UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR NO MODELO DA PILOCARPINA DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

AUTOR: Isabel Cristina Rockenbach
ORIENTADOR: Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR NO MODELO DA PILOCARPINA DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

AUTOR: Isabel Cristina Rockenbach

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

R682e Rockenbach, Isabel

Expressão da proteína prion celular no modelo da pilocarpina de epilepsia do lobo temporal / Isabel Rockenbach ; orient. Marino Muxfeldt Bianchin. - 2010.

78 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Príons 2. Pilocarpina 3. Epilepsia do lobo temporal 4. Modelos animais 5. Ratos wistar I. Bianchin, Marino Muxfeldt II. Título.

NLM: QU 55

Catalogação Biblioteca FAMED/HCPA

"And so, he preferred the undeniable true, even and above his dearest beliefs. That´s what science is about..." - Carl Sagan, falando sobre a vida e o trabalho de Johannes Keppler

AGRADECIMENTOS

1- Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC = Sistema nervosos central

PrP^c = proteína prion celular

$PrPS^{Sc}$ = proteína prion scrapie

Prnp = gene humano da proteina prion celular

ELT-EH = epilepsia de lobo temporal relacionada a esclerose hipocampal

EMT = epilepsia de lobo temporal relacionada a esclerose hipocampal

MELTP = modelo de epilepsia de lobo temporal por pilocarpina

EE = estado de mal epiléptico

AVC = acidente vascular cerebral

CA1, CA2, e CA3 = *Cornus ammonis* região 1, 2 e 3

IPI = insulto precipitante inicial

PDS = inglês *paroxysmal depolarization shift*

EEG = eletroencefalograma

PET = tomografia por emissão de pósitrons

MRI = Imagens por Ressonância Magnética

GPI = N-glycosilated glycosylphosphatidylinositol

GABA = *Gamma-AminoButyric Acid*

AMPA = *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

NMDA = *N-methyl D-aspartate*

CamKII = *Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*

PKC = *protein kinase C*

PKA = *protein kinase A*

TNF-α = *tumor necrosis factor-alpha*

cAMP = *cyclic adenosine monophosphate*

STI1 = *stress-inducible protein 1*

LTP = Long term potentiation

NCAM = *Neural Cell Adhesion Molecule*

KA = kainato

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras na Tese

Figura 1 - Eventos eletrofisiológicos marcadores de atividade epileptogênica …….16

Figura 2 – Representação esquemática da via tri-sináptica hipocampal ……23

Figuras do Artigo

Figure 1. Cellular prion protein expression in the CA1 ……69

Figure 2. Cellular prion protein expression in the CA2 ……70

Figure 3. Cellular prion protein expression in the CA3 ……71

Figure 4. Cellular prion protein expression in the granular ……72

Figure 5. PrP^c expression in the 2 month chronic group …… 73

ÍNDICE

RESUMO…….....8

ABSTRACT…… 9

1.INTRODUÇÃO.....10

2 EPILEPSIA.....14

2.1 Considerações Gerais.....14

2.2 Fisiopatologia das Epilepsias.....15

2.3 Epilepsia do Lobo Temporal com Esclerose Mesial Temporal (EMT).....19

2.4 Anatomia e Histologia Normal do Hipocampo.....21

2.5 Modificações Estruturais e Funcionais na EMT.....24

2.6 Mecanismos Neurofisiológicos Envolvidos na Epileptogênese na EMT.....26

2.7 Modelos Animais de Epilepsia.....27

2.8 Modelo Animal de Epilepsia Criado pela Indução de *Status Epilepticus* com Pilocarpina.....29

3 PROTEÍNA PRÍON CELULAR.....30

3.1 Proteína Príon Celular e Doenças.....32

4 PROTEÍNA PRÍON CELULAR E SUAS FUNÇÕES FISIOLÓGICAS.....33

4.1 Processos Celulares Influenciados pela Expressão de PrP^c.....34

4.1.1 Função antiapoptótica.....34

4.1.2 Proteção contra estresse oxidativo.....35

4.1.3 PrP^c e sinapses.....36

4.1.4 Neuritogênese.....37

4.1.5 Manutenção da substância branca.....37

5. PROTEÍNA PRÍON CELULAR E EPILEPSIA ……38

6 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO.....39

REFERÊNCIAS.....40

Artigo na formatação da revista.....43

CONCLUSÕES.....74

RESUMO

Ratos que não expressam a proteína prion celular (PrP^c) são mais sensíveis a crises epilépticas induzidas por diferentes protocolos. O hipocampo desses animais apresenta um brotamento supragranular de fibras musgosas semelhante ao observado em pacientes com epilepsia de lobo temporal relacionada a esclerose hipocampal (ELT-EH). Esses achados sugerem que a PrP^c pode estar envolvida na epileptogênese da ELT-EH. Nós estudamos nessa tese a localização imunoistoquímica da PrP^c no hipocampo de animais submetidos ao modelo de epilepsia de lobo temporal por pilocarpina (MELTP)em diferentes tempos de status epilepticus em ratos. Nesse trabalho induzimos estado de mal epileptico (EE) com o uso de pilocarpina em três diferentes grupos de ratos Wistar adultos. Os animais foram sacrificados 18 horas, 5 dias e 2 meses após a indução do EE. Os resultados foram comparados com cérebros controles de ratos que receberam injeções de solução salina. As lâminas foram processadas para coloração por hematoxilina-eosina, imunohistoquímica e neo-Timm. Observamos um aumento da expressão de PrP^c nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo 18 horas depois da injeção de pilocarpina. Essa expressão aumentada persistiu na região CA1 no quinto dia após a injeção. Não observamos diferenças significativas na expressão de PrP^c durante a fase aguda do MELTP nas regiões CA2 e granular do hipocampo. No grupo crônico (2 meses) a PrP^c foi observada na mesma localização em que se observou brotamento de fibras musgosas. Concluímos com esse trabalho que a expressão da PrP^c é diferente nas diversas fases do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. A expressão transitória da proteína prion durante a fase aguda do modelo pode refletir mudanças de expressão visando tornar as células mais resistentes ao dano induzido pelas crises convulsivas. Alternativamente, essa expressão aumentada pode estar relacionadas à apotose ou então às fases iniciais da neuroplasticidade. A expressão de PrP^c na mesma região dos brotamentos de fibras musgosas na fase crônica pode estar relacionada à neuroplasticidade, epileptogênese, neurotransmissão ou, ainda, estar implicada na proteção celular contra crises convulsivas recorrentes. Devido aos diversos achados relacionados a PrP^c, sugerimos que o modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina possa ser um interessante modelo para o estudo do papel fisiológico da PrP^c.

Palavras-chave: prion, epilepsia, esclerose hipocampal, neuroplasticidade

ABSTRACT

Mice lacking cellular prion protein (PrP^c) are more sensitive to seizures induced by four different pharmacological protocols. The hippocampal formation of these animals exhibits supragranular mossy fiber sprouting which resembles that observed in patients with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS). These findings suggest that the PrP^c may be involved in epileptogenesis in MTLE-HS. Here we investigated the immunohistochemical localization of the PrP^c in the hippocampus of animals submitted to the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (PMTLE). Status epilepticus (SE) was induced with pilocarpine in three different groups of adult Wistar rats. The animals were sacrificed 18 hours, 5 days, and 2 months after SE induction and the results were compared to the respective saline-injected control animals. Slices were processed for hematoxylin-eosin, PrP^c immunohistochemistry and neo-Timm .PrP^c was increased in the CA1 and in CA3 regions of the hippocampus 18 hours after pilocarpine injection. PrP^c continued to be increased in the CA1 region of the hippocampus five days after pilocarpine injection. In the CA2 and granular regions of the hippocampus we did not observe significant differences in PrP^c expression during the acute phase of PMTLE. In the chronic group, PrP^c was expressed co-localized with mossy fiber sprouting. Cellular prion protein is differentially expressed at different phases of the pilocarpine model of epilepsy. Transient expression of PrP^c during the acute phase of the pilocarpine model may reflect changes which may render cells more resistant to seizure-induced damage and may be related to apoptosis or may to the initial phases of neuroplasticity. During the chronic period, PrP^c is co-expressed in the same regions of mossy fiber sprouting. In chronic animals, PrP^c might be related to neuroplasticity, epileptogenic processes, neurotransmission, or alternatively may be implicated in cellular protection against recurrent seizures.

Key-words: prion, epilepsy, neuroplasticity

1. INTRODUÇÃO

Epilepsia é a denominação dada para o grupo de doenças que têm em comum crises epilépticas que recorrem na ausência de condições tóxicas, metabólicas ou febris. As crises epilépticas são eventos paroxísticos, recorrentes e estereotipados, resultantes de atividade neuronal excessiva ou síncrona no cérebro. São caracterizadas por uma miríade de fenômenos clínicos, entre eles, alteração do nível de consciência, movimentos involuntários anormais, alterações autonômicas e distúrbios transitórios do comportamento. Os sintomas clínicos de uma crise epiléptica são úteis na classificação da síndrome e refletem disfunções temporárias de conjuntos de neurônios de uma parte do cérebro (crises focais) ou então de áreas cerebrais mais extensas envolvendo sincronicamente os dois hemisférios cerebrais (crises generalizadas).[1, 2, 3] As epilepsias são patologias crônicas cuja prevalência encontra-se entre 5-10 casos por 1000 habitantes nos países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, essa prevalência é ainda maior. As epilepsias são a segunda causa mais comum de incapacidade mental, especialmente entre adultos jovens.[1]

O tipo mais comum de epilepsia focal no adulto é a epilepsia originada na região mesial do lobo temporal, conhecida como epilepsia mesial temporal associada a esclerose hipocampal. Essa síndrome parece ser associada em muitos pacientes a um dano inicial do sistema nervoso central, denominado insulto precipitante inicial (IPI). Vários eventos com potencial lesivo ao sistema nervoso central podem causar lesão nas estruturas mesiais do lobo temporal, sendo o hipocampo a estrutura mais particularmente vulnerável. Entre os eventos classificados como IPI estão:

a) hipóxia neonatal, traumatismos cerebrais na infância;

b) meningites;

c) infecções virais;

d) episódios febris prolongados e outros.

Diversos tipos de infecções bem como episódios febris de causas nem sempre elucidadas têm sido particularmente associados a essa síndrome.[1, 2]

Após o dano inicial, o assim denominado IPI, ocorre uma reorganização neural característica que parece formar o substrato neural associado com as crises epilépticas. Mecanismos adaptativos envolvendo neuroplasticidade são necessários para a reparação cerebral pós-injúria. Estes mesmos mecanismos de reparação podem estar em certa medida associados à epileptogênese. Um dos maiores desafios em epilepsia do lobo mesial temporal atualmente é o entendimento dos processos envolvidos na epileptogênese e nas modificações estruturais e funcionais do hipocampo que ocorrem na EMT.[1, 2]

A proteína príon celular (PrP^c) foi identificada inicialmente por seu envolvimento nas encefalopatias espongiformes, patologias neurodegenerativas que afetam homens e animais.[4, 5, 6] Nestas doenças, acredita-se que o mecanismo de gênese da patologia seja um ganho de função tóxica da PrP^c.[6] Por outro lado, a perda de uma eventual função fisiológica da proteína príon celular também poderia explicar os eventos envolvidos na neurodegeneração nas encefalopatias espongiformes.[4, 5, 6, 7, 8, 9] Estas hipóteses tão diversas são possíveis na medida que a função fisiológica da proteína príon celular ainda é um *hot spot* em pesquisa. Embora nos últimos anos uma série de funções relevantes da proteína príon celular vêm sendo descritas, ainda não temos conhecimento de todos os processos em que

a proteína príon celular pode estar envolvida. De especial interesse e de encontro com o objetivo de elucidar os processos envolvidos na epileptogênese na EMT, estão os dados que apontam para o envolvimento da proteína príon celular na plasticidade neuronal e na homeostase celular.[8, 10, 11, 12, 13, 14] Estes processos estão profundamente envolvidos nos eventos relacionados à epileptogênese na EMT. O hipocampo é uma estrutura particularmente sensível da região mesial do lobo temporal. Devido a particularidades de sua organização celular, o hipocampo apresenta uma tendência a gerar surtos de intensa atividade elétrica (despolarização) sincrônica. Na EMT, mecanismos de controle do estresse oxidativo e de reorganização neuronal pós-insulto (sprouting) levam às modificações bioquímicas e estruturais associadas ao início da geração espontânea de atividade elétrica sincrônica e epileptogênica.[15, 16, 17, 18, 19, 20]

Estudo realizado por Brown *et al* demonstrou que células nervosas que não expressam a proteína príon celular são mais sensíveis ao *stress* oxidativo *in vitro*[21]. Além disso, linhagens celulares que não expressam PrP^c são mais suscetíveis a morte celular programada, enquanto aquelas que superexpressam PrP^c, apresentam proteção extra contra a apoptose, mesmo quando em contato com uma proteína pró-apoptótica[22]. Existem fortes evidências de que a proteína príon celular através de sua interação com a laminina e a vitronectina esteja envolvida nos processos de adesão celular e neuritogênese.[10, 13, 14]

Sendo através da perda de função, levando a modificações na fisiologia intrínseca dos neurônios, ou através da hiperatividade de mecanismos de reparação levando a reorganização neuronal aberrante, somam-se evidências de que a proteína príon celular possa estar ligada aos processos envolvidos na epileptogêse na EMT.

O modelo animal de epilepsia crônica induzido através da infusão de pilocarpina é uma ferramenta extremamente útil na investigação da epilepsia do lobo mesial temporal.[23, 24] De fato, muitas das informações de que dispomos hoje são fruto de investigações realizadas empregando este e outros modelos animais. Utilizando o modelo do *status epilepticus* com pilocarpina é possível criar verdadeiramente um animal epiléptico. Além disso, as alterações morfológicas do hipocampo decorrentes da indução do *status epilepticus* com pilocarpina são semelhantes às encontradas na esclerose mesial temporal em humanos, embora a lesão no modelo animal tenda a ser mais severa.[23]

No intuito de investigar o possível envolvimento da PrP^c nos mecanismos envolvidos na epileptogênse na EMT, avaliamos a evolução da expressão da proteina prion cellular no hipocampo em diferentes momentos da indução de epilepsia através do modelo de *status epilepticus* com pilocarpina em ratos. Também comparamos a expressão de PrP^c com TIMM *staining* das mesmas regiões em tempos semelhantes no intuito de identificar a existência ou não de sobreposição entre a expressão do PrP^c e o *sprouting* hipocampal. Também foi comparada a expressão de PrPc com lâminas coradas em Fluoro-Jade, a fim de verificar se os momentos em que há maior morte celular coincidem ou não com a maior expressão do PrP^c.

