

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamentos de Bioquímica e Ciências Morfológicas

EFEITOS DO TRATAMENTO COM CLORETO DE LÍTIO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO HIPOCAMPO DE ANIMAIS IMATUROS:
ESTUDO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS DE
ASTRÓCITOS.

PAULA CILENE PEREIRA DOS SANTOS

Orientadoras: MATILDE ACHAVAL ELENA
ELIZABETE ROCHA DA ROCHA

Dissertação de mestrado do curso de Pós-graduação em Bioquímica - UFRGS.

Porto Alegre, agosto de 1998.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais por todo apoio, compreensão e carinho.

Agradeço com muito carinho à Matilde pela seriedade, competência e amizade com que me orientou.

Um agradecimento especial à Beti pela confiança, amizade, dedicação e carinho não só na orientação deste trabalho, mas em todos os momentos.

Ao Günther, mais do que um bolsista, um verdadeiro “anjo da guarda”.

Ao Fabiano pela dedicação e carinho.

À Lauren, pela grande ajuda e por ter se tornado uma amiga fiel para todas as horas.

À Trícia, amiga e companheira de tanto tempo e de tantas “crises”.

Às colegas e amigas do laboratório de Bioquímica Simone, Juliana, Clarissa pelo carinho e apoio em todos os momentos.

À Cecília, Gissele e Silvana, por toda ajuda.

Aos demais integrantes do grupo FPC pelo ótimo ambiente de trabalho e pelo carinho; aos professores do grupo, pelo incentivo.

Ao grupo do laboratório de histofisiologia pela alegria, amizade e colaboração.

À Carmen Pilla, do Hospital de Clínicas, pela dosagem da litemia dos animais.

Aos funcionários do departamento e do ratário da Bioquímica.

A todos que de uma forma ou de outra me ajudaram a concretizar esse trabalho.

RESUMO

O lítio é a única droga com valor terapêutico e profilático no tratamento de doenças psiquiátricas, especialmente mania, ambas as fases maníaca e depressiva da doença bipolar e nos episódios recorrentes de depressão. Apesar da sua eficácia, seu sítio de ação e possíveis efeitos neurotóxicos não foram bem esclarecidos. Foi demonstrado que o tratamento de ratos adultos com cloreto de lítio (LiCl), seguindo um protocolo que produz litemia comparável à usada clinicamente em humanos, resulta em um aumento de 35% na imunorreatividade e no estado de fosforilação de uma proteína marcadora de astrócitos, proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em hipocampo (ROCHA & RODNIGHT, 1994). Com estudos morfológicos, observou-se que os astrócitos hipocampais desses animais tratados sofriam hipertrofia e mudança no direcionamento de seus prolongamentos, caracterizando uma gliose reativa (ROCHA, 1996; SANTOS, 1996). O tratamento crônico de fêmeas com LiCl antes e durante a prenhez, e na lactação, provocou uma diminuição do imunoconteúdo de GFAP de 53 % no hipocampo de ratos com 15 dias, nascidos dessas fêmeas (ROCHA, 1996; SANTOS, 1996).

O presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito da exposição pré- e pós-natal ao LiCl sobre o hipocampo de ratos imaturos, no 15º dia pós-natal, levando em consideração parâmetros morfológicos e neuroquímicos, em uma tentativa de caracterizar os efeitos do lítio sobre o cérebro em desenvolvimento.

Após o tratamento crônico, a litemia das fêmeas tratadas ficou dentro da faixa terapêutica para humanos, entre 0,4 - 1,2 mEq/L, e a concentração de lítio no plasma dos animais imaturos teve uma média de 0,4 mEq/L (níveis terapêuticos para humanos). Isso comprova que o íon passou através do leite da mãe para os filhotes.

Os resultados obtidos no estudo morfológico do hipocampo dos animais imaturos, mostraram uma diminuição na imunorreatividade à GFAP, o que está de acordo com a diminuição na quantidade de GFAP-IR observada anteriormente por *Rocha* (1996). Através de análise neuroquímica observamos um aumento do imunoconteúdo de vimentina em fatias de hipocampo dos animais tratados. Ocorreu um aumento em relação ao controle, de células vimentina-positivas no hipocampo de animais jovens tratados, que corresponde à glia radial VIM-positiva. A análise das lâminas histológicas mostrou um maior número de glias radiais no giro denteado do hipocampo dos animais tratados em relação aos animais controles. O conjunto destes resultados sugerem que o tratamento com LiCl causou um atraso no desenvolvimento cerebral, pelo retardo da transformação da glia radial para astrócitos. Uma vez que a glia radial persiste por um tempo maior no hipocampo desses animais, a diferenciação da mesma para astrócitos pode estar prejudicada, mostrando um atraso no desenvolvimento astrogial nesta fase de maturidade neural que, devido à importância dos astrócitos na sinaptogênese, poderá afetar de maneira mais profunda o desenvolvimento geral do sistema nervoso central (SNC).

Este trabalho possui relevância clínica, uma vez que muitas mulheres recebem tratamento com sais de lítio.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. LÍCIO	1
2. ASTRÓCITOS	7
2.1 Aspectos Morfológicos	7
2.2 Aspectos Ultraestruturais dos Astrócitos	11
2.3 Funções	13
2.4 Filamentos Intermediários	16
3. EXEMPLOS DE GLIOSE	19
4. INTERRELAÇÃO NEURÔNIO - GLIA	22
5. HIPOCAMPO	24
5.1 Morfogênese	26
5.2 Astrócitos Hipocampais	32
OBJETIVOS	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
1. MATERIAL	35
1.2 Tratamento	35
1.3 Histologia	35
1.4 Aparelhos	37
2. MÉTODOS	37
2.1 Animais	37
2.2 Histologia	38
2.2.1 Procedimento Imunocitoquímico	38
2.3 Procedimento neuroquímico	40
2.3.1 Imunodeteccção da Vimentina	40
RESULTADOS	42
1. ANIMAIS CONTROLES	44
1.1 GFAP	44
1.2 Vimentina	44
2. ANIMAIS TRATADOS	45
2.1 GFAP	45
2.2 Vimentina	45
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	62
PERSPECTIVAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação ilustrativa de DOT-immunobinding de ratos imaturos, com 15 dias de idade. A: os DOTs representam VIM-IR; C1 e C2: fatias de dois animais controle diferentes; T1, T2 e T3: fatias de 3 animais tratados diferentes em duplicata. B: os DOTs representam GFAP-IR; CONTROLE: fatias de 2 animais diferentes em triplicata; LÍTIO: fatias de 2 animais diferentes em triplicata (ROCHA, 1996). _____ 43
- Figura 2:** Fotomicrografias da região CA1 e giro denteado do hipocampo de ratos imaturos, com 15 dias (imunotincção para GFAP). A: animal controle, observar uma maior imunomarcção nos astrócitos GFAP-positivos dos estratos radiatum (R) e lacunoso- molecular (LM) da região CA1. Os processos astrocíticos da camada granulosa (G) do giro denteado apresentam uma orientação perpendicular à superfície dorsal do hipocampo. O hilo (H) apresenta uma maior imunomarcção para GFAP, com células mostrando um aspecto estrelado. B: animal tratado, notar uma diminuição na imunorreatividade à GFAP nas camadas radiatum (R) e lacunoso- molecular (LM) da região CA1. Não se observa mudança no direcionamento dos processos astrocíticos na camada granulosa (G) do giro denteado, porém há uma menor quantidade de células GFAP-IR no hilo (H). 1: região CA1; 2: giro denteado; O: estrato oriens; P: estrato piramidal; R: estrato radiatum; LM: estrato lacunoso-molecular; M: camada molecular; G: camada granulosa; H: hilo. Barras A e B= 100 μ m. _____ 46
- Figura 3** _____ 47
- Figura 4:** Desenho obtido através de câmara lúcida de cortes de hipocampo marcados com GFAP, mostrando astrócitos da região CA1 e giro denteado. A: animal controle, os astrócitos apresentam maior imunorreatividade nos estratos radiatum (R; seta) e lacunoso-molecular (LM; cabeça de seta). O hilo (H) apresenta forte imunorreatividade para GFAP, com células com aspecto estrelado (asterisco). B: animal tratado, apresenta menor imunomarcção para GFAP nos estratos radiatum (R; seta) e lacunoso- molecular (LM; cabeça de seta) da região CA1, bem como no hilo (H; asterisco) do giro denteado. O: estrato oriens; P: estrato piramidal; R: estrato radiatum; LM: estrato lacunoso-molecular; M: camada molecular; G: camada granulosa; H: hilo. Barras A e B= 50 μ m. _____ 48
- Figura 5** _____ 49
- Figura 6** _____ 50
- Figura 7:** Desenho obtido através de câmara lúcida de cortes de hipocampo marcados com vimentina, mostrando astrócitos da camada lacunoso- molecular (LM) da região CA1 e giro denteado. A: animal controle, as células apresentam pouca imunomarcção na camada granulosa (G; seta longa) e no hilo (H; cabeça de seta) do giro dentado. Notar vasos imunomarcados no estrato lacunoso-molecular (LM; seta curta) da região CA1. B: animal tratado, maior número de glias radiais em forma de candelabro na camada

granulosa (G; seta longa) do giro denteado. No hilo (H; cabeça de seta) os astrócitos imaturos apresentam forte imunorreatividade para vimentina. Na camada lacunoso-molecular (LM) da região CA1, observar a imunomarcção dos vasos (seta curta). LM: estrato lacunoso-molecular; M: camada molecular; G: camada granulosa; H: hilo. Barras A e B= 50 μ m. __51

Figura 8: Fotomicrografias do giro denteado de animais imaturos marcados com vimentina. A: animal controle, observar a escassa presença de glias radiais em forma de candelabro na camada granulosa (G; seta). B: animal tratado, maior número de glias radiais em forma de candelabro imunomarcadas na camada granulosa (G; seta). G: camada granulosa; H: hilo. Barras A e B= 50 μ m. _____ 52

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC** - adenilato ciclase
- AMPC** - adenosina 3',5'- monofosfato cíclico
- ATPase** - adenosina trifosfatase
- DAB** - tetrahidrocloreto 3,3'- diaminobenzidina
- DAG** - diacilglicerol
- GFAP** - proteína glial fibrilar ácida
- GFAP-IR** - proteína glial fibrilar ácida imunorreativa
- H-E** - Hematoxilina - Eosina
- H₂O₂** - peróxido de hidrogênio
- IMPase** - inositol monofosfatase
- IP₃** - inositol trifosfato
- LiCl** - cloreto de lítio
- LTP** - "long-term potentiation"
- mGluR** - receptor metabotrópico
- NaCl** - cloreto de sódio
- NGF** - fator de crescimento neuronal
- PB** - tampão fosfato
- PBS** - tampão fosfato salino
- PIP₂** - fosfatidil-inositol-fosfato
- PKA** - proteína quinase dependente de AMPC
- PP** - via perforante
- SNC** - sistema nervoso central
- Tx** - Triton X-100
- VIM-IR** - vimentina imunorreativa

INTRODUÇÃO

1. LÍLIO

O lítio é um elemento da família dos metais, foi descoberto em 1817 e tem sido usado para tratar uma série de distúrbios somatopsíquicos (LENOX *et al.*, 1994; SCHOU, 1980).

Pelo fim do século XIX, médicos como *John Aulde* na América do Norte e *Carl Lange* na Dinamarca, fizeram observações clínicas relacionadas à sua eficácia profilática no tratamento de sintomas recorrentes de depressão (LENOX *et al.*, 1994).

O uso clínico do lítio na medicina convencional caiu em descrédito no início do século XX, devido às alegações sobre sua potencial toxicidade (LENOX *et al.*, 1994).

Cade, em 1949, em suas observações, considerou o lítio único para tratar mania em pacientes com doença bipolar. Depois, por volta de 1957, *Soon & Mogens Schou* estabeleceram que o lítio possuía grande eficácia no tratamento antimaniaco e na terapia profilática para prevenir e evitar surtos de depressão (LENOX *et al.*, 1994).

Por volta de 1959-1960, os psiquiatras *Hartigan* e *Baastrup*, simultaneamente e independentemente, observaram que seus pacientes quando tratados por longo tempo com lítio, não somente paravam de ter crises de mania como também de depressão, abrindo novas perspectivas para o uso do lítio na profilaxia da doença bipolar (SCHOU, 1980). Durante os anos de 1967-1970, em função de vários estudos e publicações, ficou claro o efeito profilático do lítio contra reincidência da mania e da depressão, passando a partir daí a ser usado extensivamente no mundo inteiro como um estabilizador do humor,

para reduzir a severidade e a frequência dos episódios recorrentes de mania e depressão na doença bipolar, e episódios recorrentes de depressão na doença unipolar (LENOX *et al.*, 1994; SCHOU, 1980).

Pacientes com PMD podem ter falta de flexibilidade do sistema necessária para responder adaptativamente a flutuações periódicas no estado externo e interno, resultando em manifestações clínicas de desajuste comportamental e profundas mudanças no humor, ritmo circadiano, fisiologia do sono, bem como alterações significativas na regulação neuroendócrina, todas consistentes com uma desregulação neuroquímica no sistema límbico e regiões associadas do cérebro e córtex pré-frontal (LENOX *et al.*, 1994).

