura 1: Fotomicrografia de uma célula granular DCX+ (seta fina) do giro dentado de um rato jovem controle. A célula localiza-se na zona subgranular, logo abaixo da camada granular (CG). Emerge desta célula um dendrito apical (ponta da seta), que se ramifica e dois braços podem ser identificados (cabeças de setas), se estendendo para a camada molecular (CM), e um dendrito basal (seta grossa com contorno branco) em direção ao hilo (H). Barra 10  $\mu$ m.

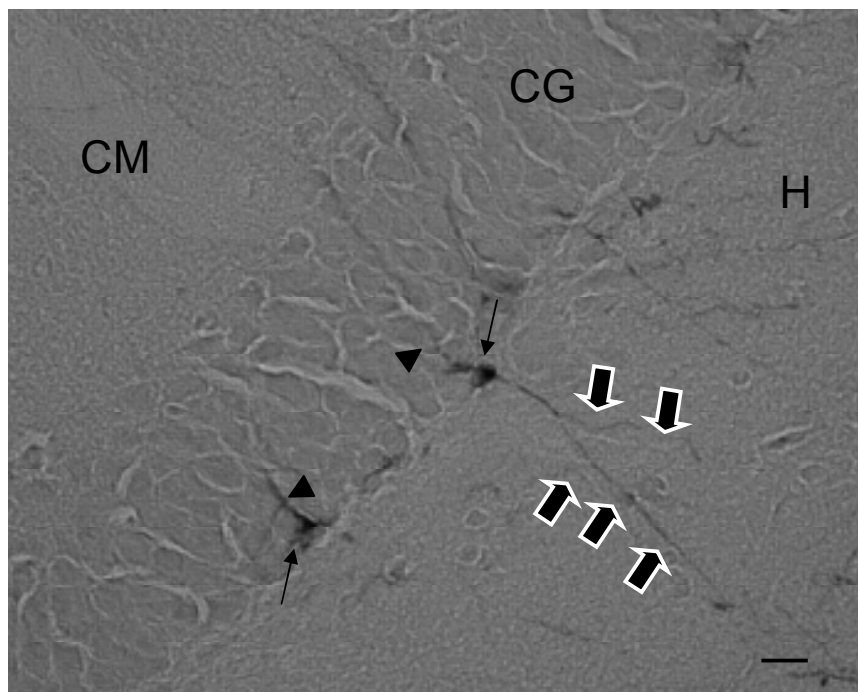


Figura 2: Fotomicrografia de células DCX+ (seta fina) no giro denteado de um rato jovem epiléptico. As células estão localizadas na base da camada granular (CG). Ambas apresentam dendritos apicais únicos (ponta de seta) em direção à camada molecular (CM). Contudo, apenas em uma delas é possível observar um dendrito basal (seta com contorno branco), que se ramifica em direção ao hilo (H). Barra de 10  $\mu\text{m}$ .

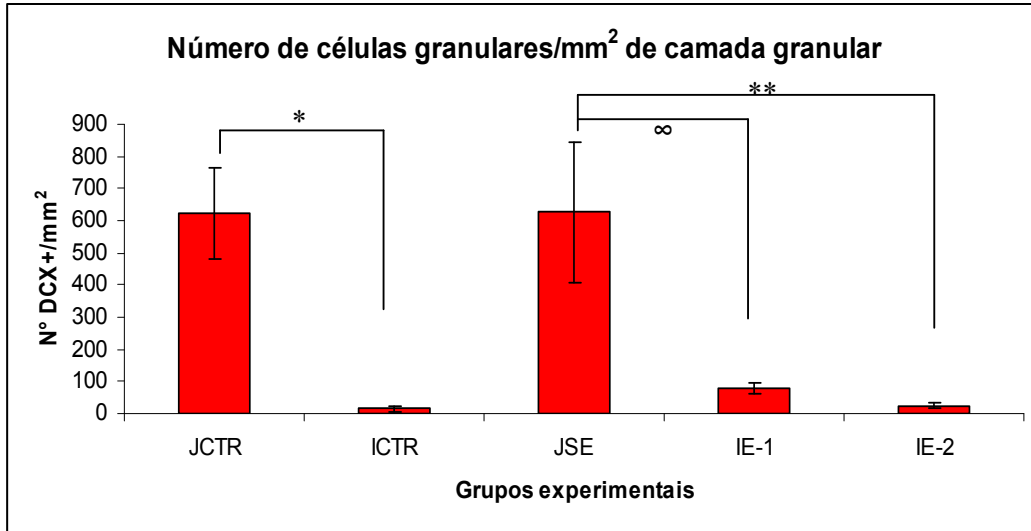


Figura 3: Representação gráfica da distribuição de células granulares DCX+ / mm<sup>2</sup> de camada granular entre os grupos experimentais. Os símbolos indicam os níveis de significância na análise de variância de uma via (ANOVA): \*p=0,021, \*\*p=0,0048, ∞p=0,0037. Legenda: jovem controle (JCTR), idoso controle (ICTR), jovem SE (JSE), idosos SE de 12-16 meses (IE-1) e idoso SE de 2 meses (IE-2).