2 EPILEPSIA

2.1 Considerações Gerais

A epilepsia é caracterizada por episódios paroxísticos, espontâneos e recorrentes de disfunção cerebral que se expressam através de um grande número de fenômenos clínicos, entre eles: nível de consciência alterado, movimentos involuntários, fenômenos sensoriais anormais, alterações autonômicas e distúrbios transitórios do comportamento.[1] A definição de epilepsia envolve uma grande variedade de sinais e sintomas resultantes de diferentes tipos de processos patológicos encefálicos, ao invés de restringir-se a uma doença ou síndrome específica. Durante as crises epilépticas, há um número excessivo de descargas elétricas produzidas pelos neurônios cerebrais. As manifestações clínicas das epilepsias dependem portanto, da origem, localização, e propagação dessas descargas.[1, 2]

Se em países desenvolvidos a epilepsia é uma patologia freqüente porque afeta cerca de 1% da população, em países em desenvolvimento o problema é ainda maior. Na realidade, estima-se que até 3/4 de todos os pacientes epiléticos vivam em países em desenvolvimento. Em geral, epilepsia é a segunda causa mais comum de problemas mentais, particularmente quando consideramos adultos jovens. Além disso, ela causa prejuízos sócio-econômicos pelo menos similares aos provocados pelo câncer de mama em mulheres e pelo câncer de pulmão em homens.[1, 2]

2.2 Fisiopatologia das Epilepsias

As epilepsias são síndromes com aspectos bastante heterogêneos, mas que têm em comum a ocorrência de crises convulsivas recorrentes. As crises epilépticas são geradas por descargas neuronais paroxísticas anormais em processos que afetam a excitabilidade cortical. As crises generalizadas envolvem a totalidade do córtex de ambos hemisférios cerebrais, enquanto as crises parciais envolvem somente uma área circunscrita do córtex. Em ambos os casos, neurônios de uma área afetada disparam sincronicamente, e o córtex cerebral, provavelmente devido aos seus extensos e complexos circuitos e interconexões, normalmente envolve-se no processo.[2, 19]

As alterações comportamentais de uma crise epiléptica dependem dos tipos de neurônios que estão envolvidos na geração das mesmas. Nas crises generalizadas, virtualmente todos os neurônios corticais participam do evento. Dessa forma, o comportamento do indivíduo é totalmente modificado e consciência é perdida. As crises parciais por sua vez, geralmente originam-se em uma área sensorial, e podem ocorrer sensações sinalizadoras que são denominadas de aura epiléptica. Estas crises muitas vezes envolvem o córtex do lobo temporal, incluindo hipocampo e amígdala, prejudicando a memória e a consciência do paciente.[2]

Nas últimas décadas, os estudos eletrofisiológicos em epilepsia têm se concentrado em elucidar os mecanismos subjacentes ao PDS (do inglês *paroxysmal depolarization shift*), o correlato intracelular da espícula interictal observada no EEG de pacientes epilépticos. As espículas interictais são eventos eletroencefalográficos agudizados, paroxísticos, de curta duração (<200 ms), identificados no EEG de superfície de pacientes portadores de epilepsia. Essas espículas são marcadores do

fenômeno epiléptico e, embora sejam raramente sintomáticas, geralmente estão localizadas na região do encéfalo onde as crises se originam. Espículas na superfície do escalpo se correlacionam bem com PDS cerebral intracelular.[2, 19]

O PDS consiste em uma grande despolarização da membrana do neurônio, associada a um surto de potenciais de ação. Na maioria dos neurônios corticais, o PDS é gerado por potentes correntes sinápticas excitatórias, que podem ser ampliadas pela ativação de correntes de membrana reguladas por voltagem. Embora os mecanismos de geração do PDS sejam conhecidos com um certo grau de detalhes, permanece ainda incerto se as espículas interictais dão origem ao evento ictal, se elas inibem as crises, ou ainda se seriam apenas um epifenômeno relacionado à ocorrência de crises. No entanto, em qualquer desses cenários, as descargas podem ser consideradas marcadores eletrofisiológicos de epilepsia.[19]

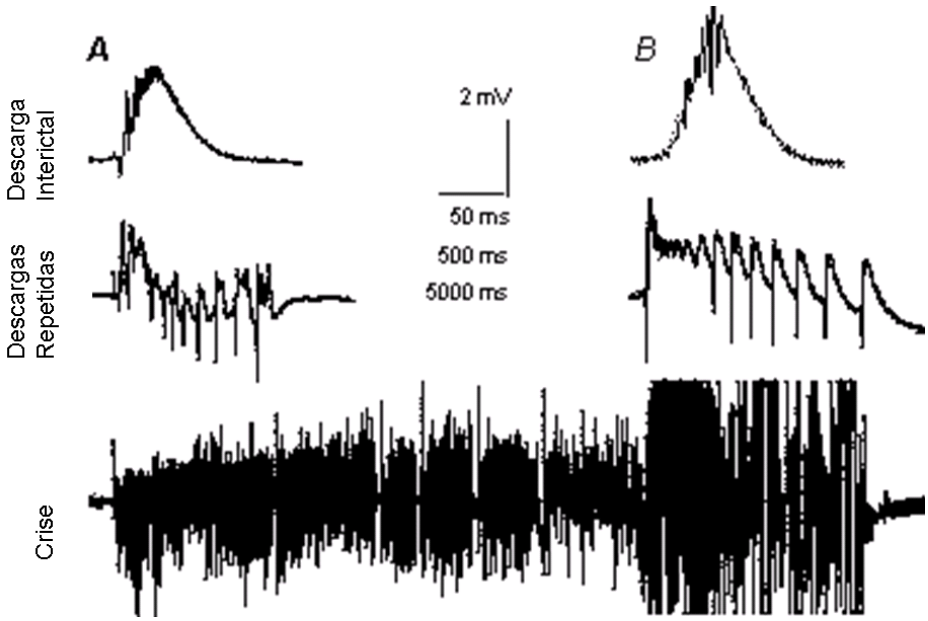

Figura 1 - Eventos eletrofisiológicos (PDS) marcadores de atividade epileptogênica

Os estudos experimentais em crises parciais têm tentado elucidar como um único neurônio ou um grupo de neurônios leva a geração de uma crise epiléptica. Ou seja, como a atividade elétrica tipo PDS se propaga através dos neurônios. Apesar da maioria dos neurônios não exibir atividade tipo PDS, alguns o fazem em condições normais, como os neurônios piramidais hipocampais da região CA3 do hipocampo. Contanto que a atividade elétrica anormal fique restrita a cerca de mil neurônios, as células que constituem o foco da crise, não existe manifestação clínica. A atividade sincronizada deste agrupamento neuronal pode às vezes ser detectada no registro eletroencefalográfico de superfície, como uma espícula interictal. O fenômeno que mantém esta atividade elétrica anormal restrita ao foco da crise é a pós-hiperpolarização. A pós-hiperpolarização é dependente de interneurônios GABAérgicos inibitórios que formam um “arredor inibitório” ao foco epiléptico. Durante o desenvolvimento de uma crise focal, a inibição circundante é superada, a pós-hiperpolarização desaparece gradualmente e a crise começa a se espalhar para além do foco original. Outros fatores que podem contribuir para a perda da inibição circundante incluem mudanças crônicas na estrutura dendrítica, mudança na densidade de receptores, ou mudança em canais ou íons extracelulares.[19]

Vários modelos animais de epilepsia têm sido desenvolvidos nos últimos anos para o estudo dos fenômenos epilépticos. Esses modelos têm permitido a proposição de vários mecanismos envolvidos em epileptogênese adquirida e hereditária. Alguns desses fenômenos foram propostos há mais de 3 décadas, enquanto outros têm sido desenvolvidos recentemente, sendo oriundos da enorme evolução da genética e da biologia molecular.[19, 20, 25, 26]

Com relação aos mecanismos envolvidos na epilepsia, alguns deles estão relacionados à **estimulação e plasticidade de receptores**:

a) ativação de receptores tipo NMDA;
b) influxo de cálcio no meio intracelular;
c) aumento da transmissão sináptica dos receptores tipo AMPA e NMDA, mediada por cálcio;
d) diminuição aguda da transmissão sináptica inibitória da via GABAérgica, também induzida por cálcio;
e) alterações em outros sistemas regulatórios (via canais de sódio, potássio ou cálcio).[2]

Outros mecanismos envolvem **vias de sinalização do meio intracelular tais como**:

a) a liberação de cálcio de acúmulos intracelulares;
b) a ativação de kinases cálcio/calmodulina dependentes;
c) ativação de proteína kinase C (PKC);
d) ativação de tirosina kinase;
e) aumento da expressão gênica;
f) alterações pós-translacionais dos receptores tipo NMDA, AMPA e GABA;

Além dos mecanismos propostos acima, outros envolvem alterações anatômicas, tais como:

a) defeitos da formação do encéfalo, levando a posicionamento anormal de neurônios;

b) conexões sinápticas aberrantes, estas influenciadas talvez pelo tipo de dano inicial e potencialmente bastante modificadas por fatores imunológicos/inflamatórios;
c) aumento de conexões sinápticas excitatórias, com aumento de certos tipos de espinhas dendríticas;
d) diminuição da complexidade dendrítica;
e) gliose, com alteração da função glial, resultando em recaptação inadequada de K^+ e por último, recaptação inadequada de aminoácidos excitatórios.[2]

2.3 Epilepsia do Lobo Temporal com Esclerose Mesial Temporal (EMT)

As epilepsias do lobo temporal são aquelas cuja zona epileptogênica está localizada em estruturas corticais (neocórtex temporal) ou subcorticais (arquicórtex da formação hipocampal, giro para hipocampal e amígdala) do lobo temporal.[27]

A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de epilepsia focal do adulto e também e a que com mais freqüência apresenta casos de resistência à farmacoterapia. Durante a investigação clínica de pacientes com epilepsia do lobo temporal, chama a atenção o fato de muitos deles apresentarem uma história bem definida de injúria precipitante inicial (comumente referida em textos médicos sobre epilepsia, como IPI). Esse evento pode ser hipoxemia perinatal, crise febril prolongada, traumatismo crânio encefálico, diversas infecções do sistema nervos central, ou outros tipos mais raros de lesões cerebrais. O IPI pode ser identificado pela história clínica em pelo menos 60-80% dos pacientes investigados. Existe forte

evidência na literatura de que após um evento desse tipo, os pacientes desenvolvem uma lesão temporal mesial com posterior reorganização neural que leva a um estado de crises recorrentes. Dito de forma mais direta, esses indivíduos desenvolvem epilepsia, a qual muitas vezes é resistente ao tratamento farmacológico.[2, 27]

A maioria dos pacientes que apresentam IPI identificável na infância passam por um período dito latente, após o qual crises recorrentes se manifestam. Casos em que não se tenha documentado o IPI podem, provavelmente estar relacionados a uma inadequada disponibilidade dessa informação, ou então estarem relacionados à ocorrência de formas mais sutis de IPI de difícil identificação. Ainda, é possível que alguns pacientes não apresentem realmente IPIs identificáveis. Durante o período latente, são fortes as evidências de que ocorra um complexo processo de epileptogênese, desencadeado a partir do IPI, necessário para o aparecimento das crises recorrentes.[1, 27]

Sinais objetivos das crises do lobo temporal geralmente ocorrem durante a fase em que há comprometimento da consciência, momentos em que os pacientes geralmente não estão cientes deles. As manifestações mais comuns são alterações abruptas do comportamento, olhar arregalado, dilatação pupilar (ausência temporal) e, quando a crise progride, o paciente inicia com atividade motora coordenada semi-propositada, estas usualmente referidas como automatismos. Os automatismos podem ser orais, tipo atividade de mastigar, assobiar, beijar, deglutir, lamber e outras do gênero. Reações comportamentais ao ambiente podem ocorrer. Outros automatismos menos comuns envolvem vocalização, o ato de cuspir ou de pedalar. Alguns tipos de alterações são mais comumente observados com comprometimento do lobo temporal dominante, enquanto outros são mais observados em associação com comprometimento do lobo temporal não dominante.[1, 27]

Após as crises, os pacientes tipicamente apresentam variados graus de confusão mental ou distúrbios de linguagem. O lobo temporal afetado (se esquerdo, direito, bilateral ou atividade mais difusa) é determinante nessa sintomatologia. Se a crise for generalizada, os pacientes apresentam-se sonolentos, com secreção e dificuldades respiratórias. Vômitos podem ocorrer. Quando a crise é mais localizada, a sonolência é menor e muitas vezes os pacientes estão pelo menos parcialmente conscientes. Nesses casos, déficits focais são mais facilmente observados. Quando a crise envolve o hemisfério dominante, os pacientes apresentam diversos graus de afasia no período pós-ictal. Quando as crises ocorrem no lobo temporal não dominante e a ele são restritas, os pacientes podem manter as funções de linguagem, podendo inclusive apresentar uma considerável manutenção dos níveis de consciência. Ainda, alguns pacientes podem apresentar apenas disfunção de memória durante o período da crise ou durante o período pós-ictal imediato, mantendo a consciência e a linguagem notavelmente preservadas.[1, 27]

Os exames de imagem do sistema nervoso central nos auxiliam a diagnosticar alterações metabólicas e anatômicas nas estruturas do lobo mesial temporal. O advento da ressonância magnética foi determinante para a avaliação dos pacientes com EMT. Os achados característicos são diagnósticos em até 90% dos pacientes. As principais alterações detectadas são as reduções volumétricas e o aumento de sinal (hiperintensidade) observado nas estruturas mesiais do lobo temporal. Especialmente evidentes no hipocampo, estas alterações podem estender-se a estruturas adjacentes, entre as quais o giro para- hipocampal, o córtex entorrinal, a amígdala e pólo do lobo temporal. Na tomografia por emissão de pósitrons (PET) é possível detectar alterações funcionais não só nas estruturas mesiais temporais, mas também de atividade cerebral como um todo, incluindo a

diminuição de fluxo sanguíneo cerebral e do metabolismo da glicose durante o período interictal e o aumento dramático que ocorre no período ictal. Confirmando os achados dos exames de imagem e funcionais, os hipocampos ressecados de pacientes com epilepsia do lobo temporal refratária ao tratamento medicamentoso demonstram alterações degenerativas, chamadas genericamente de esclerose hipocampal, que incluem gliose, modificações estruturais e perda neuronal. Associado as alterações degenerativas, o hipocampo epileptogênico demonstra reorganização neuronal, evidenciado pelo fenômeno de *sprouting* ou "brotamento" axonal e sinaptogênese anormal ou aberrante.[1, 26, 27]

2.4 Anatomia e Histologia Normal do Hipocampo

A formação hipocampal compreende quatro regiões corticais relativamente simples: o giro denteado, o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e o córtex entorrinal. Esta estrutura cortical é composta de uma camada principal – a camada de células granulares e piramidais – e camadas moleculares compostas por dendritos basais e apicais dos neurônios principais – o *stratum oriens* e *stratum radiatum* respectivamente. Os neurônios principais são excitatórios, utilizando glutamato como neurotransmissor.[27, 28]

A circuitaria hipocampal está organizada ao redor da chamada via tri-sináptica excitatória hipocampal:

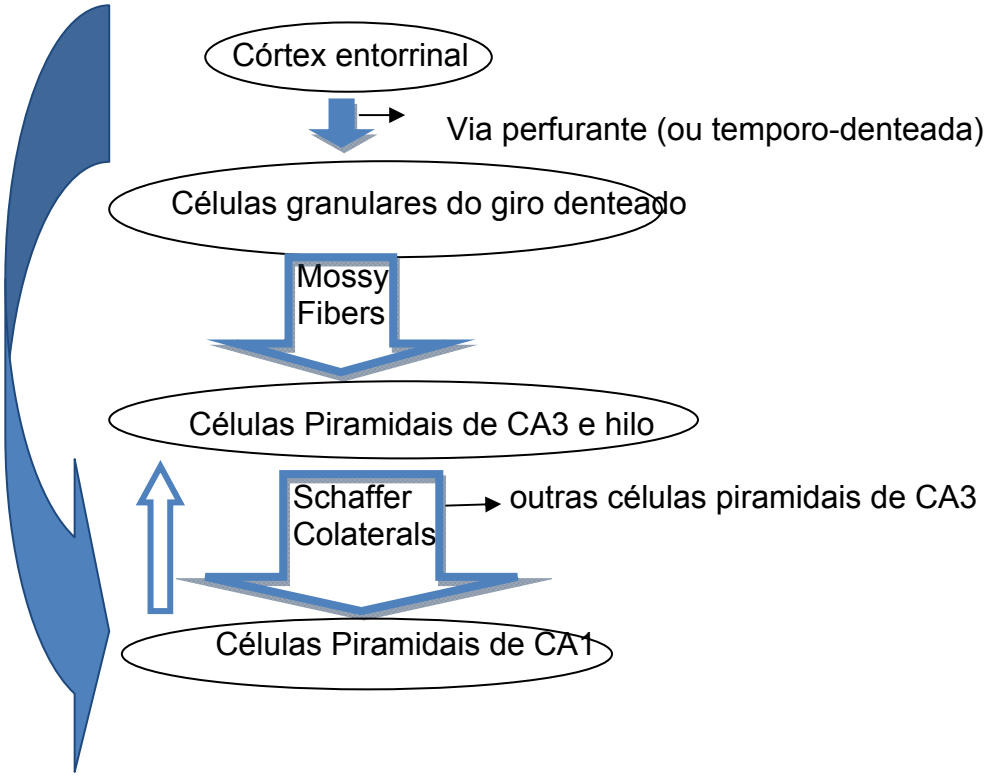

Figura 2 – Representação esquemática da via tri-sináptica hipocampal

As células granulares do giro denteado recebem aferência importante do córtex entorrinal que inerva os dendritos apicais das células granulares. Os axônios das células granulares, as fibras musgosas, estabelecem sinapses com os neurônios piramidais do segmento proximal de CA3. Os neurônios piramidais de CA3 e seus axônios – Schaffer colaterals – inervam os dendritos apicais de CA1. As células piramidais de CA3 também estabelecem um circuito de fibras recorrentes que inervam outras células de CA3, facilitando a geração de atividade sincronizada. Das células piramidais de CA1 emergem colaterais axônicos que terminam em neurônios de CA3 via conexões de associação. A região de CA1 também recebe conexões diretas do córtex entorrinal (via temporo-amônica).[19, 27, 28]