Com relação a essas manifestações, sabe-se que o lítio, como outros antidepressivos, modificam o ritmo circadiano em humanos, roedores e muitas outras espécies (KLEMFUSS *et al.*, 1987). Uma melhor compreensão dos mecanismos de ação, ao nível molecular, do lítio pode não somente levar ao desenvolvimento de um tratamento psicofarmacológico ainda mais eficaz, mas também trazer uma explicação da base molecular da doença (LENOX *et al.*, 1994).

As doses terapêuticas do lítio e as doses tóxicas são muito próximas (KARNIOL *et al.*, 1984). Com pequenas variações, de acordo com o sal utilizado, o lítio é rapidamente absorvido no trato digestivo e passa para o sangue, onde é encontrado livre, não ligado a proteínas plasmáticas. Seu efeito terapêutico está mais relacionado ao nível plasmático, o qual varia muito de um indivíduo para o outro, do que à dose ingerida. O estado de equilíbrio é alcançado entre o 4^o e 7^o dias, após iniciada uma dose diária constante (KARNIOL *et al.*, 1984). Os níveis plasmáticos adequados no tratamento crônico com lítio são em torno de 0,4 - 1,2 mEq/L. As concentrações de lítio determinadas no tecido cerebral não são muito diferentes das concentrações de lítio no plasma (LAM *et al.*, 1992).

Os efeitos psicofarmacológicos podem estar relacionados às propriedades do cátion lítio, o qual possui diversas características em comum

com os cátions mono- e divalentes biologicamente ativos, tais como sódio, potássio, magnésio e cálcio (LAM *et al.*, 1992). Durante o tratamento com lítio, flutuações nas concentrações plasmáticas de cálcio e magnésio ocorreram no período de 4 semanas de tratamento. Sugere-se que o lítio compete com o cálcio e com o magnésio em seus sítios de ação e ligação nas células, o que pode ser uma explicação para as flutuações desses íons após a administração de lítio (LINDER *et al.*, 1989). Parece que o início do tratamento com Li^+ produz um balanço positivo de cálcio, magnésio e fosfato, e foi encontrado também uma elevação de cálcio no soro de pacientes que responderam ao tratamento, enquanto que em pacientes não responsivos, o cálcio sérico permaneceu inalterado. Com isso, observou-se que mudanças no cálcio e magnésio podem ser necessárias para o efeito clínico benéfico do lítio (LINDER *et al.*, 1989). Uma vez que o lítio possui algumas semelhanças químicas com o cálcio, Koenig *et al.* (1988) investigaram a possibilidade do lítio alterar a homeostase intracelular de cálcio por um efeito na captação do mesmo. O influxo de cálcio em sinaptossomas preparados de ratos tratados cronicamente com lítio, foi significativamente aumentado em relação aos controles (KOENIG *et al.*, 1988).

De fato, o Li^+ compete efetivamente com o Mg^{2+} por sítios de ligação na membrana e em enzimas dependentes de Mg^{2+} . Diversas enzimas cerebrais têm se mostrado sensíveis ao lítio *in vitro*. O Li^+ compete com o Mg^{2+} em sua ação sobre a adenilato ciclase (AC) no cérebro de ratos. A administração *in vivo* de lítio reduz significativamente a concentração de potássio sinaptossomal, sugerindo que o tratamento por longo tempo com lítio, possa induzir a despolarização parcial da membrana sinaptossomal (LAM *et al.*, 1992). Juntas, essas observações sugerem interações do Li^+ com os íons K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} como um mecanismo potencial básico dos efeitos psicotrpicos da terapia do lítio (LAM *et al.*, 1992).

O Li^+ pode influenciar a liberação de diversos neurotransmissores, incluindo dopamina, noradrenalina, acetilcolina e serotonina, pode também

alterar processos de transporte de membrana e a atividade de enzimas dependentes de cálcio e calmodulina. Os sistemas que envolvem segundos mensageiros intracelulares, incluindo metabolismo de inositol fosfato e atividade da adenilato ciclase, também são afetados pelo Li^+ (KOENIG *et al.*, 1988). Muitos desses processos são influenciados pela concentração de cálcio intracelular, sugerindo que um mecanismo básico para as ações clínicas do lítio seja devido à habilidade do íon interferir nas funções regulatórias do cálcio (KOENIG *et al.*, 1988). Então, elevações induzidas por lítio nos níveis intraneuronais de cálcio podem ter um papel em sua efetividade clínica (via modulação de um grande número de processos regulados por concentrações de cálcio intracelular) e podem também explicar porque a exposição excessiva ao lítio pode ser tóxica, uma vez que um aumento na concentração intracelular de cálcio, se não for reversível, pode resultar em morte celular (KOENIG *et al.*, 1988).

É também possível que o tratamento crônico com lítio afete a fluidez de membranas sinaptossomais, desta forma alterando as propriedades de proteínas ligadas à membrana, incluindo canais de cálcio dependentes de voltagem. Isso mostra que o mecanismo de ação do lítio no tratamento de desordens afetivas não é simples, nem direto (KOENIG *et al.*, 1988).

Evidências indicam que o lítio exerce efeitos transcricional e pós-transcricional significativos, e que esses efeitos podem ser mediados via alterações induzidas pela proteína quinase C (PKC) nos fatores regulatórios da transcrição nuclear responsáveis pela modulação da expressão de proteínas envolvidas na plasticidade neural e resposta celular, compensando as anormalidades fisiológicas geneticamente indefinidas em regiões críticas do cérebro (MANJI *et al.*, 1994). O lítio no tratamento crônico parece mobilizar mudanças adaptativas em proteínas chave que servem para reestabelecer o sistema através de mudanças compensatórias na regulação de processos, que são críticos para manutenção do balanço da atividade neurotransmissora na região mesolímbica e cortical do cérebro, retornando à estabilidade clínica

para pacientes com episódios afetivos recorrentes (MANJI *et al.*, 1994).

A participação de proteínas G nos sistemas de transdução de sinal, o acoplamento de receptores com canais iônicos e sistemas de resposta de segundo mensageiro, representam um alvo potencial para a ação do lítio crônico (MANJI *et al.*, 1994).

O efeito do lítio, modificando as atividades de proteínas G e da adenilato ciclase, pode ser pela competição com o magnésio. Além do lítio afetar proteínas G, adenilato ciclase e inositol-1-fosfatase, proteínas quinases dependentes de AMPc podem ser diretamente afetadas por ele (MORI *et al.*, 1996).

Ainda não se sabe ao certo se o lítio é teratogênico ou não, porém é recomendado cessar seu uso durante os primeiros meses de gravidez. Sabe-se que o lítio passa do sangue para o leite materno, e as concentrações de lítio no soro das crianças é de 1/10 - 1/2 do de suas mães (SCHOU, 1980).

Estudos têm confirmado que o sistema de segundo mensageiro do fosfatidil inositol fosfato (PIP) é um importante sítio de ação do lítio no cérebro (HIRVONEN, 1991; LEE *et al.*, 1992; LENOX *et al.*, 1994; JOPE *et al.*, 1994; ATACK *et al.*, 1995). O lítio também inibe a defosforilação do mio-inositol-1,4-bifosfato (Ins[1,4]P₂), um intermediário do ciclo do fosfatidil inositol (PI) no cérebro, por outra enzima citosólica. Nesse caso, a ação terapêutica do lítio na doença bipolar pode estar relacionada à diminuição do inositol cerebral e o correspondente aumento de InsIP no cérebro, seguido pela subsequente depressão da função de neurônios relacionados com o desenvolvimento da doença. A habilidade do lítio para interromper o ciclo do fosfatidil inositol fosfato (PIPs) nos neurônios pode ser expressa como uma mudança na função dos receptores acoplados à transdução de sinal via sistema do PIPs. A hidrólise do fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) gera dois segundo mensageiros, o inositol trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). Sugere-se que o IP₃ seja metabolizado a inositol livre por duas vias separadas, ambas inibidas por lítio em seus passos finais, reduzindo então o suprimento de

inositol livre requerido para a manutenção dos níveis de PIP₂ necessário para a sinalização do sistema ligado aos PIPs, uma vez que o cérebro tem acesso limitado a inositol não derivado da reciclagem dos inositóis polifosfatos. Um grande número de processos celulares são regulados por essa cascata de eventos (HIRVONEN, 1991; LEE *et al.*, 1992; JOPE *et al.*, 1994; LENOX *et al.*, 1994; ATACK *et al.*, 1995). Visto que o DAG é um ativador endógeno da PKC, a ação do lítio crônico na inibição da reciclagem do inositol através da hidrólise do PIP₂ resulta no acúmulo de DAG e em conseqüentes mudanças na ativação da PKC, alterando a fosforilação constitutiva de fosfoproteínas chaves (LENOX *et al.*, 1994). Os efeitos do Li⁺ são mais pronunciados em sistemas que sofrem a alta velocidade de hidrólise de PIP₂ (LENOX *et al.*, 1994). Diversos subtipos de receptores adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos são acoplados ao “turnover” do PIP₂ no SNC e mediam ambas vias excitatórias e inibitórias, de modo que esta hipótese oferece uma explicação plausível para a eficácia terapêutica do lítio no tratamento de ambas as fases da PMD, pela estabilização compensatória de um desequilíbrio amino biogênico inerente em regiões críticas do cérebro (LENOX *et al.*, 1994; JOPE *et al.*, 1994).

O lítio pode também influenciar a sinalização do PI por afetar as funções de proteínas G. Ele diminui a ligação do GTP em proteínas G, possivelmente diminuindo o acoplamento efetor-receptor. O lítio pode também interferir com a atividade das proteínas G pela competição com o magnésio, íon essencial para as funções das proteínas G (AVISSAR *et al.*, 1991). Alguns pesquisadores têm mostrado que o lítio atenua a atividade da AC no cérebro intacto de ratos, provavelmente por inibição da função de proteínas G. Então, a inibição das funções de proteínas G pode ser expressa como a diminuição da atividade da fosfolipase C e a subsequente diminuição do “turnover” do PIP₂ (HIRVONEN, 1991; JOPE *et al.*, 1994).

Sabe-se que o lítio não age somente em neurônios, mas também afeta a neuroglia, mais especificamente os astrócitos. Estudos realizados em nosso

laboratório, mostraram que lítio crônico modifica em hipocampo a fosforilação e a quantidade de GFAP, uma proteína de filamento intermediário de astrócitos no cérebro de ratos adultos (ROCHA *et al.*, 1994) e imaturos (ROCHA, 1996).

2. ASTRÓCITOS

2.1 Aspectos Morfológicos

A neuroglia foi descoberta por *Virchow* em 1846. Ele observou uma substância intersticial nas paredes dos ventrículos e na corda espinhal, inicialmente denominando-a “nerve-glue”. *Virchow* também reconheceu que este material intersticial continha células especiais estreladas ou na forma alongada. Ele observou que a neuroglia separava o tecido nervoso dos vasos sanguíneos e percebeu a grande importância para a distinção da fisiologia e patologia entre o tecido nervoso e sua substância intersticial. Somente com o advento da microscopia eletrônica é que se pôde observar que a matriz interneuronal consiste de pericário e processos das células neurogliais, com uma fina membrana de material extracelular entre elas. Com o desenvolvimento das técnicas de impregnação metálica, desenvolvidas por *Ramón y Cajal* (1913, 1916) e *del Río Hortega* (1919, 1921) obteve-se a base para a vasta literatura da microscopia óptica (MO) sobre neuroglia, escrita na primeira metade do presente século. Com a MO, reconheceu-se duas categorias de células gliais do SNC, a macroglia e a microglia. A macroglia compreende os astrócitos e oligodendrócitos. Estas células, como os neurônios, têm origem ectodérmica, mas diferem dos mesmos por terem somente um tipo de processo, e por reter a capacidade para se dividir ao longo da vida, particularmente sobre a influência de danos ao SNC (JACOBSON,

1991; PETERS *et al.*, 1991; PRIVAT *et al.*, 1995). Em contraste, a microglia foi considerada por *del Río Hortega* (1932) e outros, possuir origem mesodérmica e dirigirem-se ao cérebro no período neonatal. Como o próprio nome sugere, as microglias são menores do que os astrócitos e oligodendrócitos, têm a capacidade de multiplicarem-se por mitose em condições próprias de estimulação, como injúrias ao SNC, e podem tornar-se fagócitos. Pela MO, as neuroglias podem ser classificadas como:

- Macroglia, que compreende os astrócitos (protoplasmáticos e fibrosos); e os oligodendrócitos.

- Microglia

A separação da linhagem de células neuronal e glial ocorre num estágio muito inicial do desenvolvimento do SNC. Embora alguns precursores astrogliais estejam presentes no início do desenvolvimento, seus ciclos são mais longos do que os dos neurônios e, pelo menos no rato, a maior proliferação das células neurogliais ocorre após o nascimento. Na medula espinhal do rato, por exemplo, o número de células neurogliais aumenta seis vezes durante as primeiras duas semanas pós-natais (JACOBSON, 1991; PRIVAT *et al.*, 1995).