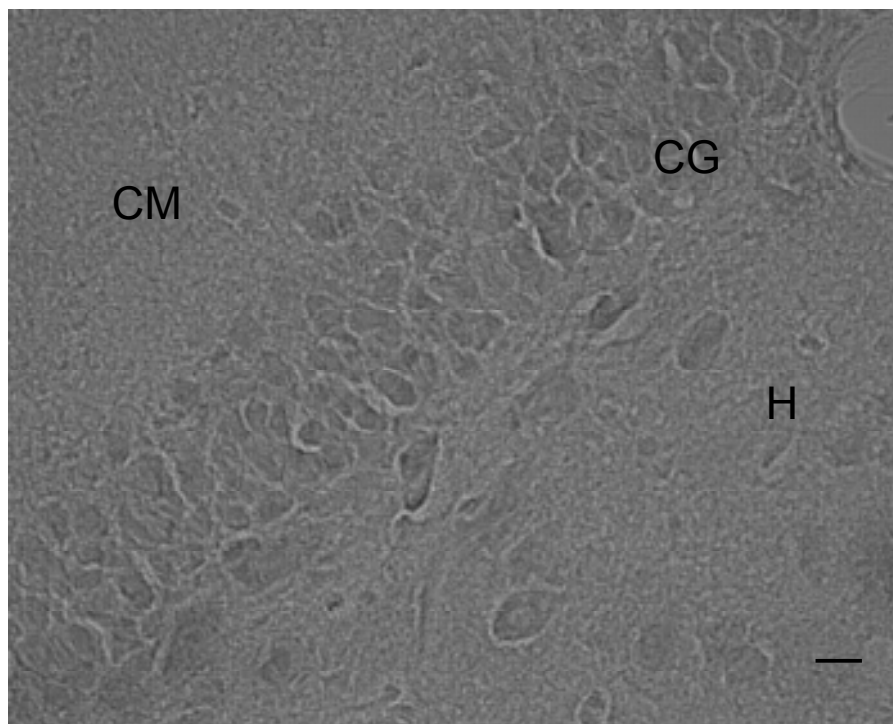


Figura 4: Fotomicrografia do giro denteado DCX de rato idoso controle. O número de células granulares DCX+ é muito baixo neste grupo. Ausência de dendritos basais. Camada molecular (CM), camada granular (CG) e hilo (H). Barra de 10  $\mu$ m.

#### Lista de Tabelas

Tabela 1 – Porcentagem de célula granular DCX+ com dendritos basais por animal:

|            | Jovem  | Idoso 2 meses | Idoso 12-16 meses |
|------------|--------|---------------|-------------------|
| Controle   | 37,3 % | 0 %           | 0 %               |
| Epiléptico | 33,1 % | 25,0 %        | 19,5 %            |

Tabela 2 - Número de células granulares DCX+/ mm<sup>2</sup> de camada granular:

|  | Jovem           |                  | Idoso           |                   |                   |
|--|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
|  | Controle (JCTR) | Epiléptico (JSE) | Controle (ICTR) | Epiléptico (IE-1) | Epiléptico (IE-2) |
|  | 74,07           | 200,00           | 74,07           | 5,56              | 17,46             |
|  | 103,17          | 61,11            | 103,17          | 0,00              | 14,29             |
|  | 100,00          | 16,67            | 100,00          | 4,44              | 3,17              |
|  | 33,33           | 70,37            | 33,33           | 3,70              | 11,11             |
|  | 30,16           | 85,71            | 30,16           | -                 | 9,52              |

Tabela 3 – Níveis de significância de DB (ANOVA uma via) para os grupos:

| Grupos correlacionados | Valor de p (p<0,05 significativo) |
|------------------------|-----------------------------------|
| JCTR x ICTR            | 0,0268                            |
| JCTR x JSE             | 0,5201                            |
| JCTR x IE-2            | 0,0422                            |
| JCTR x IE-1            | 0,0346                            |
| ICTR x JSE             | 0,0065                            |
| ICTR x IE-2            | 0,9333                            |
| ICTR x IE-1            | 0,9030                            |
| JSE x IE-2             | 0,0115                            |
| JSE x IE-1             | 0,0086                            |
| IE-1 x IE-2            | 0,9752                            |

Legenda: jovem controle (JCTR), idoso controle (ICTR), jovem SE (JSE), idosos SE de 12-16 meses (IE-1) e idoso SE de 2 meses (IE-2).