O sistema de neurônios piramidais de CA3 está entre as regiões cerebrais mais suscetíveis a crises, principalmente pela abundante rede de colaterais excitatórios entre os neurônios piramidais, o que facilita a instalação de atividade sincrônica.[19]

Uma pletora de neurônios GABAérgicos e suas sinapses estabelecem uma rede com um padrão específico de inervação que modula a atividade excitatória e desta maneira, controla a geração de oscilações elétricas capazes de gerar alterações clinicamente relevantes nestes circuitos.[19]

2.5 Modificações Estruturais e Funcionais na EMT

Estudos anatômicos de hipocampos ressecados de pacientes com EMT demonstram lesões atingindo as áreas CA1, CA3 e giro denteado. Os principais fatores envolvidos na variação de sensibilidade à lesões no hipocampo estão relacionadas à expressão diferencial de receptores e proteínas. As regiões CA1 e CA3 são ricas em receptores glutamatérgicos (NMDA em CA1 e Kainato em CA3). Quando ativados estes receptores permitem o influxo de cálcio em grande quantidade, este último sendo potencialmente tóxico para a célula afetada. No giro denteado, região do hilo, somente uma população específica de células é atingida, os interneurônios somatostatina-positivos e neuropeptídeo-Y positivos. Observa-se também o brotamento de fibras musgosas dentro da camada molecular interna do giro denteado. Estes achados são muito semelhantes àqueles encontrados nos hipocampos dos animais que são submetidos aos modelos experimentais de epilepsia.[16, 19]

Embora a marca registrada de epilepsia mesial temporal seja a perda neuronal, gliose e atrofia do hipocampo, outras estruturas do lobo mesial temporal manifestam alterações semelhantes. Estas áreas incluem a amígdala, o córtex entorrinal e alguns núcleos talâmicos. As alterações anatômicas observadas sugerem que o substrato para as crises na epilepsia mesial temporal pode estender-se para além o hipocampo. Estas observações anatômicas correlacionam-se com o fato de que no tratamento cirúrgico da epilepsia do lobo mesial temporal muitas vezes aumento de área ressecada correlaciona-se com melhor controle de crises no pós-operatório. No entando, ainda são necessários mais estudos para caracterizar totalmente influência das áreas extra hipocampais na gênese e manutenção das crises epilépticas.[16, 19, 29]

2.6 Mecanismos Neurofisiológicos Envolvidos na Epileptogênese na EMT

Como a morte neuronal e a reorganização morfológica levam ao desenvolvimento da hiperexitabilidade hipocampal e finalmente à epilepsia? Classicamente, fala-se de duas principais hipóteses.

Durante a década de 80 a hipótese principal era a de que a morte de neurônios GABAérgicos levaria à atenuação ou eliminação da inibição GABA-mediada, resultando em hiperexitabilidade patológica da principal população celular hipocampal. Contudo, estudos de imunohistoquímica mais detalhados demonstraram que na verdade os neurônios GABAérgicos são mais resistentes à morte neuronal

induzida por crises epilépticas. Por outro lado, estes estudos também demonstraram que as células musgosas e neurônios somatostatina-positivos do giro dentado, região entre as lâminas de células da camada granular, são altamente sensíveis à morte celular induzida por crises.[27]

O achado de que crises epilépticas intensas e de repetição levam à perda da inibição mediada por GABA das células da camada granular é consistente com a hipótese de que a desinibição sináptica contribuiria para a hiperexitabilidade. No entanto, a preservação preferencial de neurônios GABAérgicos vai de encontro com esta idéia. A fim de explicar este paradoxo, Sloviter propôs em 1991 a "hipótese das células em cesto dormentes". Esta hipótese afirma que a morte neuronal dos neurônios excitatórios retira a aferência dos neurônios GABAérgicos em cesto, resultando em desinibição por que as células em cesto ficariam "dormentes" sem a sua aferência das células musgosas. Uma vez iniciada, a perda parcial desta inibição, associada aos estímulos excitatórios normais, levaria a disparos excessivos das células granulares, progressão para morte celular e à emergência de uma condição epiléptica anos após o insulto inicial.[17, 18, 19, 25]

Uma hipótese alternativa sustenta que a hiperexitabilidade da camada granular seria uma conseqüência da reorganização patológica das fibras que constituem os circuitos hipocampais (*sprouting*), onde as células granulares passariam a inervarem a si mesmas, levando a criação de um circuito excitatório reentrante. As sinapses eliminadas pela morte de neurônios como as células musgosas que normalmente se projetam para o terço proximal dos dendritos das células granulares seriam substituídas pelo "brotamento" de axônios como os das células musgosas das células granulares para elas mesmas.[19]

Existem alguns estudos que demonstram que as fibras do sprouting inervariam também as células em cesto GABAérgicas. Sloviter (1992) demonstrou em estudos em modelos animais que haveria uma redução da inibição das células granulares e excitabilidade aumentada antes da ocorrência do fenômeno de sprouting. Estes achados apontam para a possibilidade de que o sprouting seja um mecanismo de resposta compensatória à hiperexitabilidade, visando limitar a atividade epileptogênica.[19]

Exitem evidências que suportam tanto uma quanto a outra hipótese e, na verdade, elas não são excludentes e é possível que ambas estejam corretas.

2.7 Modelos Animais de Epilepsia

A epilepsia experimental, baseada em modelos animais, produziu muitas das informações que temos hoje sobre a patologia. De uma maneira geral, crises epilépticas podem ser desencadeadas produzindo-se um desequilíbrio entre a atividade neuronal excitatória x inibitória onde os neurotransmissores glutamato e GABA respectivamente, são os principais envolvidos.[24] Neste contexto, acredita-se que a epileptogênese induzida por *kindling* ou por *Status epilepticus,* que são os modelos experimentais de epilepsia mais aceitos e utilizados, esteja baseada no aumento de atividade de vias mediadas pelo glutamato e/ou pela diminuição da atividade de vias que utilizam o GABA como o neurotransmissor principal.[23, 24, 30]

Um modelo animal é uma preparação simplificada na qual são reproduzidas as características mais críticas de uma determinada patologia. Para um modelo animal ser considerado válido, ele deve preencher três critérios: os sintomas

produzidos devem ser iguais ou semelhantes a patologia estudada, deve haver preditividade ou eficácia farmacológica idêntica, e a etiologia deverá ser similar ou homóloga.[24]

As principais características da epilepsia do lobo temporal são: localização do foco epiléptico no sistema límbico, particularmente hipocampo, amígdala e córtex entorrinal, - presença de evento precipitante inicial (IPI) - período sem crises após o IPI, chamado de período latente, - alta incidência de esclerose hipocampal nos indivíduos afetados. Todos os eventos supracitados são reproduzidos nos modelos animais de epilepsia do lobo temporal mais empregados *status epilepticus* e *Kindling*, o que os torna muito próximos do modelo homólogo ideal mencionado acima.[23, 24]

Em epilepsia, o uso de modelos animais nos ajuda a compreender os mecanismos fisiológicos e patológicos envolvidos na gênese, na manutenção e na propagação das crises. Além disso, os modelos animais também são úteis para desenvolver e testar potenciais novos tratamentos para epilepsia.

Vários modelos animais foram desenvolvidos para investigar a epilepsia do lobo temporal. Os modelos animais mais comuns de indução de epilepsia do lobo temporal são o *Kindling* e o *Status Epilepticus.* Os dois modelos proporcionam uma maneira confiável de induzir uma condição epiléptica persistente embora cada um com características individuais.[23]

2.8 Modelo Animal de Epilepsia Criado pela Indução de *Status Epilepticus* com Pilocarpina

Neste modelo, uma alta dose do agente convulsivante pilocarpina é injetado sistemicamente ou em local predeterminado. Esta substância desencadeia uma intensa atividade excitatória do sistema nervoso central através da hiperativação de receptores glutamatérgicos. Esta hiperativação se manifesta através de crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas recorrentes, o *status epilepticus.*[23, 30, 31]

Para a maioria dos pesquisadores, não é o *status epilepticus* em si o evento de interesse, mas sim a ocorrência tardia de crises espontâneas. Durante o período latente após a indução do *status*, muitos fatores de transcrição e genes ligados ao citoesqueleto e à reorganização sináptica estão "*upregulated*", resultando em plasticidade sináptica aberrante e a reorganização nos sistemas GABAérgico e Glutamatérgico.[23]

Utilizando este modelo é possível criar verdadeiramente um animal epiléptico. Além disso, as alterações morfológicas decorrentes da indução do status epilepticus são semelhantes às encontradas na esclerose mesial temporal em humanos, embora a lesão no modelo animal tenda a ser mais severa.[30]

A desvantagem deste modelo é que uma vez desencadeado, o status pode ser difícil de controlar e não é incomum que muitos animais morram durante a fase de indução do status. Outra desvantagem é o fato de que a expressão das crises epilépticas espontâneas posterior à indução do status pode ser imprevisível e que o dano neuronal pode ser extenso.[23, 30]

A ocorrência de crises espontâneas após o status tem uma latência média de 40 dias. Esta latência pode variar e está correlacionada com a dose do agente

convulsivante empregada, sendo que doses mais altas desencadearão crises espontâneas mais rapidamente. Também existe correlação entre o tempo de status epilepticus e o desenvolvimento de crises espontâneas.[30]

Revisão recente aponta que o modelo de *status epilepticus* com pilocarpina talvez não seja a melhor maneira de se estudar a EMT, tendo em vista que a mortalidade altíssima dos animais submetidos a este modelo. O fato de a mortalidade ser tão alta insere um viés na pesquisa, uma vez que os animais sobreviventes (e que são estudados) são os mais resistentes aos severos insultos produzidos pelo modelo, não podendo desta forma ser considerada uma amostra da média daquela população.[23] Porém, permanece sendo a maneira mais acessível e que requer menor aparato para a indução de EMT em animais.

3 PROTEÍNA PRÍON CELULAR

Prion é uma abreviação criada por Stanley Prusiner para *proteinaceous infectious particle*, que refere-se tanto a variante cellular endógena da proteína príon *(PrP^c)* quanto ao seu estado conformacional anormal, causador de patologias *(PrP^{Sc})*. O PrP^c é um glicoproteína de membrana (N-glycosilated, glycosylphosphatidylinositol (GPI) - *anchored protein*) com estrutura tipo α-hélice. A porção amino-terminal do PrP^c é composta de cinco domínios octapeptídicos altamente conservados, que ligam-se a uma lista cada vez maior de receptores. Suas características levaram à suspeita de que a proteína príon celular poderia estar envolvida em função como ligação a íons livres, comunicação celular, sinalização e adesão. De fato, o PrP^c liga-se ao cobre e a molécula ligada ao cobre tem ação

superóxido dismutase. As propriedades antioxidantes do PrP^c foram comprovadas em diversos estudos conforme detalhado abaixo.[4, 5, 6, 9]

O gene humano da proteina prion celular (*Prnp*) foi identificado em 1986 e está localizado no cromossomo 20. O gene *Prnp* apresenta dois exons, sendo que o segundo exon codifica o PrP^c. A seqüência de nucleotídeos para a PrP^c foi altamente preservada através da evolução nos mamíferos, especialmente naquelas regiões que codificam domínios flexíveis da proteína. O alinhamento de seqüencias do Prnp de humanos e diferentes mamíferos indica que os códons localizados entre as regiões 90 e 130 influenciam a transmissibilidade dos príons entre os mamíferos, incluindo humanos.[9]

Como a maioria das moléculas de PrP são encontradas ancoradas na superfície celular, costuma-se considerá-lo uma molécula extracelular. No entanto, algumas subpopulações de neurônios nos hipocampos, tálamo e neocórtex apresentam PrP localizado principalmente no citosol, ou seja, intracelularmente. No cérebro saudável, este subtipo não representa nem 10% do total de PrP expresso. Nas encefalopatias espongiformes, no entanto, chega a representar até 30% do total de moléculas de PrP. Assim como a molécula que resta ancorada na membrana celular, o PrP intracelular apresenta também uma lista cada vez maior de ligantes, e muitas possíveis funções não totalmente elucidadas.[4, 9]

A proteína príon celular é altamente expressa no sistema nervoso central, com a quantidade variando de acordo com as diferentes regiões, com os subtipos celulares e entre neurônios com diferentes fenótipos neuroquímicos. Também é encontrada em diversos componentes do sistema imunológico, na medula óssea, no sangue e em tecidos periféricos. Em menor quantidade, é expressa no coração, rins e fígado.[5]

3.1 Proteína Príon Celular e Doenças

As doenças do príon são caracterizadas por neurodegeneração disseminada e sintomas clínicos de disfunção motora e cognitiva, associados a propagação da partícula prionica infecciosa e em muitos casos à formação de placas amilóides. Estas placas amilóides contém agregados de PrP^{Sc}, a proteína conformacionalmente mutada e rica em β-*sheets.*[6, 9]

Os achados neuropatológicos incluem perda neuronal, gliose e degeneração espongiforme.

Todas as doenças causadas pelo príon são progressivas, fatais e até o presente incuráveis. Embora a proteína príon celular fisiológica seja facilmente digerida pela enzima chamada proteinase K, a forma mutada (PrP^{SC}) rica em β-*sheets*, é parcialmente resistente a esta enzima.[6]

Uma peça crucial nas evidências demonstrando que o PrP^{c} é um fator determinante nas doenças do príon veio de experimentos que demonstraram que camundongos geneticamente modificados, com “knockout” do gene Prnp são imunes à doenças causadas pelo príon.