As primeiras células progenitoras da linhagem de células macrogliais são os glioblastos. Eles têm núcleos claros, poucas organelas, muitos ribossomos livres, e não apresentam filamentos intermediários. Os pró-astroblastos são precursores iniciais astrogliais. Eles lembram os glioblastos mas apresentam também alguns grânulos de glicogênio e filamentos intermediários contendo vimentina. Os astroblastos representam o estágio desenvolvimental tardio. Eles têm mais organelas, arranjos característicos de retículo endoplasmático granular, grânulos de glicogênio, corpos densos, e filamentos intermediários que contém GFAP. Os astrócitos são células pós-mitóticas completamente diferenciadas. Em preparações para MO, os astrócitos são reconhecidos como células de forma estrelar com processos estendendo-se ao redor do neuropilo e alguns alcançando os vasos sanguíneos,

onde formam expansões chamadas pés sugadores (JACOBSON, 1991; PRIVAT *et al.*, 1995).

Astrócitos do tipo 1 originam-se no período pré-natal das células neuroepiteliais na zona germinal ventricular e migram subseqüentemente para o parênquima do SNC onde eles se associam com os vasos sangüíneos e contribuem para a formação da barreira sangue-cérebro. Esses astrócitos liberam fatores de crescimento mitogênicos que promovem a proliferação e diferenciação dos oligodendrócitos e dos astrócitos tipo 2, e também estão envolvidos na formação da cicatriz glial após injúria ao SNC. Astrócitos tipo 2 e oligodendrócitos migram, no período pós-natal, para todas as regiões do SNC contendo fibras nervosas. As populações de astrócitos são continuamente renovadas em uma velocidade constante de proliferação e morte celular. A proliferação ocorre durante o desenvolvimento normal em resposta à morte neuronal, crescimento de neuritos, sinaptogênese, e mielinização, e em resposta a injúrias ou doenças no SNC (JACOBSON, 1991).

Existem três tipos de astrócitos de acordo com sua organização espacial:

1) Células radiais: dispostas num plano perpendicular ao eixo dos ventrículos, que se estendem por toda a espessura da substância branca (PRIVAT *et al.*, 1995).

2) Fibrosos (astrócitos não radiais): também localizados na substância branca, enviam seus processos em várias direções e não estão em contato com a pia mãe (PRIVAT *et al.*, 1995).

3) Protoplasmáticos: localizados na substância cinzenta, caracterizados por processos curtos e ramificados (PRIVAT *et al.*, 1995).

Existem formas de transição entre os dois primeiros tipos, porém há rara evidência de formas intermediárias entre os astrócitos protoplasmáticos e os fibrosos, estando localizados na interface da substância cinzenta e branca (PRIVAT *et al.*, 1995).

ASTRÓCITOS RADIAIS: foram descritos por *Ramón y Cajal* (1909),

com a técnica de Golgi e o método de Weigert, situam-se na substância branca, com alguns processos alcançando a substância cinzenta. O pericário dessas células está localizado na vizinhança da pia-máter ou a alguma distância dela. Os processos não são ramificados, são lineares, freqüentemente correndo dentro de eixos fibrosos da substância branca (PRIVAT *et al.*, 1995).

Após a imunorreação da GFAP, os astrócitos radiais aparecem espinhosos, e com um calibre irregular. O pericário é parcialmente marcado, possivelmente correspondendo à organização perinuclear das gliofibrilas.

Persistem três tipos de células radiais em animais adultos: células de Müller da retina; glia de Bergmann do cerebelo; e os tanicitos (PRIVAT *et al.*, 1995).

ASTRÓCITOS FIBROSOS: estão espalhados na substância branca e são menos numerosos do que os radiais. Eles aparecem com a impregnação metálica de Golgi-del Río Hortega como células estreladas com processos longos, finos e pobremente ramificados. Estes processos são geralmente lisos e se estendem a longas distâncias. Algumas vezes estão em contato com vasos sangüíneos.

Com a imunorreação da GFAP, os astrócitos fibrosos da substância branca aparecem como células estreladas, com o pericário marcado incompletamente, e os processos aparecem “em grupos” com calibre e forma irregulares.

Os astrócitos da substância branca podem ser diferenciados dos radiais na forma esférica regular ou oval do seu núcleo, o qual está no centro de um espaço que irradia suas ramificações em todas as direções (KIMELBERG *et al.*, 1989; PETERS *et al.*, 1991; PRIVAT *et al.*, 1995).

ASTRÓCITOS PROTOPLASMÁTICOS: com a impregnação de Golgi-del Río Hortega, os astrócitos da substância cinzenta aparecem como célula estufada com numerosos processos pequenos, irradiando-se em todas as direções. Estes processos são altamente ramificados e de calibre variado, contrastando com os dos fibrosos da substância branca. Em algumas células, o

pericário está atravessando o limite entre a substância branca e a substância cinzenta, podendo exibir uma morfologia composta, com alguns processos estendendo-se pela substância cinzenta, com morfologia protoplasmática, enquanto outros que se estendem através da substância branca, são do tipo fibrosos (KIMELBERG *et al.*, 1989; PETERS *et al.*, 1991; PRIVAT *et al.*, 1995). Isto sugere que a morfologia atual dos astrócitos é reflexo da organização do tecido no qual eles estão localizados e não uma outra característica intrínseca (RAMÓN Y CAJAL, 1909).

Após a detecção da GFAP, os astrócitos da substância cinzenta aparecem como células pequenas com muitos processos curtos irradiando do pericário, o qual é frequentemente delineado por estruturas imunorreativas a GFAP incompletamente. Os núcleos não são marcados. Os processos tem um contorno liso, e são raramente ramificados (PRIVAT *et al.*, 1995).

A morfologia dos astrócitos parece basicamente a mesma em várias áreas do SNC, como substância cinzenta, córtex cerebral, hipocampo, estriato, cerebelo. Pode haver variações, por exemplo, na abundância de GFAP, a qual é usualmente maior no hipocampo do que em outra parte, ou na forma e tamanho do núcleo, ou na extensão da ramificação dos processos (PRIVAT *et al.*, 1995).

O que é evidente é que os astrócitos adaptam sua forma e tamanho à arquitetura do tecido, para constituir uma rede tridimensional onde o tamanho da malha é adaptado a várias funções (PRIVAT *et al.*, 1995).

2.2 Aspectos Ultraestruturais dos Astrócitos

Nos astrócitos a organela mais específica são os gliofilamentos intermediários, 8 a 10 nm de diâmetro, organizados em feixes, cuja quantidade total varia de um astrócito para outro. Por via de regra, os gliofilamentos são muito mais abundantes em astrócitos fibrosos da substância branca, e muito

mais abundante nos processos do que no citoplasma perinuclear (PRIVAT *et al.*, 1995).

Os astrócitos fibrosos, observados sob microscopia eletrônica, apresentam núcleo com densidade homogênea, porém com forma irregular. Suas organelas citoplasmáticas são relativamente esparsas, com escassas mitocôndrias, geralmente alongadas, poucas e relativamente pequenas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. Possui poucos ribosomas livres no pericário, e pequenos grânulos de glicogênio que, em condições normais, podem estar distribuídos uniformemente no citoplasma. Mais proeminentes são as fibrilas, que ocupam uma grande proporção do citoplasma e se estendem para os processos, os quais, individualmente, são alongados, cilíndricos e em corte transversal podem ter uma forma circular ou oval. Somente alguns microtúbulos aparecem intercalados com as fibrilas no citoplasma dos astrócitos maduros. Ocorrem centríolos no pericário (PETERS *et al.*, 1991).

Os astrócitos protoplasmáticos, localizados na substância cinzenta, se caracterizam por apresentar processos curtos e ramificados, que emergem do pericário, geralmente em forma irregular. Seu núcleo apresenta condensações de cromatina contra o envelope nuclear. Apresentam menos fibrilas do que os fibrosos, sendo que estas não preenchem o citoplasma, mas tendem a ocorrer em feixes. O número de fibrilas nos astrócitos protoplasmáticos varia muito em diferentes partes do cérebro de um mesmo animal, podendo existir regiões ausentes de fibrilas. O retículo endoplasmático rugoso não é muito extenso, formado por poucas e pequenas cisternas, e como não há muitos ribosomas livres, o citoplasma possui uma aparência homogênea. Contém um grande número de mitocôndrias grandes e alongadas, grânulos de glicogênio, alguns lisosomas, microtúbulos e ocasionalmente centríolos (PETERS *et al.*, 1991).

2.3 Funções

Durante muito tempo, acreditava-se que essas células fossem apenas um suporte físico passivo dos neurônios, mas após vários estudos para tentar compreender melhor suas funções, descobriu-se que eles possuem um papel na fisiologia, no desenvolvimento do cérebro e em patologias do SNC (KIMELBERG *et al.*, 1989; NOREMBERG, 1994). Como os astrócitos possuem uma associação física com os neurônios, acredita-se que essas células sejam funcionalmente interdependentes (MÜLLER *et al.*, 1995).

Os astrócitos estão envolvidos nos mecanismos de transporte, na transferência de substâncias do sangue para os neurônios e seu envolvimento com vasos sanguíneos sugere um papel na indução e manutenção da barreira sangue-cérebro (KIMELBERG *et al.*, 1989; PETERS *et al.*, 1991; MASOOD *et al.*, 1993; RAINE, 1994; NOREMBERG, 1994).

Os astrócitos representam a rota primária para a transferência de substratos metabólicos da circulação para o neuropilo (BEVAN, 1990; TRAVIS, 1994; NOREMBERG, 1994; MÜLLER *et al.*, 1995; TSACOPOULOS *et al.*, 1996). Uma vez que a glicose é a fonte quase exclusiva de energia do cérebro, ela é processada glicoliticamente nos astrócitos, os quais liberam lactato como substrato metabólico para ser usado pelos neurônios. Isto indica uma compartimentalização entre astrócitos e neurônios, que é confirmada pela distribuição seletiva de certas atividades enzimáticas nessas células (TSACOPOULOS *et al.*, 1996). Os astrócitos estocam glicogênio no cérebro, e também a principal enzima glicogenolítica, a glicogênio fosforilase, é predominante nos mesmos. O glicogênio dos astrócitos podem ser o estoque de energia para os próprios astrócitos ou para os neurônios, oligodendrócitos ou células microgliais (KIMELBERG *et al.*, 1989; HAWRYLAK *et al.*, 1995).

Os astrócitos são responsáveis pela regulação dos níveis de pH local e pela regulação iônica, manutenção do balanço de K^+ , servindo como um

sistema tamponante de potássio para o meio. O sistema trocador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ é importante na regulação da homeostase ácido-base, e é dependente em parte da enzima específica de glia, a anidrase carbônica, que é localizada exclusivamente no compartimento glial no SNC, e serve para hidratar o CO_2 liberado dos neurônios para ácido carbônico, o qual então dissocia-se em HCO_3^- e H^+ (MASOOD *et al.*, 1993; NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994; MÜLLER *et al.*, 1995; HAWRYLAK *et al.*, 1995; PORTER *et al.*, 1995; VERNADAKIS, 1996).

Existem múltiplos tipos de receptores de glutamato nos astrócitos (BEVAN, 1990; GLOWINSKI *et al.*, 1994; VERNADAKIS, 1996). Os astrócitos também captam e metabolizam aminas biogênicas do espaço extracelular (WENZEL, 1991).

Os astrócitos possuem um papel crítico no metabolismo do glutamato e do ácido gama aminobutírico (GABA), que são, respectivamente, importantes neurotransmissores excitatório e inibitório. Para que a função possa ocorrer de maneira eficaz, estes transmissores, após serem liberados na fenda sináptica, podem ser removidos para dentro dos astrócitos, onde são metabolizados para formar glutamina, uma vez que a enzima glutamina sintetase é encontrada exclusivamente nos astrócitos. A glutamina, por sua vez, chega aos neurônios e serve como matéria-prima para fazer mais transmissores (KIMELBERG *et al.*, 1989; TRAVIS, 1994; NORENBURG, 1994; NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994; PORTER *et al.*, 1995 e 1996; VERNADAKIS, 1996).

Os astrócitos podem funcionar como células acessórias para mediar reações imune no cérebro (KIMELBERG *et al.*, 1989; PETERS *et al.*, 1991; MASOOD *et al.*, 1993; NORENBURG, 1994).

Estudos mostraram que os astrócitos possuem receptores ligados a sistemas que geram 2^{os} mensageiros, previamente descritos apenas em neurônios, indicando que eles respondem a mudanças nas condições do cérebro, não sendo apenas suportes passivos para as células neuronais (KIMELBERG *et al.*, 1989; NORENBURG, 1994; GLOWINSKI *et al.*, 1994;

KIMELBERG, 1995; HAWRYLAK *et al.*, 1995; PORTER *et al.*, 1996). Os astrócitos têm receptores para a maioria dos neurotransmissores, porém os que prevalecem são os do tipo beta-adrenérgicos que ligam o neurotransmissor norepinefrina, aumentando o segundo mensageiro, adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (KIMELBERG, 1995).