Os primeiros casos de doenças do príon em humanos foram descritos em 1920 – Creutzfeld e 1921 – Jakob (Creutzfeldt-Jakob Disease). Desde então o número de patologias causadas pelo príon em humanos aumentou e atualmente incluem, Gerstmann-Straüssler-Scheinker Syndrome, Insonia Familiar Fatal e Kuru. Em animais as doenças são o Scrapie em ovinos, a Encefalopatia espongiforme do Gado (Doença da vaca louca), *Chronic Wasting Disease* em cervos e alces e a encefalopatia espongiforme do Mink. A encefalopatia espongiforme do gado foi

transmitida a uma série de animais domésticos, causando doenças como por exemplo, a encefalopatia espongiforme do gato.[5, 6]

Embora a formação de PrP^{Sc} acompanhe a neurodegeneração nas doenças do príon, muitas evidências apontam para o fato de que o $PrPS^{Sc}$ sozinho não é intrinsecamente tóxico. Os neurônios hospedeiros precisam apresentar PrP^{c} ancorado à membrana celular para que ocorra a neurodegeneração. Além disso, camundongos transgênicos que expressam somente a forma solúvel do PrP são refratários ao desenvolvimento de manifestações clínicas da doença, embora a inoculação da partícula infectada leve à formação de PrP^{Sc} e de agregados β-amilóides. Este achado indica que o PrP^{c} ligado à membrana celular é um pré-requisito para a ocorrência da neurodegeneração nas doenças do príon.[14]

4 PROTEÍNA PRÍON CELULAR E SUAS FUNÇÕES FISIOLÓGICAS

Dentre todas as incertezas à respeito das funções fisiológicas e moleculares da proteína príon celular, muito do conhecimento produzido até o momento veio através da manipulação genética do gene *Prnp*, tanto em culturas de células quanto em camundongos transgênicos. Muitas destas mutações foram desenvolvidas com o intuito de estudar os domínios específicos necessários para restaurar a suscetibilidade destes animais ou células ao PrP^{Sc}. Contudo, os investigadores encontraram que a expressão de alguns domínios era capaz de causar neurodegeneração por si só, sem a necessidade de contato com a partícula infecciosa. Uma vez que os animais com knockout total do *Prnp* não apresentam nenhum fenótipo específico, as doenças desenvolvidas nestes animais modificados

geneticamente pode apontar para possíveis vias nas quais o PrP^c é funcionalmente ativo.[4, 5, 6, 7, 8]

4.1 Processos Celulares Influenciados pela Expressão de PrP^c

Uma das funções mais freqüentemente sugeridas para o PrP^c é a promoção da sobrevivência celular, seja em células nervosas ou não-nervosas, o que foi observado em estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta função citoprotetora parece ser mediada por mecanismos anti-apoptóticos e antioxidantes.[6, 9, 12, 21, 22, 32]

4.1.1 Função antiapoptótica

Vários estudos indicam que o PrP^c tem ação citoprotetora diminuindo o nível de apoptose após alguns estímulos apoptóticos específicos tais como a hiperexpressão das citocinas Bax e TNF-α. A hiperexpressão de Bax induz apoptose em células nervosas humanas. A co-expressão de PrP^c fisiológico reverteu a indução de apoptose mediada por Bax.[4]

Em um estudo em células cancerosas buscando identificar àquelas resistentes a apoptose, os pesquisadores encontraram uma linhagem de células de câncer de mama denominada MCF-7, resistente a apoptose induzida por TNF-α. Nestas células, encontraram PrP^c superexpressado em 17 vezes. Também demonstraram o contrário: a indução de hiperexpressão de PrP^c em células da

mesma linhagem porém sensíveis à ação do TNF-α as converteu em células resistentes à apoptose.[4]

O efeito neuroprotetor do PrP^c também foi demonstrado em diversos estudos que exploraram a atividade da proteína em modelos de isquemia em cérebros de ratos. Nestes estudos, identificaram que os níveis de PrP^c estavam aumentados nos animais submetidos à isquemia quando comparados com os controles. Também, que a ausência de PrP^c (em animais *knockout*) estava relacionada com maior área de infarto.[22]

4.1.2 Proteção contra estresse oxidativo

Muitos pesquisadores acreditam que a principal função do PrP^c seja a proteção contra o estresse oxidativo. A atividade anti-oxidante do PrP^c tem sido atribuída à sua ligação com os íons Cu^{2+}. O íon Cu^{2+} em sua forma livre é altamente citotóxico e deve ser minimizado pois as reações redox do íon liberam espécies reativas de oxigênio (radicais livres). Estes são responsáveis por aumentar a peroxidação de lipídeos e pela oxidação de proteínas, levando ao dano celular. As primeiras evidências vieram de estudos *in vitro* de células de feocromocitoma em ratos. As células selecionadas pela sua resistência à toxicidade pelo cobre ou ao estresse oxidativo demonstravam níveis elevados de expressão do PrP^c. Células neuronais primárias que não expressam PrP^c são mais suscetíveis à hidrólise por peróxido de hidrogênio. Neurônios de camundongos com *knockout* para a proteína príon celular foram mais suscetíveis a diversos agentes capazes de induzir estresse

oxidativo, essa suscetibilidade aumentada foi explicada por uma diminuição de atividade da Cu/Zn superoxido-dismutase.[12, 21, 22, 33]

4.1.3 PrP^c e sinapses

Alterações patológicas precoces das doenças do príon incluem perda de sinapses e a deposição de PrP^{Sc} nos terminais sinápticos. Proteínas de vesículas sinápticas associadas a exossomas e neurotransmissão estão diminuídas em pacientes com encefalopatia espongiforme. Desorganização e perda sináptica são achados fundamentais das doenças do príon, independente de haver ou não mudança espongiforme perda neuronal e gliose.[11, 12, 33, 34, 35]

Estudos eletrofisiológicos de neurônios da região CA1 do hipocampo de animais com expressão deficitária ou com *knockout* para a expressão do PrP^c demonstraram que a transmissão sináptica glutamatérgica, a inibição rápida $GABA_A$ mediada, a potenciação de longa duração (LTP) e a hiperpolarização tardia estavam reduzidos ou ausentes nestes animais.[11, 12]

Não se sabe se a função do PrPc nas sinapses está relacionada às suas propriedades antiapoptóticas ou antioxidantes ou ainda pelo seu envolvimento com a liberação de neurotransmissores (via interação com a sinapsina 1 ou sinaptofisina). Além disso, outros mecanismos ainda não identificados poderiam estar envolvidos, ou ainda, vários processos podem interagir e desempenhar funções em conjunto na interação sináptica.

4.1.4 Neuritogênese

Várias linhas de evidência indicam para um possível envolvimendo do PrP^c no desenvolvimento neuronal, na sua diferenciação e na neuritogênese. A ativação de vias que estimulam o crescimento de axônios ou dendritos como p59Fyn kinase, cAMP/ PKA, PKC e MAPkinase está associada a transdução de sinal mediada por PrP^c. Estudos recentes demonstram que o PrP^c regula positivamente a proliferação de precursores neurais na neurogênese de mamíferos adultos, bem como durante o seu desenvolvimento. Outra evidência que reforça o possível envolvimento do PrP^c no desenvolvimento e proliferação celular são os estudos demonstrando alta afinidade de ligação do PrP^c com laminina. A interação da laminina com seus receptores clássicos, as integrinas, exerce um papel fundamental na proliferação, diferenciação, migração e morte celular.[10, 11, 13, 14, 33]

4.1.5 Manutenção da substância branca

A substância branca do SNC, composta principalmente por neurônios mielinizados freqüentemente encontra-se lesada nas doenças do príon. Vários camundongos geneticamente modificados, expressando deleções pontuais da molélula do príon ou ainda animais com *knockout* para a expressão da proteína demonstram degeneração e vacuolização de fibras mielinizadas no sistema nervoso central.[4]

5 PROTEÍNA PRÍON CELULAR E SUA POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NAS EPILEPSIAS

Uma das alterações mais surpreendentes já encontradas no estudo dos animais *Prnp*$^{0/0}$, é a sua sensibilidade aumentada ao desenvolvimento de crises epilépticas farmacológicas. Após uma única dose do agente convulsivante pentilenotetrazol, a mortalidade por crise foi de 91% nos animais knockout contra 33% nos animais controles. Após a injeção de ácido kaínico, 70% dos animais *knockout* desenvolveram pelo menos uma crise epiléptica severa e 40% tiveram crises repetitivas, enquanto que entre os animais controles nenhum desenvolveu crises observáveis. Estes animais também demonstraram uma sensibilidade maior ao desenvolvimento de *kindling* farmacológico, com uma progressão mais rápida para o *kindled state*, demonstrando um possível envolvimento do PrPc não somente no limiar para o desenvolvimento de crises, mas também nos processos epileptogênicos resultantes da estimulação crônica[36].

Outro achado relevante sobre PrP^{c} e epilepsia é a ocorrência normal, espontânea de sprouting de células musgosas na camada molecular do hipocampo de animais Prnp$^{0/0}$. O padrão de reorganização encontrado nestes animais é muito semelhante ao que ocorre em certos tipos de epilepsia[37]. Estudo de Rangel *et al.* (2007) replicou os achados prévios demonstrando que camundongos com *knockout* da proteína príon celular são mais sensíveis à crises epilépticas induzidas por kainato. Neste estudo demonstraram também que este aumento à sensibilidade ao kainato (KA) estava associado a aumento de apoptose e morte neuronal hipocampal, e sugerem que o PrP^{c} possa estar envolvido na modulação do funcionamento e/ou na expressão de receptores KA.[11]

Em outro estudo bem recente os mesmos autores exploraram o papel da expressão de PrP^c na neurotransmissão e excitabilidade neuronal. Os resultados demonstraram que o PrP^c é necessário para a homeostase do funcionamento dos circuitos hipocampais e que isso ocorre devido ao envolvimento da proteína com a neurotransmissão mediada por receptores $GABA_A$ e AMPA-Kainato.[12]

6 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO

Considerando-se as evidências relatadas, o estudo do envolvimento da proteína príon celular nos fenômenos relacionados à epileptogênese parece amplamente justificado. Com tantas funções envolvendo mecanismos celulares tão familiares aos estudos da epileptogênese como o estresse oxidativo, apoptose, reorganização celular, neuritogênese e atividade sináptica, é plausível pensar em um possível envolvimento do PrP^c na epileptogênese na EMT.

Neste trabalho avaliamos e evolução da expressão da proteína príon celular no hipocampo em diferentes momentos da indução de epilepsia através do modelo animal de pilocarpina em ratos. Também foi comparada a expressão de PrPc com *Timm staining* para verificar se há sobreposição entre o sprouting observado nestes animais e a expressão de proteína príon celular. Além disso, lâminas coradas com Fluoro-Jade foram realizadas com o intuito de verificar se há coincidência entre a expressão de proteína príon celular e a morte neuronal.

REFERÊNCIAS

1. HAUSER, W. A. Incidence and Prevalence. In: ENGEL, J.; PEDLEY, T. A. (Ed.). **Epilepsy:** a comprehensive textbook. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. p. 47-57.

2. KALE, R. Bringing Epilepsy Out of the Shadows. **British Medical Journal**, v. 315, n. 7099, p. 1-6, jul. 1997.

3.ENGEL JUNIOR, J. **Surgery for Seizures. New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 10, p. 647-652, 1996.

4. AGUZZI; Adriano; BAUMANN, Frank; BREMER, Juliane. The Prion's Elusive Reason for Being. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, p. 439-477, jul. 2008.

5. WECHESELBERGER, Christian *et al.* The Physiological Functions of Prion Protein. **Experimental Cell Research**, v. 281, n. 1, p. 1-8, nov. 2002.

6. HU, Wei *et al.* Prion proteins: Physiological Functions and Role in Neurological Disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 264, n. 1/2, p. 1-8, jan. 2008.

7. NICOLAS, Oriol; GRAVÍN, Rosalina; RÍO, José A. del. New Insights into Cellular Prion Protein (PrPc) Functions: the “ying and yang” of a relevant protein. **Brain Research Reviews**, v. 61, n. 2, p. 170-184, 2009.

8. NIEZNANSKI, Krzysztof. Interactions of Prion Protein with Intracellular Proteins: so many partners and no consequences? Cellular and Molecular Neurobiology**,** v. 29, n. 8, dez. 2009.

9. LINDEN, Rafael *et al*. Physiology of the Prion Protein. **Physiological Review**, v. 88, n. 2, p. 673-728, abr. 2008.

10. HAJJ, Glaucia N. M. Hajj *et al*. Cellular Prion Protein Interaction with Vitronectin Supports Axonal Growth and Is Compensated by Integrins. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 11, p. 1915-1926, jun. 2007.

11. RANGEL, Alejandra *et al.* Regulation of $GABA_A$ and Glutamate Receptor Expression, Synaptic Facilitation and Long-Term Potentiation in the Hippocampus of Prion Mutant Mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, out. 2009.

12. RANGEL, Alejandra *et al.* Enhanced Susceptibility of Prnp-Deficient Mice to Kainate-Induced Seizures, Neuronal Apoptosis, and Death: role of AMPA/kainate receptors. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 12, p. 2741-2755, 2007.

13. PRADO, M. A*. et al.* PrPc on the Road: trafficking of the cellular prion protein. **Journal Neurochemistry**, v. 88, n. 4, p. 769-81, fev. 2004.

14. GRANER, E. e*t al.* Cellular Prion Protein Binds laminin and Mediates Neuritogenesis. **Brain Research Mololecular,** v. 76, n. 1, p. 85-92, mar. 2000.

15. DITYATEV, Alexander; FELLIN, Tommaso. Extracellular Matrix in Plasticity and Epileptogenesis. **Neuron Glia Bioligy**, v. 4, n. 3, p. 235-247, ago. 2008.

16. THOM, Maria *et al*. Temporal Lobe Sclerosis Associated with Hippocampal Sclerosis in Temporal Lobe Epilepsy: neuropathological features. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 68, n. 8, p. 928-938, ago. 2009.

17. SLOVITER, Robert S. Sloviter *et al*. “Dormant Basket Cell” Hypothesis Revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. **Journal of Compartive Neurology**, v. 459, n. 1, p. 44-76, abr. 2003.

18. KIENZER, Friederike; NORWOOD, Braxton A. SLOVITTER, Robert S. Hippocampal Injury, Atrophy, Synaptic Reorganization, and Epileptogenesis after Perforant Pathway Stimulation-Induced Status Epilepticus in the Mouse. **Journal of Comparative Neurology**, v. 515, p. 181-196, 2009.

19. MCNAMARA, James O. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 3413-3425, 1994.

20. BEN ARI, Y. Reactive Plasticity in Neurological Disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience,** v. 10, n. 1, p. 17-27, 2008.

21. BROWN, D. R.; NICHOLAS, R. S.; CANEVARI, L. Lack of Prion Protein Expression Results in a Neuronal Phenotype Sensitive to Stress. **Neuroscience Research,** v. 67, n. 2, p. 211-24, jan. 2002.

22. CHIARINI, L. B. *et al.* Cellular Prion Protein Transduces Neuroprotective Signals. **Journal EMBO,** v. 21, n. 13, p. 3317-3326, jul. 2002.

23. MORIMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R. Kindling and Status Epilepticus Models of Epilepsy: rewiring the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 73, n. 1, p. 1-60, 2004.

24. ROLAND, R. A.; BARAM, T. Z. Epileptogenesis in the Developing Brain: what can we learn from animal models? **Epilepsia** . v. 48, n. 5, p. 2-6, 2007.

25. BERG, Anne T. The Natural History of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, v. 21, n. 2, p. 173-178, 2008.

26. WIESER, Heinz-Gregor. Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. **Epilepsia**, v. 45, n. 6, p. 695-714, jun. 2004.

27. COSTA, J. Costa da et al. **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias:** aspectos clínicos e cirúrgicos. São Paulo: Lemos Editorial, 1998.

28. AMARAL, D. G.; WINTER, M. P. The Three-Dimensional Organization of the Hippocampal Formation: a review of anatomical data. **Neuroscience,** v. 31, p. 571-591, 1989.

29. BERTRAM, Edward H. Temporal Lobe Epilepsy: where do the seizures really begin? **Epilepsy & Behavior**, v. 14, n. 1, p. 32-37, 2009.

30. CURIA, G. *et al.* The Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods,** v. 172, n. 2, p.143-157, 2008.

31. ARIDA, R. M. *et al*. The Course of Untreated Seizures in the Pilocarpine Model of Epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 34, n. 2/3, p. 99-107, abr. 1999.

32. MARCIANO, Paolo G. *et al.* Neuron-Specific mRNA Complexity Responses During Hippocampal Apoptosis after Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurosccience**, v. 24, n. 12, p. 2866-2876, mar. 2004.