Astrócitos em cultura expressam uma série de canais iônicos dependentes de voltagem, como canal de sódio, de cálcio, de potássio e de cloreto, bem como receptores para neurotransmissores peptídicos e não-peptídicos, sugerindo um importante papel na função do SNC (BEVAN, 1990; HATTEN *et al.*, 1991; GLOWINSKI *et al.*, 1994; NORENBORG, 1994; HAWRYLAK *et al.*, 1995).

Uma das funções mais estudada dos astrócitos é seu papel no reparo do SNC, seguindo injúria. Após um trauma, os astrócitos proliferam, crescem, acumulam glicogênio, aumentam sua atividade metabólica e sofrem fibrose pelo acúmulo de filamentos (KIMELBERG *et al.*, 1989; PETTITO *et al.*, 1990; HOZUMI *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 1994; JEGLINSKI *et al.*, 1995; DALBY *et al.*, 1995; ENG *et al.*, 1994). O aumento de filamentos ocorre também em função da idade dos astrócitos (RAINE, 1994).

A maioria dos astrócitos reativos possuem uma morfologia estrelar complexa e outros perfis fenotípicos típicos de astrócitos fibrosos maduros (LENZ *et al.*, 1997).

As células astrogliais expressam fatores neurotróficos e promotores de crescimento de neurito, incluindo fatores de crescimento de peptídeo, neurotransmissores, molécula de adesão celular e proteínas de matriz extracelular. A expressão dessas moléculas é regulada durante o desenvolvimento e/ou após lesões ao SNC. Alguns desses fatores de crescimento, incluindo NGF, bFGF, CNTF e IGF I, exercem influências protetoras ou regenerativas nos neurônios seguindo lesões traumáticas, químicas ou isquêmicas no cérebro (TRAVIS, 1994; MÜLLER *et al.*, 1995).

Recentemente, muitos neuropeptídeos, transmissores, citocinas e

fatores de crescimento têm sido detectados em astrócitos reativos no cérebro, sendo que a expressão destes fatores restringem-se às regiões afetadas. Estes fatores derivados da glia podem contribuir para mudanças patológicas, ou alternativamente podem ser importantes na recuperação da injúria do cérebro (KIMELBERG *et al.*, 1989). Os fatores de crescimento derivados da glia tem grande interesse como tratamento potencial de um número de condições neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson (McMILLIAN *et al.*, 1994).

2.4 Filamentos Intermediários

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP), uma proteína que faz parte dos filamentos intermediários, marcadora de astrócitos maduros, tem auxiliado os estudos e à melhor compreensão dos astrócitos, bem como sua íntima relação com os neurônios (KIMELBERG *et al.*, 1989; INAGAKI *et al.*, 1994). Ela é classificada como uma proteína do tipo III, tem um peso aproximado de 50 kDa e em condições fisiológicas, forma filamentos com 10 nm de espessura (INAGAKI *et al.*, 1994). A fosforilação e a defosforilação de resíduos de aminoácidos específicos da região amino-terminal dos filamentos intermediários, estão envolvidos na regulação da polimerização da GFAP (INAGAKI *et al.*, 1994).

Nos estágios iniciais do desenvolvimento do SNC, os filamentos intermediários da glia radial e astrócitos imaturos são compostos de vimentina, uma proteína com peso molecular de 57 kDa. Seu filamento tem um tamanho de 7-11 nm, e é encontrado especialmente em células mesenquimais, fibroblastos, células da musculatura lisa, na parede de grandes vasos, bem como em cultura de células (SCHNITZER *et al.*, 1981 ; PIXLEY *et al.*, 1984; NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994). Próximo ao nascimento começa a ocorrer uma troca da vimentina por GFAP no SNC de ratos. Os

filamentos intermediários contendo vimentina parecem ser reunidos primeiro em células precursoras de astrócitos, seguida pela co-expressão de GFAP e vimentina por volta das duas primeiras semanas pós-natais, e finalmente a presença de duas populações de astrócitos diferenciados, um expressando somente GFAP, o outro também expressando vimentina, no adulto (PIXLEY *et al.*, 1984; VOIGT, 1989; YANES *et al.*, 1990; CALVO *et al.*, 1991; SELVÍN-TESTA *et al.*, 1994; NORENBORG, 1994; ENG *et al.*, 1994; GALOU *et al.*, 1996; STRINGER, 1996; COLE *et al.*, 1997).

Ramón y Cajal usando a técnica de Golgi, descreveu mudanças no desenvolvimento na glia radial do córtex de ratos. Ele observou o desaparecimento de células com processos radiais ocorrendo entre o 8^o e 20^o dia pós-natais, e sua posterior ausência (PIXLEY *et al.*, 1984).

A vimentina desaparece com a perda da glia radial e a presença da GFAP correlaciona-se com o aparecimento de astrócitos maduros. Então, isso não é apenas uma mudança regulatória na produção de uma proteína para outra dentro da mesma célula, e sim, um complexo processo do desenvolvimento, envolvendo mudanças morfológicas e diferenciação (PIXLEY *et al.*, 1984).

A fosforilação e desfosforilação da GFAP são importantes fatores na regulação do equilíbrio dinâmico entre GFAP polimerizada e despolimerizada (INAGAKI *et al.*, 1994). A fosforilação de subunidades inibe sua polimerização. Então as mudanças no estado de fosforilação das proteínas de filamentos intermediários podem ter profundos efeitos na estrutura do citoesqueleto. Se a fosforilação da GFAP possui um papel regulatório na hipertrofia de astrócitos reativos não é bem conhecido. Em cultura primária de astrócitos, agentes que afetam a fosforilação de proteínas pode induzir mudanças na morfologia similar ao que ocorre na gliose reativa (INAGAKI *et al.*, 1994).

Estudo no córtex visual de macaco mostrou que a GFAP-imunorreativa (IR) total é alta ao nascimento, diminui por volta dos 3 meses (80%) e

aumenta novamente até os valores de adulto. A vimentina-IR é alta ao nascimento, e declina pelos 3 meses de idade até a idade adulta. O decréscimo da imunorreatividade da GFAP é devido a mudanças na densidade de astrócitos GFAP-positivos dentro do tecido cortical, enquanto o número total de astrócitos permaneceu relativamente constante, como mostrado pela marcação com S-100. O período de redução de GFAP-IR coincide com o tempo de remodelamento das sinapses no córtex visual dos animais, sugerindo que a expressão da GFAP possa ser dependente de condições funcionais mais do que dependente de tempo (MISSLER *et al.*, 1994). Na maioria das espécies estudadas até agora, o número de astrócitos GFAP-positivos aumenta continuamente durante o desenvolvimento bem como a quantidade média de GFAP nos astrócitos do cerebelo de camundongos, do giro denteado de ratos, córtex parietal de ratos, córtex visual de ratos, de gatos, e em cultura de células (MISSLER *et al.*, 1994).

Gonçalves *et al.* (1992) mostraram, em hipocampo, que a fosfoproteína ppH47, altamente fosforilada (RODNIGHT *et al.*, 1988) tratava-se da forma fosforilada da GFAP. Foi demonstrado também que o Ca^{2+} externo regulava de modo diferenciado a fosforilação da GFAP em hipocampo de ratos adultos e imaturos (WOFCHUCK *et al.*, 1995), sendo dependente de Ca^{2+} externo nos animais adultos e prejudicada pelo mesmo, nos animais imaturos. No hipocampo de ratos imaturos a fosforilação da GFAP é regulada por um receptor metabotrópico (mGluR), envolvendo proteína G (WOFCHUCK *et al.*, 1994).

A administração crônica de cloreto de lítio (LiCl) *in vivo* aumentou significativamente a fosforilação (38,6%) da GFAP e, paralelamente, aumentou sua imunorreatividade em 36,6% em hipocampo de ratos adultos (ROCHA *et al.*, 1994). O tratamento resultou em uma gliose reativa em todas as regiões do hipocampo, caracterizada por hipertrofia celular, com aumento no número de células GFAP-positivas do estrato oriens ao hilo (ROCHA *et al.*, em preparação). O tratamento crônico de ratas adultas antes e durante a

prenhez com LiCl, aumentou significativamente a fosforilação da GFAP em 160%, enquanto que sua quantidade imunorreativa diminuiu 53%, em fatias de hipocampo de filhotes destas fêmeas tratadas (ROCHA, 1996). Como a fosforilação da GFAP está relacionada a mudanças no estado de polimerização do citoesqueleto, esses resultados podem significar mudanças na forma dos astrócitos, o que pode influenciar sua relação com a atividade neuronal (INAGAKI *et al.*, 1994) e/ou ser uma conseqüência de possíveis alterações neuronais. No entanto, as funções precisas de mudanças na fosforilação da GFAP não são conhecidas.

3. EXEMPLOS DE GLIOSE

A regeneração do SNC é estimulada pela reintrodução de um ambiente glial imaturo no local da lesão (VERNADAKIS, 1996).

A astrogliose é uma das reações mais conhecidas em resposta a danos no SNC ou a degeneração neuronal no cérebro maduro. Os astrócitos reativos tornam-se hipertrofiados, formando processos fibrilares compactos e numerosos, e gerando grande aumento na quantidade de GFAP, o principal constituinte dos filamentos intermediários dos astrócitos maduros. Uma proliferação dos astrócitos pode ocorrer, especialmente se a barreira sangue-cérebro for danificada. A gliose reativa pode ocorrer tanto no cérebro de ratos neonatais, como no cérebro de adultos, em resposta a danos. Gliose reativa, incluindo hipertrofia astrocítica e aumento na quantidade de GFAP, tem sido demonstrada em neonatos seguindo injúria mecânica, bem como administração de agentes neurotóxicos (GOODLETT *et al.*, 1993). As injúrias no cérebro transformam astrócitos em repouso em formas reativas, com um aumento de GFAP (KIMELBERG *et al.*, 1989).

A GFAP é sintetizada e depositada como parte de tecido cicatrizante durante uma resposta astrocítica a insultos no SNC e pode, em princípio, ter

um papel de marcador mais ou menos permanente de efeitos neurotóxicos. Em uma variedade de condições patológicas, incluindo exposição (excito)tóxica, a hipertrofia dos astrócitos em áreas seletivamente vulneráveis tem sido demonstrada, usando imunocitoquímica com anticorpo anti-GFAP (VAN DEN BERG *et al.*, 1993; LENZ *et al.*, 1997).

A vimentina e a GFAP podem ser expressadas simultaneamente em células gliais especializadas, como: sub-populações de astrócitos fibrosos, tanicitos, em células de Bergmann, e em células de Müller reativas. Sob condições patológicas, ocorre gliose reativa que se caracteriza por um aumento na expressão da GFAP, a qual polimeriza em numerosos filamentos intermediários, por hiperterofia nuclear, e algumas vezes por hiperplasia celular. Durante a gliose, os astrócitos recuperam a capacidade de expressar vimentina, que desapareceu durante o desenvolvimento normal, e o aumento simultâneo da expressão da GFAP e vimentina ocorre em células que estão próximas da lesão (PETITO *et al.*, 1990; CALVO *et al.*, 1991; MISSLER *et al.*, 1994; NORENBORG, 1994; FRANKE, 1995; ENG *et al.*, 1994; STRINGER, 1996; GALOU *et al.*, 1996; COLE *et al.*, 1997). Experimentos realizados com camundongos que não expressavam vimentina, mostrou uma formação anormal na rede de GFAP, e este efeito foi limitado a células que normalmente co-expressam vimentina e GFAP, sugerindo que a presença de vimentina é necessária para a organização e/ou estabilização da GFAP do sistema de filamentos intermediários (GALOU *et al.*, 1996).

Injeção de ácido caínico em ratos adultos provocou a expressão transitória de vimentina em astrócitos reativos que também são GFAP-positivos (LENZ *et al.*, 1997). No cérebro de roedores adultos normais, a expressão da vimentina é restrita à glia especializada, como células endimárias e glia de Bergmann do cerebelo e isto leva à sugestão de que a vimentina pode ser um marcador mais específico de gliose do que GFAP (PETITO *et al.*, 1990; NORENBORG, 1994).

Desidratação de ratos resulta em um aumento da proliferação de células

gliais no hipotálamo. Ocorre também uma proliferação de células gliais nos cérebros de camundongos submetidos a ambiente enriquecido. Então, uma variedade de fatores, bem como o aumento das atividades sensoriais e motoras, aumento na nutrição, ou estimulação hormonal e mudanças metabólicas, independentemente ou combinadas, podem estimular a proliferação de células gliais (JACOBSON, 1991).

Hipertrofia reativa se caracteriza por aumento de tamanho dos astrócitos e o número de astrócitos (fibrosos e protoplasmáticos) podem também aumentar, porém a hiperplasia é mais freqüente como resultado de perda aguda ou sub-aguda de neurônios (JACOBSON, 1991).

O ATP extracelular reproduz diversos perfis associados com gliose reativa, sugerindo que o mesmo possa estar envolvido na ativação dos astrócitos após injúria ao SNC. A exposição dos astrócitos ao ATP extracelular leva à estrelação e aumento no conteúdo de GFAP, característico de astrócitos reativos (NEARY *et al.*, 1994).

Sabe-se que o ATP extracelular pode afetar diversos processos biológicos incluindo neurotransmissão, função cardíaca, agregação de plaquetas, resposta imune, secreção de fatores e hormônios, entre outros. Em adição ao funcionamento em condições normais como um neurotransmissor, o ATP extracelular pode estar envolvido na resposta gliótica a injúrias no SNC quando níveis extracelulares alcançam níveis patológicos (NEARY *et al.*, 1994).

A astrogliose reativa pode ser encontrada nas encefalopatias produzidas na AIDS, em uma variedade de outras infecções virais, nas encefalomielites espongiiformes associadas ao príon, doenças inflamatórias desmielinizantes, injúria cerebral traumática aguda, doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (ENG *et al.*, 1994).

Os astrócitos podem estar envolvidos na epilepsia, como mostrado por Dalby *et al.* (1995) em um modelo de epilepsia em ratos e na doença de Alzheimer, que se caracteriza pela formação de uma placa senil, que entre

outros componentes, estão associados a microglia reativa e a astrócitos; além de outras doenças degenerativas (KIMELBERG *et al.*, 1989; COTMAN *et al.*, 1994; FRANKE, 1995).

A injeção de ácido cáínico em ratos provocou um aumento permanente nos níveis de GFAP no hipocampo destes animais, bem como um aumento, porém transitório, de cálcio. Como o acúmulo de cálcio precede as alterações na GFAP, sugere-se que esse influxo inicial de cálcio esteja associado com a degeneração dos neurônios, que podem mandar sinais para a reatividade dos astrócitos (VAN DEN BERG *et al.*, 1993; LENZ *et al.*, 1997).

4. INTERRELAÇÃO NEURÔNIO - GLIA

Especializações de membrana são as *gap junctions*, que envolvem mais freqüentemente 2 astrócitos, e mais raramente um astrócito e um oligodendrócito, ou o folheto externo da fibra mielinizada (MUGNAINI, 1982). São encontrados no pericário, bem como nos processos, com concentrações particulares nos “pés terminais” subpiais e perivasculares (MUGNAINI, 1982).

A interação que produz regulação bilateral glia-neurônio pode acontecer através de mudanças nas concentrações iônicas extracelulares (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) ou através de mudanças no metabolismo de neurotransmissores (BEVAN, 1990; TRAVIS, 1994; GLOWINSKI *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1994; MÜLLER *et al.*, 1995; HAWRYLAK *et al.*, 1995; VERNADAKIS, 1996; PORTER *et al.*, 1996). Os astrócitos possuem canais iônicos como os canais de potássio, de sódio e de cálcio, e possuem também canais de Cl^- (HAWRYLAK *et al.*, 1995; VERNADAKIS, 1996).

A glia radial apresenta um papel importante no direcionamento dos neuroblastos para alcançar seu destino correto no cérebro maduro (KIMELBERG *et al.*, 1989; JANAS *et al.*, 1991; PETERS *et al.*, 1991;

RAINE, 1994; MÜLLER *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1995; HAWRYLAK *et al.*, 1995). No neocórtex e no hipocampo, há evidências que as fibras alongadas da glia radial guiam os neurônios da superfície ventricular para seu destino final na placa cortical, e tem sido sugerido que mecanismo semelhante direciona a migração no giro denteado (RICKMANN *et al.*, 1987; YANES *et al.*, 1990; HAWRYLAK *et al.*, 1995). Terminada a migração, a glia radial na maioria das regiões começa a proliferar e originar astrócitos. Os astrócitos podem ser importantes para o crescimento de axônios seccionados, restaurando conexões do sistema nervoso. No SNC os neuritos crescem preferencialmente em substratos glial. A astroglia pode ter um importante papel na sobrevivência e função de enxertos de tecidos implantados no SNC (PIXLEY *et al.*, 1984; KIMELBERG *et al.*, 1989; NOREMBERG, 1994; HAWRYLAK *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1995).

A íntima relação dos astrócitos com os neurônios, foi demonstrada por *Parpura et al.* (1994), onde um estímulo mobilizou cálcio nos astrócitos causando um aumento na liberação de glutamato dependente de cálcio, o qual pode agir nos neurônios adjacentes. Também, o glutamato liberado nos terminais sinápticos podem disparar ondas de cálcio nos astrócitos.

A plasticidade estrutural dos astrócitos é acoplada à plasticidade sináptica no SNC, ocorrendo uma mudança na morfologia astrocítica que está associada com um aumento no número ou na eficácia das sinapses. Neurotransmissores podem alterar a morfologia astrocítica de epitelial para estrelar (HAWRYLAK *et al.*, 1995).

O tratamento crônico com lítio provocou uma mudança na morfologia dos astrócitos, bem como uma hipertrofia dos mesmos, no hipocampo de ratos adultos (ROCHA, 1996).

5. HIPOCAMPO

O hipocampo é uma região do cérebro que faz parte do sistema límbico. Suas funções são variadas, sendo seu papel na regulação do comportamento emocional inicialmente apontado por Papez, em 1937. Outra função importante é sua participação no fenômeno de memórias diversas e a processos relacionados com a estocagem de memórias (WYSS *et al.*, 1995).

A formação hipocampal é uma importante estrutura no aprendizado episódico e espacial, bem como um componente de controle de uma variedade de funções vegetativas. É também uma estrutura cerebral plástica e vulnerável que é danificada por golpe ou pancada e trauma encefálico e susceptível a danos durante o envelhecimento e o estresse (McEWEN *et al.*, 1996).

A região hipocampal ocupa a maior parte da parede ventro-caudal e ventro-lateral do córtex cerebral. O hipocampo (corno de Ammon e giro denteado) estende-se ventralmente ao corpo caloso ao nível da região caudal dos núcleos septais (PAXINOS, 1995).

O corno de Ammon (CA) apresenta uma forma de U e possui uma estreita camada de células piramidais, que se estende do prosubiculum até o hilo do giro denteado. Adjacente ao prosubiculum há uma região compacta de células de tamanho médio, denominada de CA1 por *Lorente de Nó* (1934). Essa região apresenta-se com células piramidais que convergem para a região dorsal. Seguindo a CA1, há um campo de células grandes e pouco densas, chamada de CA2 e CA3 por *Lorente de Nó* (1934). A transição da CA2 para CA3 ocorre na curvatura lateral. As células piramidais da região CA2 ocupam uma estreita faixa adjacente à CA1, que pode ser distinguida das células piramidais da CA3 em preparações de Golgi. As células piramidais da região CA3 seguem para o hilo do giro denteado. Todas as células piramidais da camada CA3 e algumas da camada CA2, em ratos, estão inervadas por fibras musgosas, isto é, por axônios das células granulares. Essas 3 regiões possuem

quatro camadas, que são: oriens, piramidal, radiatum e lacunoso-molecular (SCHMIDT-KASTNER *et al.*, 1991; PAXINOS, 1995). Dos 7 milhões de neurônios das regiões CA, aproximadamente 67% encontram-se na região CA1, 30% estão na CA3, e 3% na CA2 (WYSS & VAN GROEN, 1995).

O giro denteado é uma estrutura trilaminar e forma uma capa sobre a extremidade livre do corno de Ammon (PAXINOS, 1995; WYSS & VAN GROEN, 1995). É formado pelas camadas molecular (contém a maioria dos dendritos das células granulares), granular, e pelo hilo (camada de células polimórficas), que contém células polimorfas, fusiformes e células piramidais modificadas (RICKMANN *et al.*, 1987; PAXINOS, 1995; WYSS & VAN GROEN, 1995). No cérebro de roedores, essa região difere das outras regiões corticais porque a grande maioria das células granulares (aproximadamente 85% no rato) são geradas pós-natalmente com um pico de proliferação ocorrendo pelo final da primeira semana pós-natal (RICKMANN *et al.*, 1987; ALTMAN *et al.*, 1990). Com isso, evidencia-se um aumento de 35-43% no número de células granulares entre 1 mês e 1 ano de idade (ALTMAN *et al.*, 1990). *Lorente de Nó* (1934) considera o hilo como região CA4 do corno de Ammon. Hoje ela é considerada como uma área de transição entre o giro denteado e o corno de Ammon (PAXINOS, 1995).

Com a aplicação de técnicas de imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP, um marcador específico para astrócitos maduros e células glias radiais, tem sido revelado um sistema de células glias radiais no desenvolvimento da formação hipocampal no camundongo e no macaco. Diferentemente no rato, a GFAP não parece ser expressa nas células glias muito jovens; somente as células glias maduras que possuem GFAP suficiente para ser detectada imunohistoquimicamente, enquanto que as células glias imaturas expressam a proteína de filamento intermediário vimentina (RICKMANN *et al.*, 1987).

Um aspecto notável do hipocampo é o alinhamento característico dos corpos celulares, dendritos, aferências e eferências em camadas distintas. As

áreas de neuropilo são formadas pelos dendritos basal e apical das células piramidais e vias aferentes e eferentes. Com isso, observa-se que os neurônios hipocampais possuem grande campo dendrítico (SCHMIDT-KASTNER *et al.*, 1991).

Os terminais sinápticos do hipocampo cobrem cerca de 30% do volume do hipocampo, mas somente 5% do neocórtex (SCHMIDT-KASTNER *et al.*, 1991).

5.1 Morfogênese

O neuroepitélio hipocampal possui três subdivisões morfológicamente distintas: o neuroepitélio do corno de Ammon, que gera os neurônios grandes (macroneurônios); o neuroepitélio do giro denteado, que gera as pequenas células granulares (microneurônios); e o neuroepitélio da fímbria, fonte de neurônios e glia (ALTMAN *et al.*, 1990).

O neuroepitélio denteado primário é distinto do neuroepitélio amônico não somente em sua localização e forma, mas também em sua dinâmica celular. Pelos dias 16 e 17 da vida embrionária, o neuroepitélio denteado contém menos células mitóticas do que o neuroepitélio amônico. Por volta do 18^o dia embrionário, surge um agregado subventricular de células proliferativas, a matriz denteada secundária. Nos dias 19 e 20 da vida embrionária, as células em forma de fuso estendem-se do centro da matriz secundária para o giro denteado primordial, sendo que as células continuam mantendo a capacidade proliferativa. A primeira fase da morfogênese da camada granular se completa antes do nascimento. A segunda migração denteada, penetra a camada polimórfica basal e alcança a ponta da lâmina denteada externa pelos primeiros dias após o nascimento (ALTMAN *et al.*, 1990). Existem três fases de desenvolvimento do giro denteado que são: a primeira fase, quando ocorre a formação do esqueleto dos dois ramos da

camada granular, conhecida como a primeira migração denteada; a segunda fase é o aumento volumétrico da camada granular durante os períodos da infância e juventude, ocorrendo a segunda migração denteada; e a terceira fase é o acúmulo das células proliferativas na zona subgranular (ALTMAN *et al.*, 1990; SIEVERS *et al.*, 1992). A produção de células granulares pode ocorrer até por volta do primeiro mês de vida na zona subgranular. Considera-se que esta zona seja a fonte de células granulares adquiridas durante o período juvenil e adulto, e está presente no hipocampo de animais jovens, como coelhos, gatos e ratos. As células granulares do hipocampo estão arranjas dentro da camada granular em uma seqüência externa-interna, o inverso do arranjo de outras estruturas corticais, incluindo a camada piramidal do corno de Ammon (ALTMAN *et al.*, 1990).

A formação do estrato granuloso é precedida pelo estabelecimento de sucessivas matrizes denteadas, as quais são formadas por células que deixam o neuroepitélio ventricular e ocupam posições sobre a fimbria (suprafimbrial), abaixo da superfície pial (subpial), e dentro do hilo denteado (matriz denteada hilar) (SIEVERS *et al.*, 1992). A matriz denteada subpial, desde o início de sua existência pelo 13^o dia embrionário até o seu desaparecimento por volta do 7^o dia pós-natal, é caracterizado pela alta quantidade de células GFAP-positivas e mitoses. Isto indica a gliogênese precoce na região denteada, antes do aparecimento do estrato granuloso. Muitas das células GFAP-positivas bipolares têm uma orientação paralela para a superfície pial e têm contatos focais à membrana basal pial. O estabelecimento da matriz denteada subpial divide a glia radial primordial em duas bandas: 1) a banda suprafimbrial que retém sua posição radial original entre o ventrículo e a superfície pial; 2) a banda glial dorsal que atravessa a ponta ventral da camada de células piramidais da futura região CA3 (SIEVERS *et al.*, 1992). O aparecimento seqüencial de “pools” de células proliferativas, e o sucessivo agrupamento de neurônios e glia ao longo do gradiente temporoespacial, pode implicar em mecanismos de migração e agregação característicos das células granulares

denteadas e sua glia associada, que possivelmente diferem das encontradas no resto do córtex cerebral. A origem e desenvolvimento da glia radial local do giro denteado, bem como seu possível papel no desenvolvimento do giro, e sua relação à glia radial primordial da parede cerebral não são completamente compreendidos (SIEVERS *et al.*, 1992). Há dois conjuntos distintos de processos gliais radiais envolvidos na formação do giro denteado. A glia radial primordial está relacionada diretamente à migração das células denteadas, e é suplementada com o segundo conjunto de células gliais que se originam da zona proliferativa hilar secundária. Estas células parecem intercalar com as porções basais das fibras gliais radiais primordial e, desta forma, amplificar e estender a glia primordial para o desenvolvimento do giro denteado definitivo (SIEVERS *et al.*, 1992).