33. PEREIRA, G. S. *et al.* Changes in Cortical and Hippocampal Ectonucleotidase Activities in Mice Lacking Cellular Prion Protein. **Neuroscience Letters,** v. 301, n. 1, p. 72-74, 2001.

34. WALZ, Roger Walz *et al.* Cellular Prion Protein: implications in seizures and epilepsy. **Cellular and Mollecular Neurobiology**, v. 22, n. 3, jun. 2002.

35. BERR, C. *et al.* Polymorphism of the Prion Protein is Associated with Cognitive Impairment in the Elderly. **Neurology**, v. 51, n. 3, p. 734-737, 1998.

36. WALZ, R. *et al.* Increased Sensitivity to Seizures in Mice Lacking Cellular Prion Protein. **Epilepsia,** v. 40, n. 12, p.1679-1682, 1999.

37. COLLING, Simon B. et al. Mossy Fibre Reorganization in the Hippocampus of Prion Protein Null Mice. **Brain Research**, v. 755, n. 1, p. 28-35, abr. 1997.

Hippocampal Cellular Prion Protein Expression in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy

Isabel Cristina Rockenbach (1)

Bruno Lobao Soares (2)

Kelin Cristine Martin (3)

João Pereira Leite (4)

Marino Bianchin, MD (1,3)

(1) PPG Ciências Medicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brazil.

(2) Departament of Biophysics and Pharmachology. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Brazil.

(3) Division of Neurology. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

(4) Department of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirao Preto, Brazil.

Address correspondence to:
Marino Muxfeldt Bianchin
Division of Neurology
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos,
Borto Alegre – RS
Brazil - CEP 90035 – 903
e-mail: mmbianchin@hotmail.com

ABSTRACT

RATIONALE: Mice lacking cellular prion protein (PrP^c) are more sensitive to seizures induced by four different pharmacological protocols. The hippocampal formation of these animals exhibits supragranular mossy fiber sprouting which resembles that observed in patients with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS). These findings suggest that the PrP^c may be involved in epileptogenesis in MTLE-HS. Here we investigated the immunohistochemical localization of the PrP^c in the hippocampus of animals submitted to the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (PMTLE).

METHODS: Status epilepticus (SE) was induced with pilocarpine in three different groups of adult Wistar rats. The animals were sacrificed 18 hours, 5 days, and 2 months after SE induction and the results were compared to the respective saline-injected control animals. Slices were processed for hematoxylin-eosin, PrP^c immunohistochemistry and neo-Timm .

RESULTS: PrP^c was increased in the CA1 and in CA3 regions of the hippocampus 18 hours after pilocarpine injection. PrP^c continued to be increased in the CA1 region of the hippocampus five days after pilocarpine injection. In the CA2 and granular regions of the hippocampus we did not observe significant differences in PrP^c expression during the acute phase of PMTLE. In the chronic group, PrP^c was expressed co-localized with mossy fiber sprouting.

CONCLUSION: Cellular prion protein is differentially expressed at different phases of the pilocarpine model of epilepsy. Transient expression of PrP^c during the acute phase of the pilocarpine model may reflect changes which may render cells more resistant to seizure-induced damage and may be related to apoptosis or may to the initial phases of neuroplasticity. During the chronic period, PrP^c is co-expressed in

the same regions of mossy fiber sprouting. In chronic animals, PrP^c might be related to neuroplasticity, epileptogenic processes, neurotransmission, or alternatively may be implicated in cellular protection against recurrent seizures.

Introduction

Mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis (MTLE-HS) is the most common form of lesional epileptic syndrome in adults. Prolonged febrile seizures, aberrant brain development, perinatal brain damage, and gene abnormalities have all been implicated in MTLE-HS. However, its pathophysiological mechanisms have not been fully elucidated (Andermann et al., 2005; Baulac et al., 2004; Engel, 1996; Engel, 2001; Mathern et al., 2002). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (PMTLE) is a useful model for the investigation of the development, neuroplasticity events, and neuropathology of MTLE-HS in rodents (Leite et al., 2002; Loscher, 2002; Scorza et al., 2009; Turski et al., 1989). In this model, a prolonged status epilepticus (SE) is induced by systemic infusion of the cholinergic agonist pilocarpine, inducing chronic epilepsy in the animals (Leite et al., 2002; Loscher, 2002; Scorza et al., 2009; Turski et al., 1989). The histopathological characteristics of PMTLE, and mainly neuronal loss and mossy fiber sprouting resemble those observed in the pathologic examination of human hippocampus with MTLE-HS (Leite et al., 2002; Loscher, 2002; Scorza et al., 2009; Turski et al., 1989). After the acute and silent period, animals became chronically epileptic showing spontaneous limbic seizures that initiate in the hippocampus (Leite et al., 2002; Loscher, 2002; Scorza et al., 2009; Turski et al., 1989).

Cellular prion protein (PrP^c) is a glycoprotein anchored to the outer cell surface whose structural conversion is related to uncommon diseases, i.e., the spongiform encephalophaties (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008). The physiological role of PrP^c remains elusive (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008; Martins et al., 2002). The first observations of knockout mice for PrP^c suggested that the animals

without the protein develop normally, showing no major behavioral abnormalities (Bueler et al., 1992). However, during the last three decades some differences have been noticed between wild type animals and knockouts (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008; Lobao-Soares et al., 2005; Lobao-Soares et al., 2008; Martins et al., 2002; Nico et al., 2005; Thais et al., 2006). For example, PrP^c knokout mice have altered circadian rhythms (Tobler et al., 1996) and are more sensitive to oxidative stress (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008; Martins et al., 2002; Brown, 2001; Derrington and Darlix, 2002). Based on these observations and on in vitro studies, some authors have suggested that this protein binds copper and has anti-oxidant properties (Brown, 2001; Derrington and Darlix, 2002). However, other authors have implied PrP^c functions in apoptosis and in synaptic formation (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008). In addition, PrP^c has been reported to interact with laminin (Graner et al., 2000a) and stress-inducible protein 1 (STI1) (Zanata et al., 2002), mediating neuronal cell adhesion, neurite extension and maintenance or signal transduction (Chiarini et al., 2002; Hajj et al., 2007; Hajj et al., 2009; Linden et al., 2008; Zanata et al., 2002). Ablation of the cellular prion protein gene enhances neuronal excitability of the hippocampus in vitro (Rangel et al., 2007; Rangel et al., 2009) and sensitivity to seizure in vivo, also observed in the pilocarpine model of epilepsy (Walz et al., 1999). In addition, it has been shown that the hippocampal formation of these animals exhibits mossy fiber sprouting resembling that observed in patients with (MTLE-HS)(Colling et al., 1997).

Here we evaluated the spatiotemporal expression of PrP^c in the hippocampus during different phases of PMTLE in rats. We trust that our study will provide some new insights into the role of PrP^c.

Material and Methods

Animals and Pilocarpine SE Induction

Animals were housed at a maximum of five to a cage on a 12 hour light cycle, with free access to food and water. A total of 60 animals were injected intraperitoneally (i.p.) with pilocarpine and monitored behaviorally for at least 6 h. Mortality was 50% and about 5% of the rats did not developed SE. Only animals that progressed to SE characterized by generalized motor seizures were used. Briefly, 30 min. after pretreatment with 1 mg/kg scopolamine methylnitrate dissolved in saline to minimize the peripheral cholinergic effects, animals were inoculated i.p. with a single pilocarpine dose of 280 mg/kg (Sigma, USA) and were observed for six hours. After pilocarpine injection, animals became hypoactive and exhibiteded piloerection. Generalized convulsions and limbic SE usually occurred 15-40 min after the injection. In this model, after a silent period, all animals exhibiting seizures related to pilocarpine injection develop spontaneous seizures (2-15 per month), characterizing the chronic period. There is no evidence of spontaneous remission for at least 6 months (Cavalheiro et al., 1991; Mello et al., 1993). Induced animals (PILO) and respective control groups (SHAM) injected only with saline were sacrificed at different times after the scopolamine and saline injections. The surviving PILO animals and respective SHAM controls were sacrificed and used for brain slice analysis at time points of 18 hours, 5 days and two months (chronic epileptic group). The PILO animals that did not present seizures within 1 hour after drug inoculation were discarded. All procedures were done according with the recommendations of Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) for animal care.

Tissue Characterization and Processing

At sacrifice, animals were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused through the heart with a solution of normal buffered saline for 5 min. (100 ml), 0.1% sodium sulfide in buffer, pH 7.3, for 10 min (150 ml), and 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min. (~50 ml). The brains were than gently removed, kept in PFA for 4 hours at room temperature, and blocked in paraffin. For each rat, coronal sections covering the entire septotemporal length of the hippocampus were dewtoped for neo-Timm histochemistry and Nissl staining for histopathologic review. The method of neo-Timm's processing and development has been previously described. Ten µm-thick sections were cut, mounted on gelatin-chrome alum-coated microscope slides, and dried at 58°C for 2 h.

Antigen Retrieval and Immunohistochemistry

Sections were reacted with polyclonal antibody N10 against prion (kindly provided by Dr S.B. Prusiner). Control sections were processed in parallel without the primary antibody. Permanent staining was obtained with an HRP-ABC kit (Vector) using diaminobenzidine as chromogen. PrP^c immunoreactivity from paraffin-embedded specimens was retrieved by an adaptation of the method described by Mathern et al. Paraffin sections were deparaffinized and endogenous peroxidase was inactivated with 3% H_2O_2 in buffered saline for 15 min. Sections were then incubated with 50 mM Tris-HCl, pH 9.5, and heated in a microwave oven at a potency of 700 W for 10 min, followed by a 1-min interval and additional heating for 5 min. All subsequent incubations were carried out at room temperature. Microwave-treated sections were placed in Tris-glycine buffer (0.1 M glycine, pH 7.4) for 30 min to quench unreacted aldehyde groups. Sections were then incubated with 20 mM sodium phosphate

buffer, pH 7.4, 0.45 M NaCl, 0.3% Triton X-100 (Triton buffer; Sigma Chemical Co.), 2% normal goat serum (blocking buffer), and 5% defatted dry milk for 5 h. The slices were incubated overnight with the primary mouse polyoclonal PRPc antibody diluted 1:1500 in blocking buffer. Controls, in which the primary antibody was replaced with blocking buffer, were also carried out. Sections were washed four times with Triton buffer. Anti-PrP^c antibody was detected with biotinylated rabbit anti-mouse IgG (Vector, Burlingame, CA; BA-2000) diluted 1:200 in blocking buffer for 60 min. The complex was incubated in the ABC Kit (Elite PK-6102; Vector) and visualized using diaminobenzidine (1 mg/ml in 1% H_2O_2). The sections were then dehydrated, coverslipped, and analyzed by light microscopy (Zeiss TM).

Tissue Analysis

PrP^c expression in the hippocampal sub-regions was visually compared among the different groups and between each group and the controlsd. In the analysis of the hippocampus we considered the classical division into three fields (CA3, CA2 and CA1) according to the nomenclature suggested by Lorente de No (ref), and the regions previously described (i.e., the pyramidal cell layer, the stratum oriens, the stratum radiatum, the stratum lucidum and the stratum lacunosum moleculare (Amaral and Witter, 1989). Also we considered described hippocampal regions such as the subiculum, molecular cell layer, pyramidal cell layer, granular cell layers, polymorphic cell layer,dentate gyrus, and hilus (Amaral and Witter, 1989). The cell layer below the granular layer, between the latter and the hilus was named subgranular layer. For the analysis of mossy fiber sprouting in animals with chronic epilepsy (2 month group) we analyzed Zn^{+2} expression by the molecular layer by Timm staining and compared the findings with those observed with PrP^c staining in

the same region of adjacent coronal brain sections. For comparisons between SHAM and PILO animal slices, we used controls to determine basal prion expression in relation to possible differential prion expression at different times of epileptogenicity in the pilocarpine model. Counts were done using grid morphometric techniques with Abercrombie's (1946) corrections (Babb et al., 1984a; Babb et al., 1984b; Mathern et al., 1995a; Mathern et al., 1995b; Mathern et al., 1996; Mathern et al., 1997) and the hippocampal subfields were based on Lorente de No´ s classification. Neuronal counts were performed by a single examiner who was blind to other collected data. Briefly, an ocular grid consisting of 10 by 10 boxes was positioned over the hippocampal region of interest using the microscope. For the stratum pyramidale and the granular stratum the 20 boxes in sequential 2 by 2 box segments (104 X 1040-µm area) that followed the laminar profile of neurons were selected, and all nuclei belonging to pyramids within this region were counted except for those touching the upper and right edges of the grid. Typically, practically an entire cornus ammonis subfield would be included in a single counted field. For the smaller granule cells a linear 1 by 5 box (52 3 260-µm area) was used, the measurement was repeated three more times over the upper and lower granule cell blades, and the results were averaged. The volumetric neuron densities were computed using a previously published equation: N (neurons/ mm^3) 5 A 3 [M/(L 1 M)] divided by the volume of the sampling area (10 µm 3 area of grid), where A is the number of counted nuclei, L is the average length of the nucleus, and M is the section thickness (Babb et al., 1984a; Babb et al., 1984b; Mathern et al., 1995c).

Statistical Analysis

Differences in number of cells stained for PrP^c were independently analyzed by multivariate analysis of variance (MANOVA) with Pillar's Trace test. MANOVA was chosen because the observations were made in four different time groups to analyze different, but anatomically and functionally related regions. Pillar's Trace test was chosen because of the relatively small sample size and unequal n values. We used Dunnett's test as post-hoc test for comparisons between the experimental groups and the SHAM control group. Thus, the variation in PrPc expression was compared only to basal expression. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences version 15.0 (SPSS Chicago, IL, USA). Results were considered to be significant if $p<0.05$.

Results

We observed differential patterns of prion staining among groups. In the control animals, basal PrP^c staining was observed in the dentate gyrus, in the CA subfields of the hippocampus, including the outer polymorphic layers of the dentate gyrus, the pyramidal cell layer of the stratum oriens and stratum radiatum in CA1, CA2 and CA3, and in the stratum lucidum in CA 3, which contains the mossy fibers emerging from the dentate gyrus. A less intense labeling was observed in the molecular layer (CA3, stratum lucidum, as described above) and mild staining was observed in the granular layers and stratum lacunosum moleculare of the hippocampus. MANOVA showed differences among groups, with the Pilai Trace Test = 0.76 [$F(12\text{-}99)=2.78$; $p=0.003$)]. The test of between-subject effects showed differences in PrP^c expression in CA1 [$F(3,34)=8.53$; $p<0.0001$] and CA3 [$F(3,34)$;

4.31 p = 0.011], but not in CA2 [F(3,34)=2.43; p=0.082] or the granular region [F(3,34)=2.18; p=0.12]. The post-hoc Dunnett test showed increased PrP^c expression in CA1 in the 18-hour (p=0.019) and five-day PILO groups (p<0.0001) compared with the SHAM group. In CA3, we observed an increased number of cells expressing PrP^c in the 18-hour PILO group (p=0.004) compared with respective control SHAM group. These results are presented in Figure 1 to 4. In the two-month chronic PILO group, PrP^c was observed in a more diffuse pattern of expression in the molecular layer (CA3, stratum lucidum). Interestingly, PrP^c was overexpressed in the mossy fiber sprouting region, as revealed by adjacent slices stained with Timm (Figure 5). The immunohistochemical control sections without primary or secondary antibody did not present any staining and therefore the antibody specificity for all reactions analyzed w considered satisfactory.

Insert Figure 1 About Here

Insert Figure 2 About Here

Insert Figure 3 About Here

Insert Figure 4 About Here

Insert Figure 5 About Here

Discussion.

In the present study we observed increased PrP^c expression in different brain regions at different times after the beginning of SE in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. PrP^c was increased in the CA1 and in CA3 regions of the hippocampus 18 hours after pilocarpine injection and continued to be increased in the CA1 region of the hippocampus five days after pilocarpine injection. In the CA2 and granular regions of the hippocampus we did not observe significant differences in PrP^c expression during the acute phase of PMTLE. In the chronic group, PrP^c was expressed co-localized with mossy fiber sprouting.

The physiological role of PrP^c remains elusive. Taken together, several experimental lines of research suggest that PrP^c might be involved in neuroprotection, having anti-oxidative and antiapoptotic properties. PrP^c might also play a role in synaptic activity or neuronal excitability, and neuron axonal or dendritic migration (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008). In fact, the first evidence obtained in the search for a physiological function of PrP^c suggested that PrP^c could be involved in neuroprotection against oxidative stress (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008). Although the mechanisms have not been elucidated, higher levels of oxidative damage to proteins and lipids have been identified in the brain tissue of PrP^c knockout mice (Brown et al., 2002; Klamt et al., 2001). In turn, the main evidence supporting the antiapoptotic functions of PrP^c came from studies showing that cellular

overexpression of PrP^c made cells more resistant to apoptotic stimuli by TNF-alpha and to Bax-mediated pro-apoptotic stimuli (Bounhar et al., 2001; Bounhar et al., 2006; Diarra-Mehrpour et al., 2004; Roucou et al., 2004; Roucou and LeBlanc, 2005). Also, mice lacking PrP^c had enhanced post-ischemic caspase-3 activation pathways, a finding possibly suggesting that PrP^c might be neuroproctetive after ischemic injury (Spudich et al., 2005; Weise et al., 2004; Weise et al., 2006; Weise et al., 2008). In acute stroke, PrP^c increases in the surviving neurons of the peri-infarcted region 1 to 48 hour after ischemic injury, while dying neurons show no PrP^c staining. In agreement with a neuroportective role of PrPc some authors have reported that PrPc overexpression protects against ischemic injury in animal models of stroke. (Mitsios et al., 2007; Shyu et al., 2005) Overexpression of PrP^c in vulnerable hippocampal regions was also observed in a model of traumatic brain injury (Marciano et al., 2004) and during neurodegenerative disorders (Voigtlander et al., 2001). Taken together, these results suggest that up-regulation of PrP^c might be a consequence of cell damage and might be related to neuroprotective cellular mechanisms (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008; Marciano et al., 2004; Martins et al., 2002; Voigtlander et al., 2001). Interestingly, in our experiment we observed increased PrP^c expression during the acute phases of SE in the CA1 and CA3 regions, both well known brain areas vulnerable to cell damage in the PMTLE. (Cavalheiro et al., 1991; Loscher, 2002; Sharma et al., 2007) Our results agree with studies showing an increase of PrP^c in brain lesional areas after stroke (Mitsios et al., 2007; Shyu et al., 2005), in neurodegenerative diseases (Voigtlander et al., 2001), or in traumatic brain injury (Marciano et al., 2004). Like other authors, we are tempted to suggest that PrP^c overexpression in CA1 or CA3 might be related to the activation of neuroprotective

mechanims in vulnerable hippocampal areas during the acute phase of PMTLE.

In chronic animals we observed that PrP^c was expressed co-localized with mossy fiber sprouting. The sprouting of glutamatergic granule cell axons or mossy fibers is the most widely studied aspect of axonal plasticity in epilepsy (Leite et al., 2002; Leite et al., 2005; Pitkanen and Lukasiuk, 2009). Our finding might suggest that, during the more chronic phases of the pilocarpine model, PrP^c expression might be related to synaptic formation, homeostasis of mossy fibers, or even neuronal excitability. Recent evidence has suggested that PrP^c influences cell signaling mechanisms, neuronal survival and differentiation, perhaps modulating neurotrophic activity (Aguzzi et al., 2008a; Aguzzi et al., 2008b; Collinge, 2001; Linden et al., 2008; Martins et al., 2009). PrP^c has been shown to bind laminin receptors (Gauczynski et al., 2001; Hundt et al., 2001), to promote neuritogenesis through its interaction with neural cell adhesion molecules (Santuccione et al., 2005), and to induce neurite maintenance and neural differentiation by binding to the extracellular matrix protein laminin (Graner et al., 2000a; Graner et al., 2000b). More recently, PrP^c was also shown to bind to vitronectin with high affinity (Hajj et al., 2007). Taken together, these findings suggest that PrP^c might act as a wide-range cell surface receptor, capable of binding numerous extracellular matrix proteins. Because of these observations, some authors have proposed that PrP^c might have pleiotropic functions that depend upon its cellular expression, as well as the contextual cellular milieu (Hajj et al., 2007). According to these authors, PrP^c might participate in a multi-protein complex and its neurobiological effect may depend on the affinity and accessibility of each member of the complex (Hajj et al., 2007; Hajj et al., 2009). For example, PrP^c might interact with both stress-inducible protein 1 (STI1) or vitronectin depending on the local levels of these proteins and their availability. Evidence

supports the concept that PrP^c-STI1 seems to provide neuroprotection against cell death and neuritogenesis in the hippocampus (Hajj et al., 2007; Hajj et al., 2009). In turn, PrP^c-vitronectin engagement might promote axonal growth in cultured dorsal root ganglia neurons (Hajj et al., 2007; Hajj et al., 2009). These observations agree with our findings suggesting that PrP^c might be involved in both neuroprotection and axonal growth and sprouting. Heck et al. (Heck et al., 2004) investigated the regulation of extracellular matrix molecules in granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis and observed up-regulation of phosphacan, tenascin-C, and HNK-1, but not of laminin or fibronectin (Heck et al., 2004). Thus, it is possible that PrP^c might interact with other not yet identified extracellular matrix proteins, an interesting hypothesis that might deserve future investigation. Finally, the finding of PrP^c expression in the mossy fiber sprouting region might be related to the involvement of PrP^c in neuroprotection or neuronal excitability. The presence of PrP^c in both pre- and post-synaptic structures suggests that PrP^c might play a role in neuronal communication (Linden et al., 2008). A functional role of PrP^c in synapses was suggested on the basis of the ability of PrP^c to bind copper (Linden et al., 2008). Some authors have proposed that presynaptic PrP^c may buffer Cu^{+2} levels in the synaptic cleft and ensure its transport back to the presynaptic cytosol. This would protect synapses against free radicals and would also have a role in calcium homeostasis (Brown et al., 1997; Kardos et al., 1989; Linden et al., 2008; Vassallo and Herms, 2003). PrP^c is also described as a Zn^{+2} binding protein (Brown and Harris, 2003; Choi et al., 2006), being perhaps more expressed in gluzinergic synaptic neurons (co-expressing glutamate and zinc neurons) (Brown and Harris, 2003; Choi et al., 2006). Zinc is released in synaptic vesicles with glutamate and modulates glutamatergic neurotransmission. In the brain, the highest amount of zinc

detected by Timm staining is in the mossy fiber system in the hippocampus (Mitsuya et al., 2009). Quantitative Timm-stained electron microscopy of mossy fiber reorganization in MTLE-HS revealed large, zinc-labeled vesicles on dendrites in the inner molecular and granule cell layers. These finding might suggest a role of zinc and perhaps of PrP^c in mossy fiber reactive synaptogenesis. Thus, the observation of PrP^c co-localized with mossy fiber sprouting is compatible with physiological views that PrP^c might be involved in neuroprotection, anti-oxidative properties, neuronal re-organization, synaptic activity or neuronal excitability.

In conclusion, we observed here that PrP^c is differentially expressed in the hippocampus in the the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Our findings might be compatible with putative physiological roles for PrP^c. Moreover, as a corollary of our observations we suggest that PMTLE might be an interesting model for the simultaneous study of the multiple possible roles of PrP^c in the brain.

REFERENCES

Aguzzi, A., Baumann, F., Bremer, J., 2008a. The prion's elusive reason for being. Annu Rev Neurosci. 31, 439-77.

Aguzzi, A., Sigurdson, C., Heikenwaelder, M., 2008b. Molecular mechanisms of prion pathogenesis. Annu Rev Pathol. 3, 11-40.

Amaral, D.G., Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience. 31, 571-91.

Andermann, F., Kobayashi, E., Andermann, E., 2005. Genetic focal epilepsies: state of the art and paths to the future. Epilepsia. 46 Suppl 10, 61-7.

Babb, T.L., Brown, W.J., Pretorius, J., Davenport, C., Lieb, J.P., Crandall, P.H., 1984a. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. Epilepsia. 25, 729-40.

Babb, T.L., Lieb, J.P., Brown, W.J., Pretorius, J., Crandall, P.H., 1984b. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. Epilepsia. 25, 721-8.

Baulac, S., Gourfinkel-An, I., Nabbout, R., Huberfeld, G., Serratosa, J., Leguern, E., Baulac, M., 2004. Fever, genes, and epilepsy. Lancet Neurol. 3, 421-30.

Bianchin, M.M., Walz, R., Brentani, R.R., Martins, V.R., 2005. Dilated cardiomyopathy and Creutzfeldt-Jakob disease: evidence for a role of cellular prion protein in the heart? Arch Intern Med. 165, 1663-4.

Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G., LeBlanc, A., 2001. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. J Biol Chem. 276, 39145-9.

Bounhar, Y., Mann, K.K., Roucou, X., LeBlanc, A.C., 2006. Prion protein prevents Bax-mediated cell death in the absence of other Bcl-2 family members in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res. 6, 1204-12.

Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H., 1997. The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature. 390, 684-7.

Brown, D.R., 2001. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. Trends Neurosci. 24, 85-90.

Brown, D.R., Nicholas, R.S., Canevari, L., 2002. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. J Neurosci Res. 67, 211-24.

Brown, L.R., Harris, D.A., 2003. Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. J Neurochem. 87, 353-63.

Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C., 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature. 356, 577-82.

Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Ikonomidou, C., Turski, L., 1991. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. Epilepsia. 32, 778-82.

Chiarini, L.B., Freitas, A.R., Zanata, S.M., Brentani, R.R., Martins, V.R., Linden, R., 2002. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. EMBO J. 21, 3317-26.

Choi, C.J., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G., 2006. Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases. Neurotoxicology. 27, 777-87.

Colling, S.B., Khana, M., Collinge, J., Jefferys, J.G., 1997. Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. Brain Res. 755, 28-35.

Collinge, J., 2001. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. Annu Rev Neurosci. 24, 519-50.

Derrington, E.A., Darlix, J.L., 2002. The Enigmatic Multifunctionality of the Prion Protein. Drug News Perspect. 15, 206-219.

Diarra-Mehrpour, M., Arrabal, S., Jalil, A., Pinson, X., Gaudin, C., Pietu, G., Pitaval, A., Ripoche, H., Eloit, M., Dormont, D., Chouaib, S., 2004. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. Cancer Res. 64, 719-27.

Engel, J., Jr., 1996. Surgery for seizures. N Engl J Med. 334, 647-52.

Engel, J., Jr., 2001. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? Neuroscientist. 7, 340-52.

Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I., Weiss, S., 2001. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. EMBO J. 20, 5863-75.

Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V.R., Brentani, R.R., 2000a. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. Brain Res Mol Brain Res. 76, 85-92.

Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Martins, V.R., Jay, D.G., Brentani, R.R., 2000b. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. FEBS Lett. 482, 257-60.

Hajj, G.N., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Veiga, S.S., da Silveira, R.B., Santos, T.G., Ribeiro, K.C., Juliano, M.A., Jacchieri, S.G., Zanata, S.M., Martins, V.R., 2007. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. J Cell Sci. 120, 1915-26.

Hajj, G.N., Santos, T.G., Cook, Z.S., Martins, V.R., 2009. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. J Comp Neurol. 517, 371-84.

Heck, N., Garwood, J., Loeffler, J.P., Larmet, Y., Faissner, A., 2004. Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience. 129, 309-24.

Hundt, C., Peyrin, J.M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M.L., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I., Weiss, S., 2001. Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. EMBO J. 20, 5876-86.

Kardos, J., Kovacs, I., Hajos, F., Kalman, M., Simonyi, M., 1989. Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. Neurosci Lett. 103, 139-44.

Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Conte da Frota, M.L., Jr., Walz, R., Andrades, M.E., da Silva, E.G., Brentani, R.R., Izquierdo, I., Fonseca Moreira, J.C., 2001. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. Free Radic Biol Med. 30, 1137-44.

Leite, J.P., Garcia-Cairasco, N., Cavalheiro, E.A., 2002. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. Epilepsy Res. 50, 93-103.

Leite, J.P., Neder, L., Arisi, G.M., Carlotti, C.G., Jr., Assirati, J.A., Moreira, J.E., 2005. Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data? Epilepsia. 46 Suppl 5, 134-41.

Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I., Brentani, R.R., 2008. Physiology of the prion protein. Physiol Rev. 88, 673-728.

Lobao-Soares, B., Bianchin, M.M., Linhares, M.N., Carqueja, C.L., Tasca, C.I., Souza, M., Marques, W., Jr., Brentani, R., Martins, V.R., Sakamoto, A.C., Carlotti, C.G., Jr., Walz, R., 2005. Normal brain mitochondrial respiration in adult mice lacking cellular prion protein. Neurosci Lett. 375, 203-6.

Lobao-Soares, B., Walz, R., Prediger, R.D., Freitas, R.L., Calvo, F., Bianchin, M.M., Leite, J.P., Landemberger, M.C., Coimbra, N.C., 2008. Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake Oxyrhopus guibei. Behav Brain Res. 194, 129-37.

Loscher, W., 2002. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 50, 105-23.

Marciano, P.G., Brettschneider, J., Manduchi, E., Davis, J.E., Eastman, S., Raghupathi, R., Saatman, K.E., Speed, T.P., Stoeckert, C.J., Jr., Eberwine, J.H., McIntosh, T.K., 2004. Neuron-specific mRNA complexity responses during hippocampal apoptosis after traumatic brain injury. J Neurosci. 24, 2866-76.

Martins, V.R., Linden, R., Prado, M.A., Walz, R., Sakamoto, A.C., Izquierdo, I., Brentani, R.R., 2002. Cellular prion protein: on the road for functions. FEBS Lett. 512, 25-8.

Martins, V.R., Beraldo, F.H., Hajj, G.N., Lopes, M.H., Lee, K.S., Prado, M.M., Linden, R., 2009. Prion Protein: Orchestrating Neurotrophic Activities. Curr Issues Mol Biol. 12, 63-86.

Mathern, G.W., Babb, T.L., Pretorius, J.K., Leite, J.P., 1995a. Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. J Neurosci. 15, 3990-4004.

Mathern, G.W., Babb, T.L., Vickrey, B.G., Melendez, M., Pretorius, J.K., 1995b. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. Brain. 118 (Pt 1), 105-18.

Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Babb, T.L., 1995c. Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. J Neurosurg. 82, 211-9.

Mathern, G.W., Babb, T.L., Mischel, P.S., Vinters, H.V., Pretorius, J.K., Leite, J.P., Peacock, W.J., 1996. Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fibre synaptic reorganization. Brain. 119 (Pt 3), 965-87.

Mathern, G.W., Kuhlman, P.A., Mendoza, D., Pretorius, J.K., 1997. Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. J Neuropathol Exp Neurol. 56, 199-212.

Mathern, G.W., Adelson, P.D., Cahan, L.D., Leite, J.P., 2002. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. Prog Brain Res. 135, 237-51.

Mello, L.E., Cavalheiro, E.A., Tan, A.M., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Babb, T.L., Finch, D.M., 1993. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. Epilepsia. 34, 985-95.

Mitsios, N., Saka, M., Krupinski, J., Pennucci, R., Sanfeliu, C., Miguel Turu, M., Gaffney, J., Kumar, P., Kumar, S., Sullivan, M., Slevin, M., 2007. Cellular prion protein is increased in the plasma and peri-infarcted brain tissue after acute stroke. J Neurosci Res. 85, 602-11.

Mitsuya, K., Nitta, N., Suzuki, F., 2009. Persistent zinc depletion in the mossy fiber terminals in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia. 50, 1979-90.