O giro denteado é o único de todo o córtex cerebral que se origina de células em proliferação que partem do neuroepitélio da zona ventricular e montam sucessivas matrizes que providenciam a maioria das células do estrato granuloso primordial (SIEVERS *et al.*, 1992). As matrizes denteadas contêm células astrogliais desde o início de sua existência. Também, dois tipos ultraestruturalmente distintos de células estão presente, correspondendo às células neuroepiteliais e aos glioblastos astrocíticos (SIEVERS *et al.*, 1992).

Parece que a glia radial primordial não faz parte da organização do giro denteado, exceto delimitando as bordas da região da parede cerebral entre a fimbria e a fissura hipocamapal (SIEVERS *et al.*, 1992). Na elongação seqüencial do estrato granuloso ao longo do eixo transversal, ocorre predominantemente a adição de colunas de células granulares pós-mitóticas associadas com células gliais radiais unipolares secundárias (SIEVERS *et al.*, 1992). Tem sido mostrado que os astrócitos estão envolvidos na compartimentalização do SNC durante o desenvolvimento. As células astrogliais delineiam o giro denteado emergente, formando uma transitória faixa entre as fibras da glia radial primordial dorsal ao giro denteado

emergente e o desenvolvimento tardio do conjunto de fibras gliais radiais secundárias dentro da lâmina suprapiramidal (SIEVERS *et al.*, 1992).

Fibras radiais imunorreativas à vimentina foram observadas no giro denteado pelo 13^o dia embrionário e, pelo dia 14^o, a densidade de fibras marcadas foi claramente maior no giro do que no hipocampo adjacente. Os processos radiais GFAP-positivos foram primeiro observados por volta do 17^o dia embrionário. A orientação dos processos vimentina e GFAP-positivos mudou por volta da última semana de vida embrionária e, pelo final da primeira semana pós-natal, eles formavam uma malha complexa de processos. A distribuição de seus corpos celulares também mudou com o tempo; inicialmente seus pericários foram localizados no neuroepitélio à margem lateral do primórdio hipocampal; após, eles foram encontrados principalmente sob a camada de células granulares. As células em divisão que continham GFAP foram observadas ao longo da trajetória das células granulares precursoras em migração, e no hilo do giro denteado; no estágio final, algumas figuras mitóticas GFAP-positivas foram vistas dentro e imediatamente abaixo da camada de células granulares (RICKMANN *et al.*, 1987). O desenvolvimento do giro denteado contém um sistema organizado de processos gliais radiais antes da migração dos precursores neuronais do neuroepitélio. Com isso, parece que os processos gliais providenciam um substrato essencial para guiar a migração neuronal. Não há dúvidas que o papel da distribuição da glia radial no desenvolvimento do giro denteado muda significativamente com o tempo, com novos processos sendo adicionados no período de neurogênese (RICKMANN *et al.*, 1987).

A banda hipocampal inferior é composta de células piramidais das regiões CA1 e CA3 do corno de Ammon. Após deixar o neuroepitélio amônico, os neurônios jovens pausam por 3-4 dias na zona hipocampal intermediária, determinando a seqüência de dentro para fora do estrato piramidal. A permanência das células piramidais na zona intermediária, e os complexos eventos associados com a morfogênese do estrato piramidal

regiões CA1 e CA3, estão relacionados com a formação tardia dos canais alveolares, onde as fibras hipocâmpais acumulam, e a junção das duas bordas da camada granular do giro denteado forma uma malha para as células piramidais da região CA3 montarem a região hilar (ALTMAN *et al.*, 1990). Aparentemente, as células piramidais da região CA3, embora geradas muito inicialmente, têm uma pausa na zona intermediária até que algumas células granulares, fonte de suas aferências, estabeleçam a camada granular (ALTMAN *et al.*, 1990).

Os neurônios amônios hipocâmpais são interconectados por sinapses excitatórias: as células granulares do giro denteado recebem excitação do córtex entorrinal pela via perforante. As células granulares por sua vez mandam seus axônios excitatórios, as fibras musgosas, para a camada CA3, que enviam seus axônios, as colaterais de Schaffer, para os neurônios da CA1. Então, os neurônios vulneráveis da camada CA1 são o final de uma cadeia trisináptica de sinapses excitatórias (SCHMIDT-KASTNER *et al.*, 1991).

O hipocampo recebe inervação noradrenérgica do *locus coeruleus* (LC). Lesões no LC aumentam o dano na CA1, enquanto que a ativação dos neurônios do LC reduzem o dano na camada CA1, sugerindo um papel protetor da noradrenalina (STANFIELD *et al.*, 1979; ALTMAN *et al.*, 1990; SCHMIDT-KASTNER *et al.*, 1991).

O giro denteado recebe aferência noradrenérgica do *locus coeruleus*. As fibras noradrenérgicas terminam principalmente na camada polimórfica do giro denteado. A projeção serotoninérgica que se origina de diversas subdivisões do núcleo da rafe também terminam na camada polimórfica, mas a projeção tende a ser limitada na porção sub-granular da camada. O giro denteado recebe menores projeções dopaminérgicas, com distribuição difusa que se originam principalmente das células localizadas na área tegmental ventral (PAXINOS, 1995).

A microglia amebóide está presente no primórdio hipocâmpal no 14^o dia embrionário. Os precursores das células microglicais tendem a ser

localizados dentro de camadas de células em diferenciação e de neuropilo, mais do que em zonas germinativas (DALMAU *et al.*, 1997). Alguns estudos indicam que as células microgлияis amebóides podem participar ativamente na angiogênese e gliogênese (DALMAU *et al.*, 1997). A diferenciação morfológica dos precursores da célula microgлияl parece começar muito antes do que a diferenciação morfológica e imuno-fenotípica dos precursores das células astrogлияis (DALMAU *et al.*, 1997). Por volta do 17^o dia embrionário, as células precursoras microgлияis foram localizadas na matriz de diferenciação correspondente aos estratos radiatum e oriens, mas foram ausentes do neuroepitélio proliferativo. Em contraste, os processos astrogлияis radiais estendem-se em ambas as zonas germinativas e migratória, e nas camadas das células em desenvolvimento e de neuropilo. Isto está de acordo com o fato de que as células astrogлияis têm um papel significativo na migração e direcionamento axonal de neurônios formados. A presença das células precursoras microgлияis somente nas camadas de células em desenvolvimento e nas de neuropilo, sugere que essas células sozinhas ou em combinação com as células astrogлияis, possam ter um papel na regulação da sobrevivência e crescimento de neuritos mas, aparentemente, não na migração de neurônios jovens estabelecidos nestas áreas (DALMAU *et al.*, 1997).

Foi demonstrado que a glia radial em geral possui um arranjo perpendicular às principais camadas celulares e estendem-se por todas as subregiões. Substâncias liberadas pela linhagem de células astrogлияis não somente podem estar implicadas na migração neuronal e na formação de uma via nervosa, mas também na migração e diferenciação das células microgлияis. Isso mostra a existência de uma fina regulação de sinais intercelulares entre as populações de células em diferenciação microgлияl e astrogлияl (DALMAU *et al.*, 1997).

A morte celular é um evento natural que ocorre durante a histogênese do SNC. As células microgлияis e os macrófagos estão ativamente envolvidos na eliminação de neurônios, células gлияis e projeções axonais (DALMAU *et*

al., 1997).

5.2 Astrócitos Hipocampais

Zilles et al. (1991) mapearam a distribuição da GFAP-IR no prosencéfalo e no mesencéfalo de ratos adultos utilizando análise de imagens computadorizada. A formação hipocampal é caracterizada por possuir astrócitos marcados com alta concentração de GFAP-IR. A distribuição da GFAP-IR ocorre de maneira laminar e a quantidade varia de acordo com as regiões estudadas. A quantidade de GFAP-IR é menor nas camadas piramidal do corno de Ammon e granular do giro denteado, e maiores concentrações são encontradas no estrato radiatum do CA1 e CA2 e no estrato lacunoso-molecular do CA3. Também são encontradas grandes quantidades de GFAP na camada molecular e hilo do giro denteado; no estrato oriens do CA3, CA2, CA1 e no estrato lacunoso-molecular do CA1 e CA2. Na camada molecular do giro denteado a distribuição de GFAP-IR não é homogênea, a parte mais externa mostra alta quantidade de GFAP-IR e a zona mais interna e mais larga apresentou pouca expressão de GFAP-IR. A fimbria hipocampal tem também uma distribuição não uniforme de GFAP-IR com concentração menor na periferia. No hipocampo dorsal e parte do subículo identificou-se alta concentração de GFAP-IR. O presubículo e o córtex agranular retrosplênial mostrou pouca imunorreatividade para GFAP.

Sabe-se que o número de astrócitos de ratos imaturos alcançam valores de adulto a aproximadamente 2 a 3 semanas após o nascimento, na maior parte do cérebro. Por outro lado, a maturação da homeostase de potássio ocorre mais tarde, por volta da quarta semana pós-natal (NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994). Em ratos com 8 dias de idade, os astrócitos da região CA1 possuem pequenos corpos celulares com forma arredondada ou oval e processos curtos e orientados radialmente. O grupo de animais mais velhos, os corpos celulares apresentaram forma alongada ou triangular com

processos longos. Os processos da glia radial marcado com anti-GFAP mostraram-se intensos somente no estrato alveus, com processos estendendo para o estrato oriens nos animais com 8 dias. Nos animais com 16 dias, foi observado uma menor quantidade de fibras glial radial no estrato oriens (NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994). Com 8 dias de idade, a densidade numérica por unidade de área foi baixa em todas as regiões do hipocampo, comparada com os valores de adultos, alcançando quase 43% dos valores dos mesmos aos 16 dias. Aos 8 dias, o espaço extracelular parece maior do que nos adultos. O maior aumento nas células GFAP-positivas foi observado durante as primeiras duas semanas após o nascimento, alcançando o número de células de adulto por volta da terceira semana pós-natal (NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994). Os processos GFAP-positivos do estrato radiatum não apresentaram uma orientação definida nos animais jovens (8-16 dias), porém apresentaram uma orientação perpendicular ao estrato piramidal em ratos com 24 dias de idade (NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994). No presente estudo, os processos das células GFAP-positivas foram densos no estrato radiatum, mas quase ausentes na camada de células piramidais, onde somente finas fibras gliais foram observadas entre os muitos somas neuronais. É possível que as mudanças morfológicas dos astrócitos da região CA1 do hipocampo de ratos sejam um reflexo das interações entre neurônios (em particular processos neuronais) e células gliais (NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994).

OBJETIVOS

Apesar da grande eficácia do lítio no tratamento de desordens psíquicas, sabe-se que os estudos sobre seu mecanismo de ação e possível toxicidade foram realizados somente em neurônios. Pouco se sabe sobre os efeitos do lítio em astrócitos.

Para dar continuidade aos estudos já realizados em nosso laboratório, onde foram analisados os efeitos do tratamento crônico com cloreto de lítio sobre parâmetros neuroquímicos e morfológicos (ROCHA *et al*, submetido) em astrócitos de hipocampo de ratos adultos, e sobre parâmetros neuroquímicos dos astrócitos de hipocampo de ratos imaturos, filhos de mães tratadas (ROCHA, 1996), foi objetivo geral deste trabalho:

- Analisar os efeitos do lítio sobre o desenvolvimento do SNC de ratos imaturos, com 15 dias, filhos de mães tratadas.

Para tal, dividimos este trabalho em objetivos específicos, que foram:

- a) Obter animais com 15 dias pós-natal, após tratamento das mães com cloreto de lítio antes e durante a prenhez, e na lactação, com litemia dentro da faixa terapêutica para humanos (0,4 - 1,2 mEq/L);
- b) Analisar os efeitos do tratamento crônico com LiCl sobre o imunoconteúdo de vimentina no hipocampo destes animais, utilizando técnicas de imunodeteção;
- c) Estudar as possíveis alterações morfológicas em astrócitos hipocampais desses animais imaturos, utilizando a técnica de imunocitoquímica com anticorpos anti-GFAP e anti-vimentina .