Nico, P.B., de-Paris, F., Vinade, E.R., Amaral, O.B., Rockenbach, I., Soares, B.L., Guarnieri, R., Wichert-Ana, L., Calvo, F., Walz, R., Izquierdo, I., Sakamoto, A.C., Brentani, R., Martins, V.R., Bianchin, M.M., 2005. Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein. Behav Brain Res. 162, 173-81.

Pitkanen, A., Lukasiuk, K., 2009. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. Epilepsy Behav. 14 Suppl 1, 16-25.

Rangel, A., Burgaya, F., Gavin, R., Soriano, E., Aguzzi, A., Del Rio, J.A., 2007. Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. J Neurosci Res. 85, 2741-55.

Rangel, A., Madronal, N., Gruart i Masso, A., Gavin, R., Llorens, F., Sumoy, L., Torres, J.M., Delgado-Garcia, J.M., Del Rio, J.A., 2009. Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. PLoS One. 4, e7592.

Roucou, X., Gains, M., LeBlanc, A.C., 2004. Neuroprotective functions of prion protein. J Neurosci Res. 75, 153-61.

Roucou, X., LeBlanc, A.C., 2005. Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. J Mol Med. 83, 3-11.

Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., Schachner, M., 2005. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. J Cell Biol. 169, 341-54.

Scorza, F.A., Arida, R.M., Naffah-Mazzacoratti Mda, G., Scerni, D.A., Calderazzo, L., Cavalheiro, E.A., 2009. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? An Acad Bras Cienc. 81, 345-65.

Sharma, A.K., Reams, R.Y., Jordan, W.H., Miller, M.A., Thacker, H.L., Snyder, P.W., 2007. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. Toxicol Pathol. 35, 984-99.

Shyu, W.C., Lin, S.Z., Chiang, M.F., Ding, D.C., Li, K.W., Chen, S.F., Yang, H.I., Li, H., 2005. Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. J Neurosci. 25, 8967-77.

Spudich, A., Frigg, R., Kilic, E., Kilic, U., Oesch, B., Raeber, A., Bassetti, C.L., Hermann, D.M., 2005. Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. Neurobiol Dis. 20, 442-9.

Thais, M.E., Carqueja, C.L., Santos, T.G., Silva, R.V., Stroeh, E., Machado, R.S., Wahlheim, D.O., Bianchin, M.M., Sakamoto, A.C., Brentani, R.R., Martins, V.R., Walz, R., Tasca, C.I., 2006. Synaptosomal glutamate release and uptake in mice lacking the cellular prion protein. Brain Res. 1075, 13-9.

Tobler, I., Gaus, SE, Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., Manson, J.C., 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. Nature. 380, 639-42.

Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W.A., Bortolotto, Z.A., Cavalheiro, E.A., 1989. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. Synapse. 3, 154-71.

Vassallo, N., Herms, J., 2003. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. J Neurochem. 86, 538-44.

Voigtlander, T., Kloppel, S., Birner, P., Jarius, C., Flicker, H., Verghese-Nikolakaki, S., Sklaviadis, T., Guentchev, M., Budka, H., 2001. Marked increase of neuronal prion protein immunoreactivity in Alzheimer's disease and human prion diseases. Acta Neuropathol. 101, 417-23.

Walz, R., Amaral, O.B., Rockenbach, I.C., Roesler, R., Izquierdo, I., Cavalheiro, E.A., Martins, V.R., Brentani, R.R., 1999. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. Epilepsia. 40, 1679-82.

Weise, J., Crome, O., Sandau, R., Schulz-Schaeffer, W., Bahr, M., Zerr, I., 2004. Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. Neurosci Lett. 372, 146-50.

Weise, J., Sandau, R., Schwarting, S., Crome, O., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Bahr, M., 2006. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt

activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. Stroke. 37, 1296-300.

Weise, J., Doeppner, T.R., Muller, T., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Witte, O.W., Bahr, M., 2008. Overexpression of cellular prion protein alters postischemic Erk1/2 phosphorylation but not Akt phosphorylation and protects against focal cerebral ischemia. Restor Neurol Neurosci. 26, 57-64.

Wichert-Ana, L., Velasco, T.R., Terra-Bustamante, V.C., Alexandre, V., Jr., Walz, R., Bianchin, M.M., Leite, J.P., Assirati, J.A., Carlotti, C.G., Araujo, D., Santos, A.C., Takayanagui, O.M., Sakamoto, A.C., 2004. Surgical treatment for mesial temporal lobe epilepsy in the presence of massive calcified neurocysticercosis. Arch Neurol. 61, 1117-9.

Wu, J.Y., Sutherling, W.W., Koh, S., Salamon, N., Jonas, R., Yudovin, S., Sankar, R., Shields, W.D., Mathern, G.W., 2006. Magnetic source imaging localizes epileptogenic zone in children with tuberous sclerosis complex. Neurology. 66, 1270-2.

Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R., Cabral, A.L., Lee, K.S., Juliano, M.A., de Oliveira, E., Jachieri, S.G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R.R., Martins, V.R., 2002. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. EMBO J. 21, 3307-16.

Figure and Legends

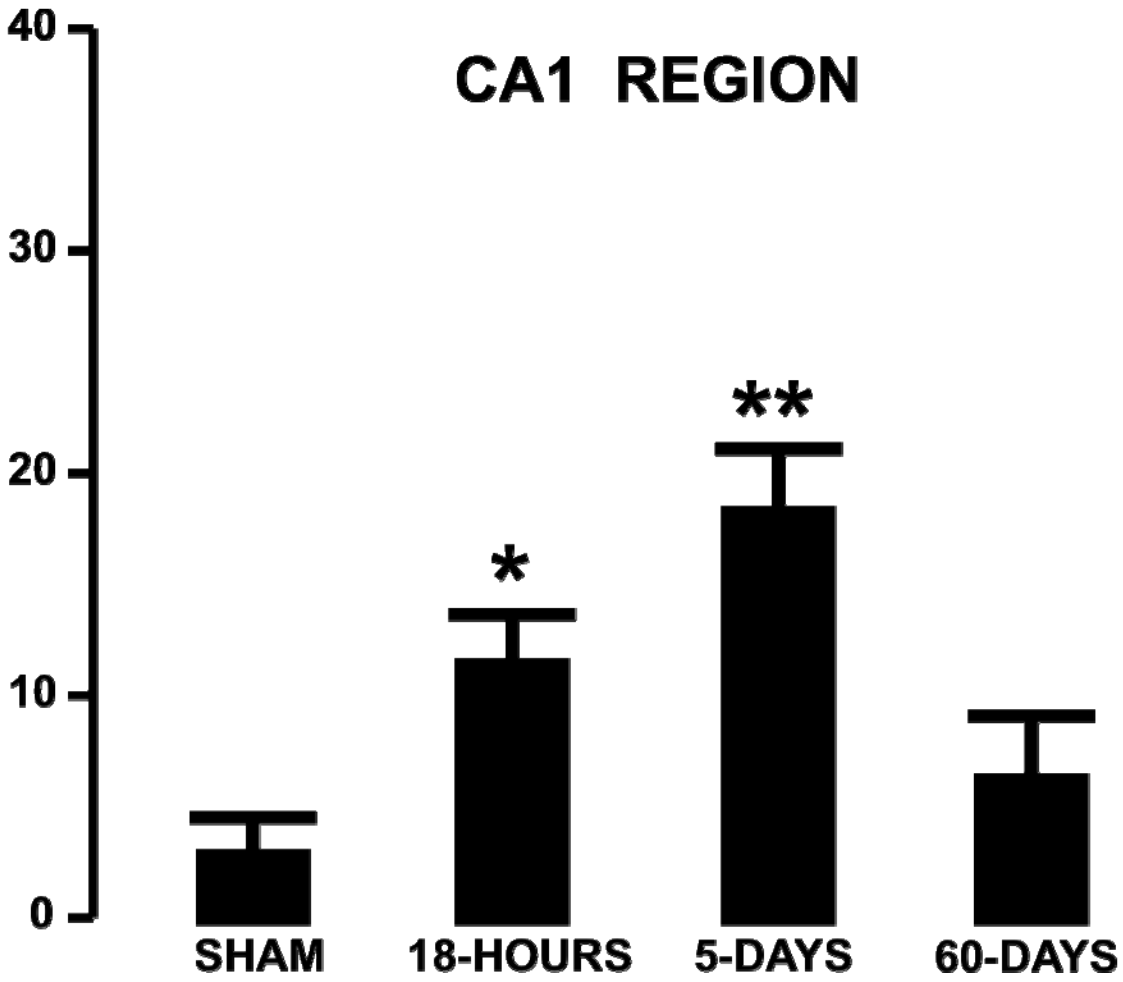

Figure 1. Cellular prion protein expression in the CA1 hippocampal region after induction of status epilepticus. There was an increased of PrP^c expression in CA1 18 hours after the beginning status epilepticus (18-hour group, p=0.019) and five days after the beginning of status epilepticus (5-day group, p<0.0001) compared to the sham control group.

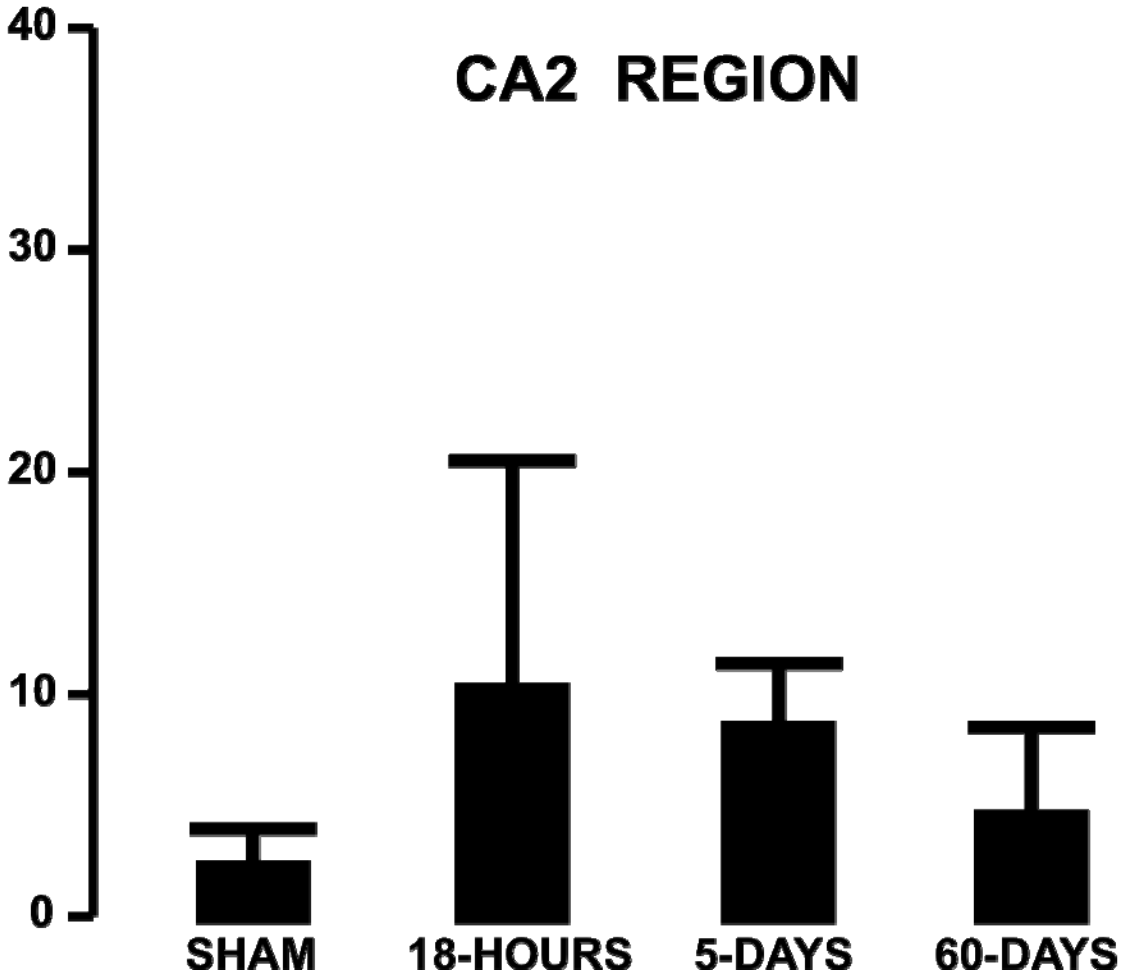

Figure 2. Cellular prion protein expression in the CA2 hippocampal region after induction of status epilepticus. There was no increase of PrPc expression in CA2 any time after status epilepticus.

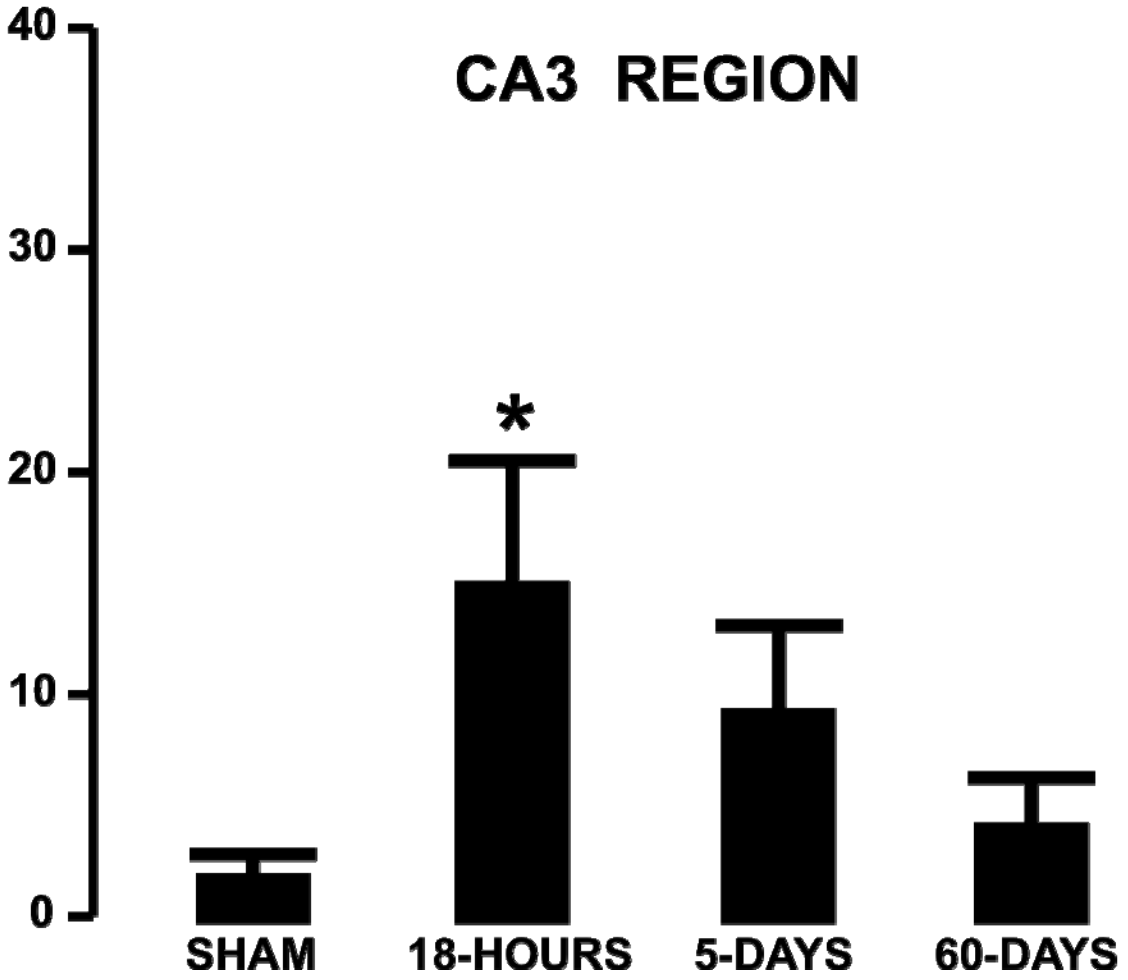

Figure 3. Cellular prion protein expression in the CA3 hippocampal region after induction of status epilepticus. There was an increased of PrP^c expression in CA3 18 hours after the beginning status epilepticus (18-hour group, p=0.004) when compared to the respective control sham-group.

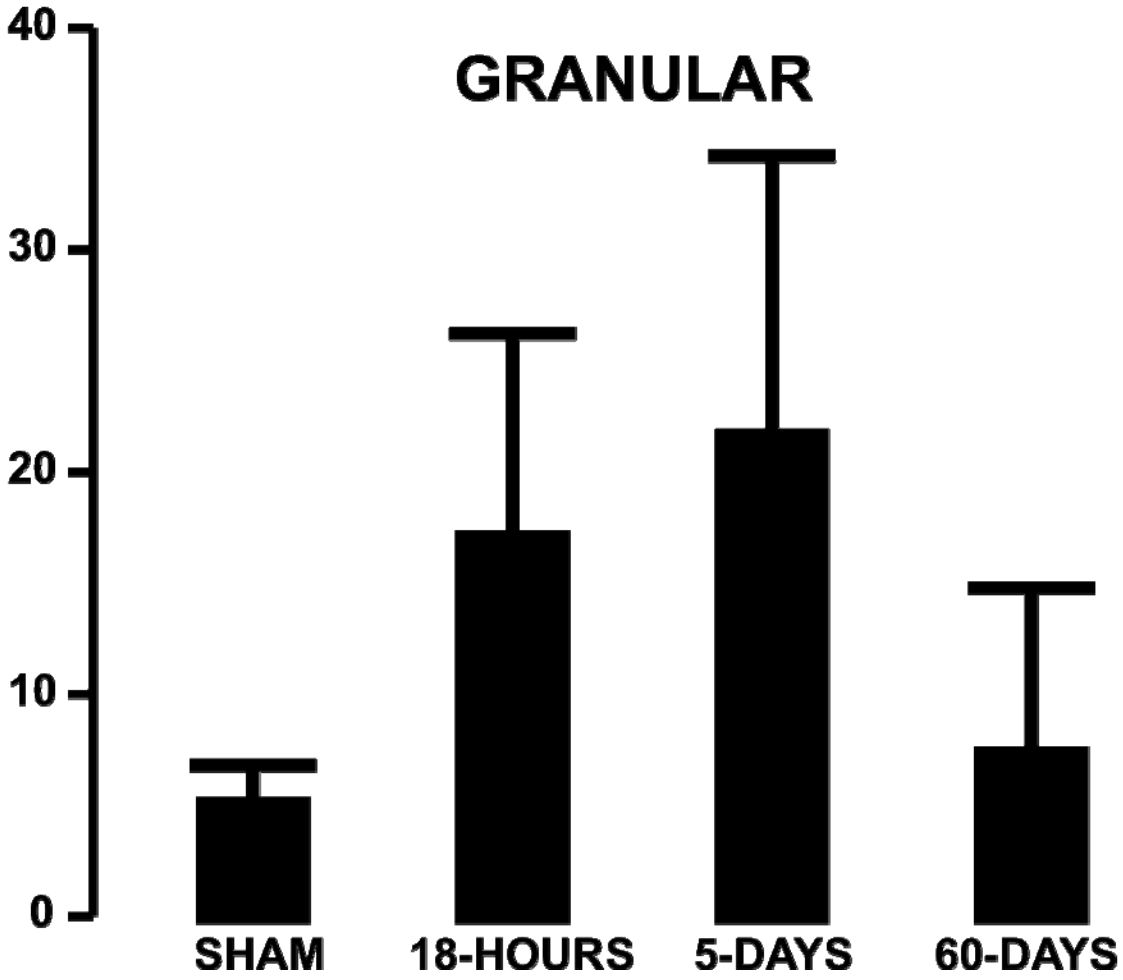

Figure 4. Cellular prion protein expression in the hippocampal granular region after induction of status epilepticus. There was no increase of PrP^c expression in the granular region of the hippocampus any time after status epilepticus.

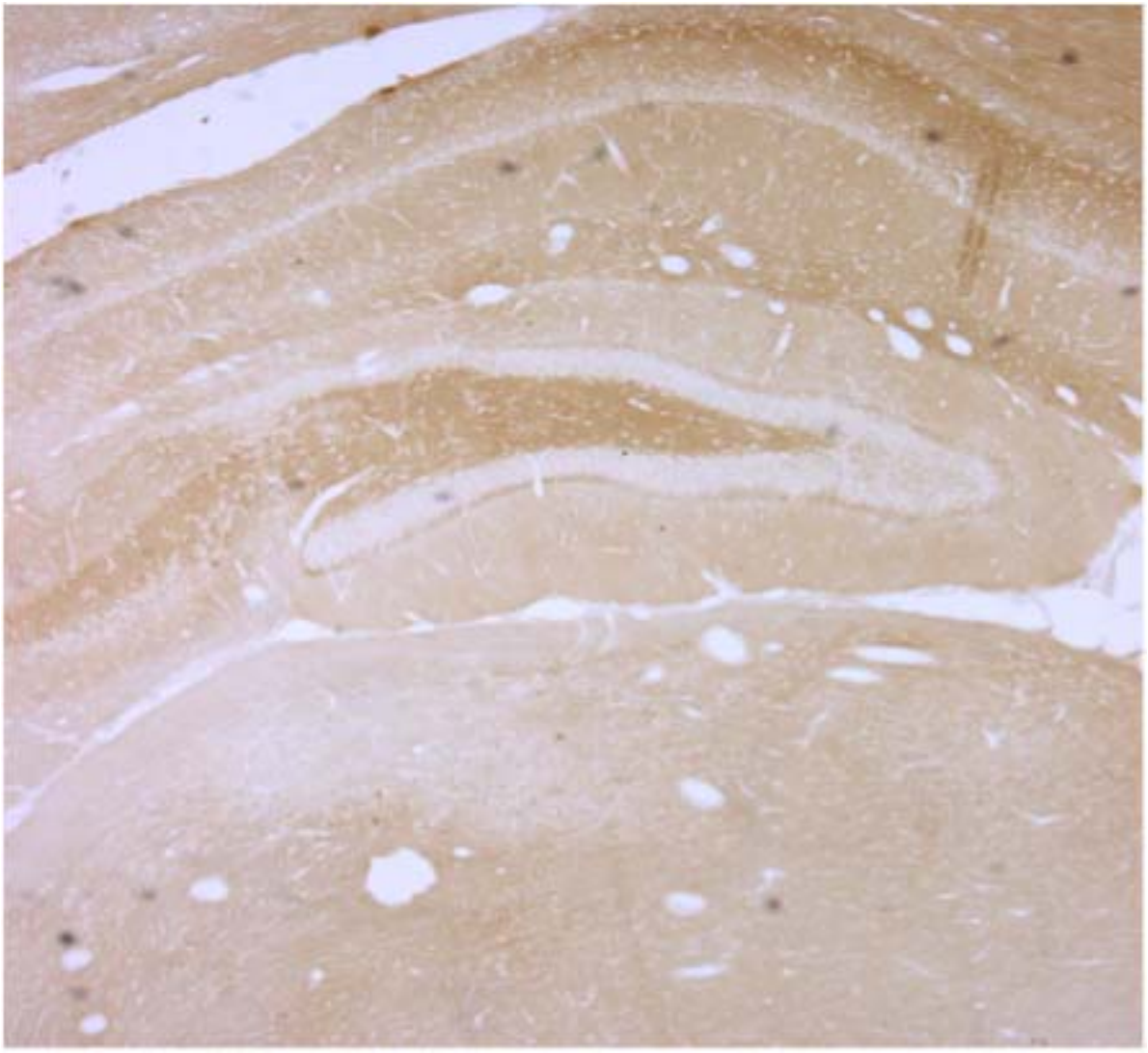

Figure 5. In the 2 month chronic group, PrP^c was observed to be overexpressed in mossy fiber sprouting region.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, nós observamos um aumento na expressão de PrP^c em diferentes regiões do cérebro em diferentes tempos após o início do estado de mal epiléptico em ratos submetidos ao modelo de epilepsia de lobo temporal por pilocarpina. A expressão de PrP^c aumentou nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, 18 horas após a injeção de pilocarpina e persistiu elevada em CA1 no quinto dia após a injeção. Nas regiões CA2 e granular do hipocampo, não observamos diferenças significativas na expressão de PrP^c durante a fase aguda do MELTP. No grupo crônico, a PrP^c estava expressa na mesma localização em que se observou o brotamento de fibras musgosas.

As funções fisiológicas da PrP^c continuam desconhecidas. Diversas linhas de pesquisa sugerem que a PrP^c possa estar envolvida com neuroproteção, tendo propriedades anti-oxidantes e antiapoptóticas. É possível, também, que a PrP^c tenha papel na atividade sináptica ou excitabilidade neuronal e na migração neuronal axonal ou dendrítica. As primeiras evidências sugeriram que a PrP^c poderia estar envolvida em neuroproteção contra o estresse oxidativo. Embora os mecanismos continuem desconhecidos, níveis mais elevados de dano oxidativo a proteínas e lipídeos foram identificados nos cérebros de ratos *knockout* para PrP^c. Nesse caso, a maioria das evidências que suportam as funções antiapoptóticas da PrP^c vem de de estudos que mostram que o aumento da expressão celular da proteína tornou as células mais resistentes ao estímulo apoptótico mediado pela via Bax ou por TNF-alfa. Além disso, ratos sem PrP^c tiveram aumento na ativação pós-isquêmica de caspase-3, uma achado que pode sugerir o envolvimento da PrP^c com neuroproteção após injúrias isquêmicas. No acidente vascular cerebral (AVC) agudo, a PrP^c aumenta nos neurônios sobreviventes das áreas marginais ao tecido

isquêmico em 1 a 48 horas após o dano. Já os neurônios em morte celular não expressam PrP^c. Alguns autores, ainda, reportaram que a superexpressão de PrP^c oferece proteção contra eventos isquêmicos, em modelos animais de AVC. Superexpressão de PrP^c em regiões vulneráveis do hipocampo também foi observada em modelo de trauma cerebral e em desordens degenerativas. Quando analisados em conjunto, esse resultados sugerem que a superregulação da PrP^c pode ser consequência do dano celular e pode estar relacionada com mecanismos celulares de neuroproteção. De forma bastante interessante, em nosso experimento, observamos aumento na expressão da PrP^c nas regiões CA1 e CA3 durante a fase aguda do EE, em áreas cerebrais vulneráveis a dano celular no MELTP. Nossos resultados estão de acordo com estudos que mostraram aumento de PrP^c em áreas cerebrais lesionadas pós-AVC, doenças neurodegerenativas ou injúria cerebral traumática. Assim como outros autores, sugerimos que a superexpressão PrP^c em CA1 e CA3 possa estar relacionada à ativação de mecanismos de neuroproteção em áreas vulneráveis do hipocampo durante a fase aguda do MELTP.

Nos animais do grupo crônico, observamos que a PrP^c foi expressa na mesma localização do brotamento de fibras musgosas. O surgimento de axônios de células granulares glutamatérgicos ou fibras musgosas é o mecanismo mais estudado para a plasticidade axonal na epilepsia. Nossos achados podem sugerir que, durante fases mais crônicas do modelo da pilocarpina, a expressão de PrP^c poderia estar relacionada a formação de sinapses , homeostase de fibras musgosas, ou mesmo a excitabilidade neuronal. Algumas evidências recentes tem sugerido que a PrP^c influencia mecanismos de sinalização celular, sobrevivência e diferenciação neuronal, possivelmente por modular a atividade neurotrófica. Foi demostrado que a PrP^c liga ao receptor de laminina, promovendo a neuritogênese através de sua

interação com NCAM e induz a manutenção dos neuritos e a diferenciação neural através da ligação à proteína da matriz extracelular laminina. Além disso, mais recentemente, foi sugerido que a PrP^c liga-se com alta afinidade à vitronectina. Esses resultados sugerem que a PrP^c pode atuar como um receptor celular de superfície de amplo espectro, capaz de ligar-se a inúmeras proteínas da matriz extracelular. Frente a essas observações, alguns autores tem proposto que a PrP^c poderia ter funções pleiotrópicos que dependem de sua expressão celular, bem como do ambiente celular. Para esses autores, é possivel que a PrP^c participe de um complexo multi-proteína, e seus efeitos neurobiológicos dependam da afinidade e da acessibilidade de cada membro do complexo. Por exemplo, a PrP^c poderia interagir tanto com a proteína de estresse induzida (STI1) quanto com a vitronectina, dependendo do nível local destas proteínas e sua disponibilidade. Evidências suportam a hipótese de que o complexo PrP^c-STI1 fornece neuroproteção contra a morte celular e neuritogênese no hipocampo. Por sua vez, a ligação PrP^c-vitronectina pode promover o crescimento axonal em neurônios dos gânglios da raiz dorsal, em meios de cultura. Essas observações estão de acordo com nossos resultados e sugerem que a PrP^c poderia estar envolvida tanto na neuroproteção quanto com crescimento axonal e brotação. Heck et al. investigaram a regulação molecular da matriz extracelular na dispersão de células granulares e no brotamento de fibras musgosas na epileptogênese. Esses autores observaram uma superregulação de phosphacan, tenascina-C e HNK-1, mas não de laminina e fibronectina. Assim, é possível que a PrP^c interaja com outros proteínas da matriz extracelular, ainda não identificadas, uma hipótese interessante para futuras investigações. Finalmente, a constatação da expressão de PrP^c na região dos brotamentos de fibras musgosas pode estar relacionado ao envolvimento de PrP^c

em neuroproteção ou excitabilidade neuronal. A presença de PrP^c em estruturas tanto pré- quanto pós-sinápticas sugere que a PrP^c possa desempenhar um papel na comunicação neuronal. Um papel funcional da PrP^c em sinapses foi sugerido com base na capacidade da PrP^c ligar ao cobre. Alguns autores propõem que a PrP^c pré-sináptica pode reduzir níveis de Cu^{+2} na fenda sináptica e garantir seu transporte de volta para o citosol pré-sináptico. Esse mecanismo visaria proteger as sinapses contra os radicais livres e também teria um papel na homeostase dos íons cálcio. A PrPc parece ligar-se, também, ao Zn^{+2}, sendo talvez mais expressa em sinapses de neurônios gluzinergicos (que co-expressam glutamato e zinco). O zinco é liberado em vesículas sinápticas com o glutamato e modula a neurotransmissão glutamatérgica. No cérebro, a maior quantidade de zinco detectado pela coloração de Timm está no sistema de fibras musgosas do hipocampo. A microscopia eletrônica quantitativa com coloração de Timm na reorganização das fibras musgosas no MELTP revelou grandes vesículas de zinco em dendritos no interior das camadas moleculares e celulares. Estes resultados podem sugerir um papel do zinco e, talvez, da PrP^c na sinaptogênese reativa de fibras musgosas. Assim, a co-localização da PrP^c com o brotamento de fibras musgosas é compatível com a idéia de que a PrP^c esteja envolvida com neuroproteção, propriedades anti-oxidantes, re-organização neuronal, atividade sináptica ou excitabilidade neuronal.

Para concluir, observamos que a PrP^c é diferencialmente expressa no hipocampo no modelo de epilepsia do lobo temporal por pilocarpina. Nossos achados podem ser compatíveis com funções fisiológicas propostas para a proteína príon celular. Além disso, como complemento a nossas observações, sugerimos que o MELTP pode ser um modelo interessante para estudar simultaneamente os múltiplos papéis possíveis da PrP^c no cérebro.