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

O material utilizado para o tratamento, para a preparação de soluções, tampões, meios de incubação e montagem de lâminas, necessário para a realização deste trabalho, está listado a seguir:

1.2 Tratamento

Ratas Wistar adultas (3 meses de idade) - Biotério UFRGS

Cloreto de Lítio - MERCK

Cloreto de Sódio - ISO FAR

Ração padrão de Biotério

1.3 Histologia

Álcool 96° e 100° - LABSYNTH

“Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein” (GFAP) (G-9269) - SIGMA

Anti IgG de coelho - SIGMA

Anti IgG de camundongo - AMERSHAM

Anti-vimentina Clone V-9 – SIGMA

Bálsamo do Canadá sintético - REAGEN

Cloreto de Cálcio - REAGEN

Cloreto de Potássio - REAGEN

Cloreto de Sódio - MERCK

Fosfato Monobásico de Sódio Monohidratado - NUCLEAR

Fosfato Dibásico de Sódio 7H₂O - NUCLEAR
Hidrato de Cloral- MERCK
Hidróxido de Sódio - REAGEN
Lâminas - PERFECTA
Lamínulas - COVER GLASS
“Peroxidase-anti-Peroxidase Soluble Complex” (PAP) - SIGMA
Paraformaldeído - REAGEN
Peróxido de Hidrogênio
Sacarose - REAGEN
Soro Normal de Cabra - Obtido no Laboratório de Imunologia da
Faculdade de Veterinária - UFRGS
Tetracloroeto de 3,3'-diaminobenzidina - SIGMA
Triton X-100 - SIGMA
Xilol - GRUPO QUÍMICA

1.3 Imunodeteccção da GFAP e Vimentina

“Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein” (GFAP) (G-9269) - SIGMA
Anti-vimentina (V-5255) - SIGMA
Anti IgG de camundongo - AMERSHAM
Anti IgG de coelho - AMERSHAM
ECL - AMERSHAM
Membrana de Nitrocelulose - SIGMA
Peroxidase – AMERSHAM

1.4 Aparelhos

Agitador orbital - FANEM

Balança

Fotomicroscópio - NIKON OPTIPHOT II

“Chopper” McIlwain

Micrótomo de congelação - LEITZ

pHmetro

Vórtex

2. MÉTODOS

2.1 Animais

Para a realização desses estudos, foram utilizadas ratas Wistar fêmeas adultas (Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde e do Departamento de Bioquímica - UFRGS) com aproximadamente 3 meses de idade, pesando em média 300 gramas. A elas foi administrado cloreto de lítio (LiCl), segundo o método de Christensen et al. (1985). O LiCl 1M foi adicionado à dieta padrão do Biotério previamente moída com auxílio de um liquidificador, em uma proporção final de 60 mmol/kg de ração seca. Os "pellets" foram preparados com a adição de água e LiCl na ração em pó, e após foram secos em estufa à 60°C por 1 hora. Os animais receberam solução salina de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% para prevenir intoxicação por Li⁺, e água corrente *ad libitum*. Após uma semana de tratamento, as fêmeas foram colocadas em presença de um macho para reprodução. À medida que ganhavam os filhotes, após 21 dias de gestação, as ratas eram separadas em gaiolas individuais. Para evitar que estes tivessem peso abaixo dos filhotes

controles, o que foi observado previamente, estabeleceu-se o número de cinco filhotes para as fêmeas tratadas. Dos filhotes sacrificados (entre 14-16 dias) por decapitação, coletavam-se o sangue em tubos “Eppendorf” heparinizados e estes eram centrifugados em centrífuga clínica para obtenção do plasma, a concentração de Li⁺ (litemia) no mesmo foi analisada por espectrofotometria de absorção atômica no Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela Dra. Carmen Pilla. A litemia das mães também foi medida para verificar se esta se encontrava na faixa terapêutica para humanos (0,4 - 1,2 mEq/L).

Para os controles, foram utilizados filhotes de ratas Wistar adultas, às quais foi fornecida a dieta padrão de Biotério e água *ad libitum*.

Os ciclos luz/sombra sucederam-se em períodos de tempo regulares de 12 horas.

2.2 Histologia

Para a análise histológica do hipocampo desses animais foi utilizado o procedimento imunocitoquímico (STERNBERGER, 1979), com a utilização de anticorpos, para detectar GFAP e vimentina.

2.2.1 Procedimento Imunocitoquímico

Utilizou-se a técnica de Sternberger (1979), empregando-se o anticorpo policlonal anti-GFAP e o monoclonal anti-vimentina.

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 35% (0,1 ml/100g de peso corporal), heparinizados (Liquemine - Roche 1000 UI). Foi realizada uma secção médio ventral, abrindo-se o tórax, e canalizou-se a aorta através do coração e seccionou-se a aurícula direita e foram perfundidos com solução salina 0,9% seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (PB; pH

7,4). Após a perfusão, os cérebros foram removidos do crânio e pós-fixados durante 4 horas no mesmo fixador à temperatura ambiente, e então crioprottegidos com sacarose 15% e 30% em PB sucessivamente até afundar à 4°C, sob agitação contínua .

Secções coronais do cérebro (40 μ m) foram obtidas utilizando um micrótomo de congelação e estas foram colocadas em tampão fosfato salino (PBS). Importante salientar que todas as incubações foram realizadas sob agitação em um agitador orbital. Os cortes "free floating" foram pré-tratados com uma solução de metanol 10% diluído em peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂) durante 30 minutos à temperatura ambiente, para inibir peroxidase endógena. Após diversas lavagens em PBS, os cortes foram pré-incubados com soro normal de cabra 3% diluído em PBS e Triton X-100 0,4% (PBS-TX) por 30 min. A seguir o material foi incubado com o primeiro anticorpo anti-GFAP policlonal (1:100 em PBS- TX) e anti-vimentina monoclonal (1:200 em PBS-TX) por 48 horas à 4°C em agitação contínua. Após diversas lavagens em PBS, os cortes foram imersos no segundo anticorpo anti IgG de coelho (1:50 em PBS-TX) e anti IgG de camundongo (1:500 em PBS-TX) por 2 horas à temperatura ambiente. Depois de duas lavagens de 15 minutos cada com PBS-TX, as secções foram finalmente incubadas com peroxidase-anti-peroxidase 1:500 e peroxidase conjugada à estreptavidina por 1h30min, em agitação contínua à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS duas vezes de 15 minutos cada. A visualização da atividade da enzima peroxidase foi conseguida pela imersão dos cortes em tetrahydrocloroto 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 10 min, seguido pela adição, na mesma solução, de H₂O₂ 10% (1 μ l para cada ml de DAB) por 10 min. Após várias lavagens com PBS, as secções foram montadas em lâminas tratadas previamente com cromoalúmen. Estas foram secas, desidratadas com etanol, clareadas com xilol, e cobertas com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

Para controle do procedimento imunocitoquímico, alguns cortes foram

incubados em um meio ao qual foi omitido o anticorpo primário, sendo este substituído por PBS.

Os cortes foram examinados e fotografados no fotomicroscópio Nikon Optiphot II. Foram feitas representações gráficas dos astrócitos GFAP e vimentina-positivos de diferentes camadas da região CA1 e do giro denteado do hipocampo, de animais tratados e controles, com auxílio de câmera lúcida, acoplado ao microscópio Nikon Optiphot II.

2.3 Procedimento neuroquímico

2.3.1 Imunodeteção da Vimentina

Para a análise quantitativa do conteúdo imunodetectável de vimentina em fatias de hipocampo de animais imaturos controles e tratados, utilizou-se o método do “dot immunobinding” (ROCHA *et al.*, 1994). Para a preparação de cada amostra foi utilizado uma fatia transversal do hipocampo desses animais. As fatias foram colocadas em tubos “Eppendorf” contendo 10 μ l de tampão-HEPES, ao qual foi adicionado 90 μ l de uma solução de TBS, PMSF e EGTA, numa proporção de 98%, 1% e 1% respectivamente. A solubilização foi completada com o auxílio de um “pistilo” e homogeneizada com Vórtex. Foram retiradas alíquotas para dosagem de proteína, pelo método de Peterson (1977), mostrando que a quantidade total de proteínas hipocampais dos animais tratados comparado com os controles não era diferente. As amostras foram diluídas 1:2 e 1:4, e concentrações correspondentes a 100%, 50% e 25% de proteína foram utilizadas para determinar a linearidade do método. Das amostras não diluídas (100%) foram retiradas alíquotas de 0,3 μ l que foram aplicadas sobre membranas de nitrocelulose (2,5 x 1 cm) com uma micropipeta.

Para a imunodeteccão da vimentina, seguiu-se os seguintes procedimentos: bloqueio dos sítios de ligação não específicos na membrana de nitrocelulose com PVP 2% (PVP 2%; Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5; Tween 20 0,005%), por uma noite. Após, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo anti-vimentina, 1:400 em PVP 2%, por 1 hora sob agitação. Esta foi lavada 6 vezes com TTBS (TBS contendo Tween 20 0,005%) 5 minutos cada. O segundo anticorpo anti- IgG de camundongo biotilado foi diluído 1:2000 em PVP 2%, deixando-se incubando por 1 hora sob agitação. Lavou-se 3 vezes com TTBS, 10 minutos cada. A membrana foi então incubada com a enzima peroxidase conjugada à estreptavidina diluída 1:3000 em PVP2%, por 1 hora. A seguir foi lavada 4 vezes com TTBS e 2 vezes com TBS, 5 minutos cada. Depois da última lavada, ela foi submetida à reação com luminol (diacilhidrazida cíclica), para revelar os “imunodots”. O luminol é oxidado pela peroxidase em presença de H₂O₂, ficando a molécula em um estado excitado que, ao voltar para o estado fundamental, emite luz (quimioluminescência). A luz é amplificada pelos reagentes do ECL (“chemiluminescence enhancer”) e a quantidade emitida pode ser medida colocando-se um filme auto-radiográfico sobre a membrana, por 30 segundos ou mais. As impressões no filme foram quantificadas por densitometria (densitômetro de varredura “Hoefer Scientific Instruments”, San Francisco) para avaliar a quantidade de vimentina nas amostras provenientes de hipocampo de ratos filhos de mães tratadas e controles.

RESULTADOS

A litemia das fêmeas tratadas cronicamente com cloreto de lítio antes e durante a prenhez, e na lactação, ficou na faixa terapêutica para humanos, entre 0,6 e 1,2 mEq/L. A concentração de lítio no plasma dos filhotes dessas fêmeas ficou entre 0,3 e 0,6 mEq/L, o que comprova que o lítio passou através do leite materno. Levando em consideração as diferenças individuais entre os animais, observamos que níveis variados de lítio no plasma dos mesmos podem provocar efeitos morfológicos diferenciados, ou seja, dose-dependentes, que serão discutidos oportunamente no próximo ítem .

As ninhadas das fêmeas tratadas, que foram mantidas até o 15^o dia pós-natal em número de cinco animais, não apresentaram diferença no peso corporal em comparação às ninhadas controles, mantidas com 8 animais. Esta foi a maneira encontrada para descartar a possibilidade de desnutrição dos animais tratados.

A análise neuroquímica dos animais com 15 dias, usando a técnica de "dot-immunobinding", mostrou uma diminuição no imunoconteúdo de GFAP, bem como um aumento no imunoconteúdo de vimentina em fatias integrais de hipocampo dos animais tratados, comparados aos controles (Fig. 1).

Com a análise imunocitoquímica dos animais imaturos, com 15 dias, usando os anticorpos anti-GFAP e anti-vimentina, observou-se que tanto animais tratados quanto controles apresentaram astrócitos GFAP- e vimentina-positivos em todas as regiões do hipocampo, tornando possível a diferenciação das mesmas. Observou-se também a presença de glia radial vimentina- e GFAP-imunorreativa (IR) nas camadas granulosa e molecular do giro denteado (Figs. 5, 6, 7 e 8). A imunorreatividade da GFAP (GFAP-IR) e da vimentina (VIM-IR) foi localizada no citoplasma e nos processos dos astrócitos e glia radial, com a área nuclear sem imunorreação (Figs. 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

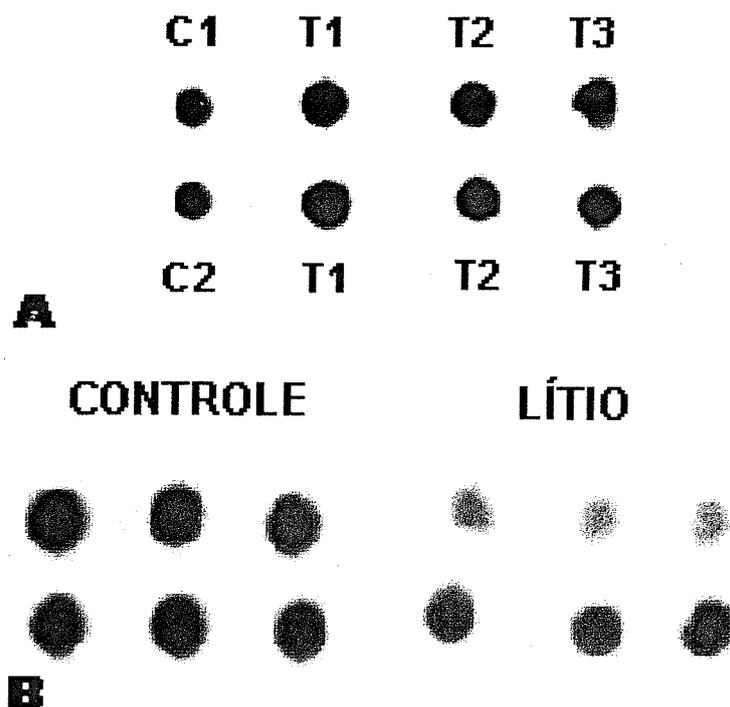


Figura 1: Representação ilustrativa de *DOT-immunobinding* de ratos imaturos, com 15 dias de idade. **A:** os DOTs representam VIM-IR; C1 e C2: fatias de dois animais controle diferentes; T1, T2 e T3: fatias de 3 animais tratados diferentes em triplicata. **B:** os DOTs representam GFAP-IR; CONTROLE: fatias de 2 animais diferentes em triplicata; LÍTIO: fatias de 2 animais diferentes em triplicata (ROCHA, 1996).

1. ANIMAIS CONTROLES

1.1 GFAP

Na região CA1 do hipocampo dos ratos controles, observou-se uma imunorreatividade seletiva à GFAP nas diferentes camadas. No estrato oriens os astrócitos imunomarcados mostraram prolongamentos que emergiam de todas as regiões do corpo, apresentando um aspecto estrelar. No estrato lacunoso-molecular, os astrócitos GFAP-positivos estavam mais intensamente marcados. Os prolongamentos apresentavam distribuição variada, porém predominava o aspecto estrelar. Em alguns dos astrócitos, os prolongamentos possuíam um comprimento importante. No giro denteado a imunorreatividade para GFAP foi maior do que na região CA1. Na camada granulosa os prolongamentos apresentaram-se com orientação perpendicular à superfície dorsal do hipocampo. No hilo, as células apresentaram maior imunomarcção com intensidade semelhante às células gliais do estrato lacunoso-molecular, mostrando um aspecto estrelar (Figs. 2A, 3A e 4A).

1.2 Vimentina

Aos 15 dias pós-natal, nos ratos controles, a imunorreatividade à vimentina (VIM-IR) foi escassa, tanto no corno de Ammon como no giro denteado. Não obstante, nesta última região ainda persiste imunorreatividade em glias radiais, com seu corpo celular na camada sub-granulosa e seus prolongamentos em forma de candelabro, percorrendo as camadas granulosa e molecular. Também no hilo identificaram-se astrócitos estrelados VIM-IR. Foram detectados vasos com imunomarcção rodeando-os (Figs.5A, 6A e 7A).

2. ANIMAIS TRATADOS

2.1 GFAP

Os astrócitos dos estratos oriens e piramidal parecem não sofrer alterações após o tratamento com lítio. Nas camadas radiatum e lacunosomolecular, observou-se uma diminuição na imunorreatividade à GFAP, comparado ao controle. No giro denteado, as células GFAP-positivas também foram escassas, sempre em menor quantidade do que nos animais controles. Essa diferença foi mais pronunciada no hilo do giro denteado. Não foram observadas mudanças na morfologia celular e no direcionamento dos processos astrocíticos. Observou-se também a presença de pouca glia radial imunorreativa à GFAP, nas camadas granulosa e molecular do giro denteado (Figs. 2B, 3B e 4B).

Sugerimos que esta diminuição da GFAP-IR corresponda a um atraso no desenvolvimento astrogliar.

2.2 Vimentina

Nos animais que a mãe foi tratada com lítio, estes com a mesma idade que os ratos controles, a expressão da imunorreatividade à vimentina aumentou. No corno de Ammon, identificaram-se alguns processos marcados, localizados nas camadas oriens e radiatum. No giro denteado a imunorreatividade foi mais forte nos processos gliais que percorriam as camadas granulosa e molecular, apresentando o aspecto de glia radial em candelabro. O número de células VIM-IR foi muito aumentado em relação ao grupo controle. Também destacaram-se o número e a intensidade da imunorreação nos astrócitos estelares do hilo do giro denteado, porém não foi detectada nenhuma célula radial com imunomarcagem nesta região (Figs. 5B,

6B, 7B e 8).

Já um animal cuja litemia ficou em 0,6 mEq/L, acima da média de 0,4 mEq/L, observou-se um efeito contrário ao detectado nos demais animais, mostrando uma redução das células marcadas com vimentina em todas as regiões do hipocampo (não mostrado).

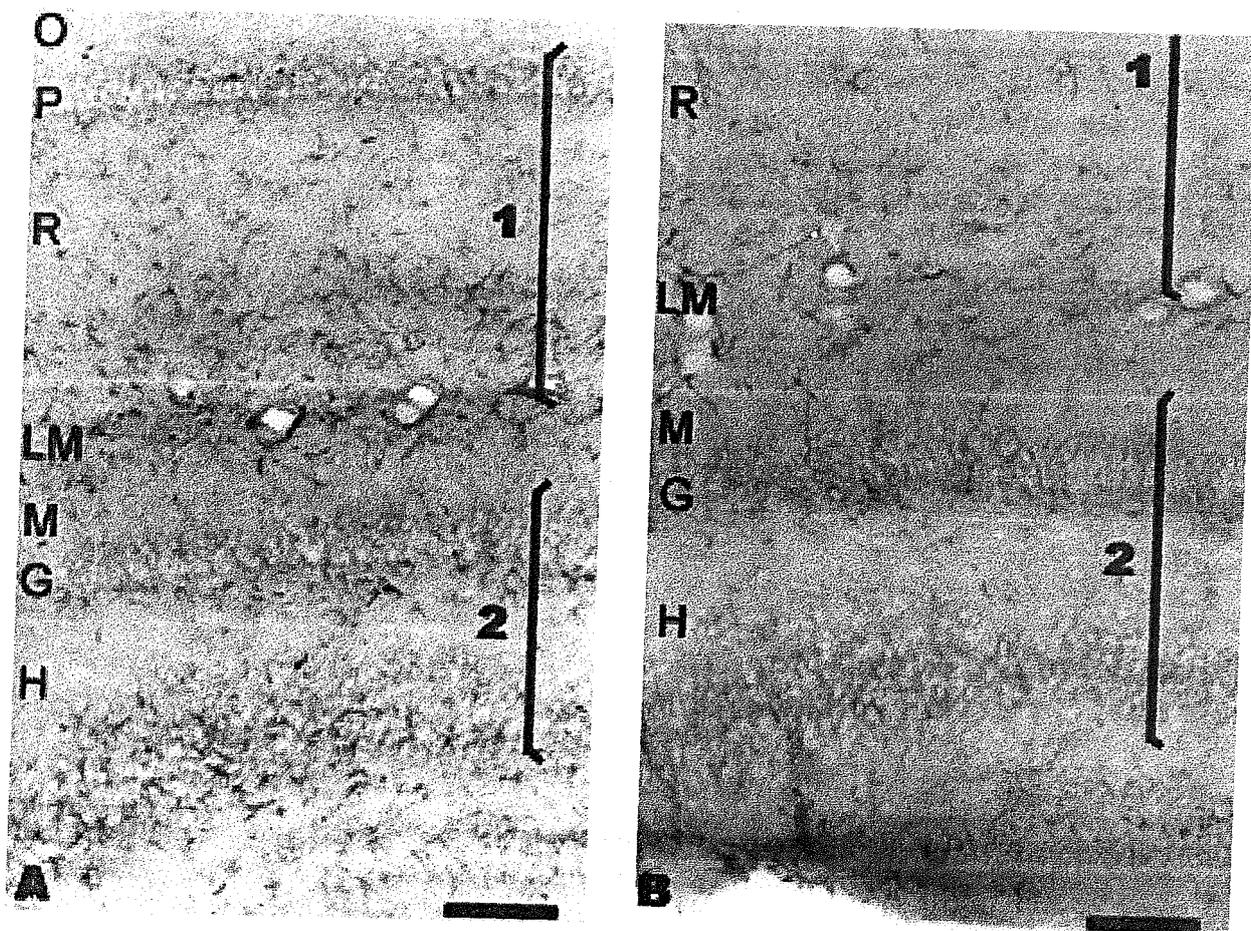


Figura 2

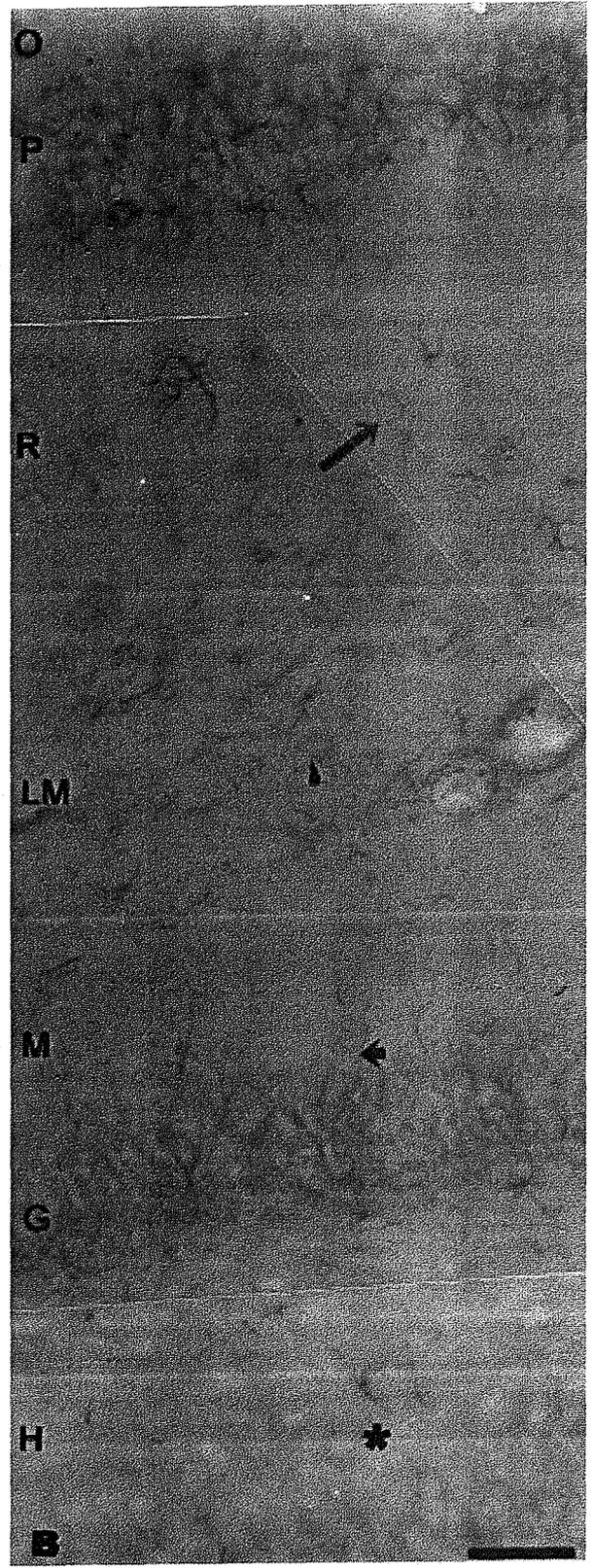
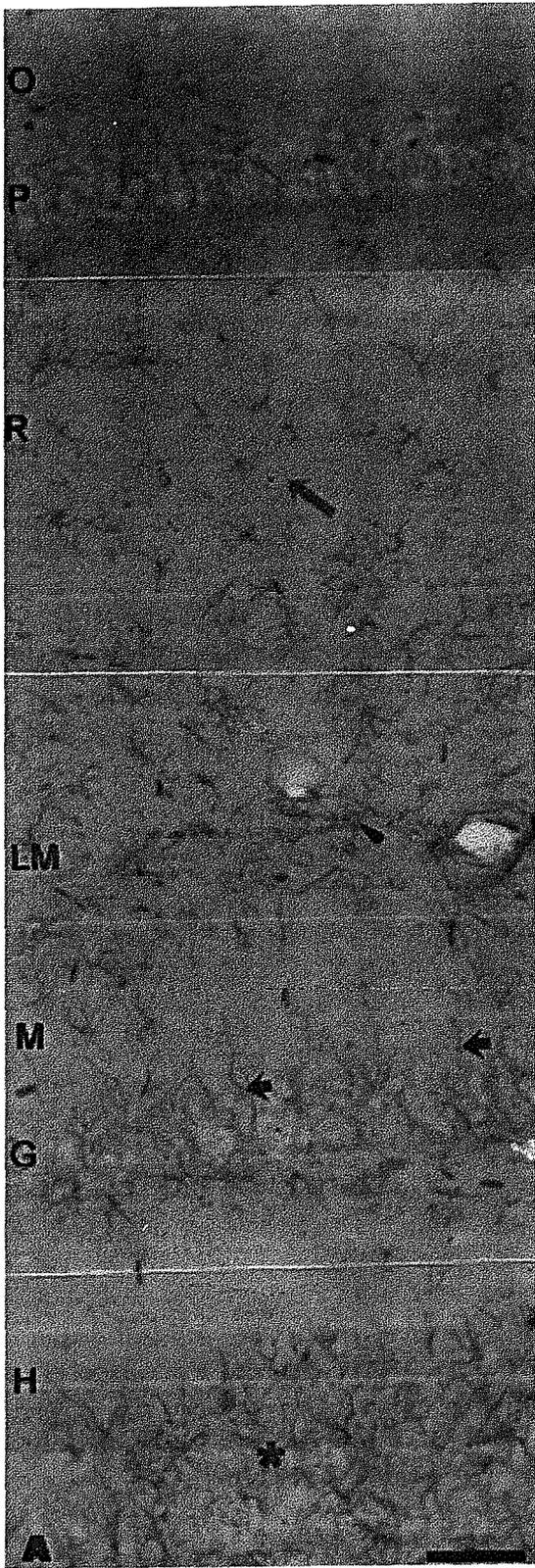


Figura 3

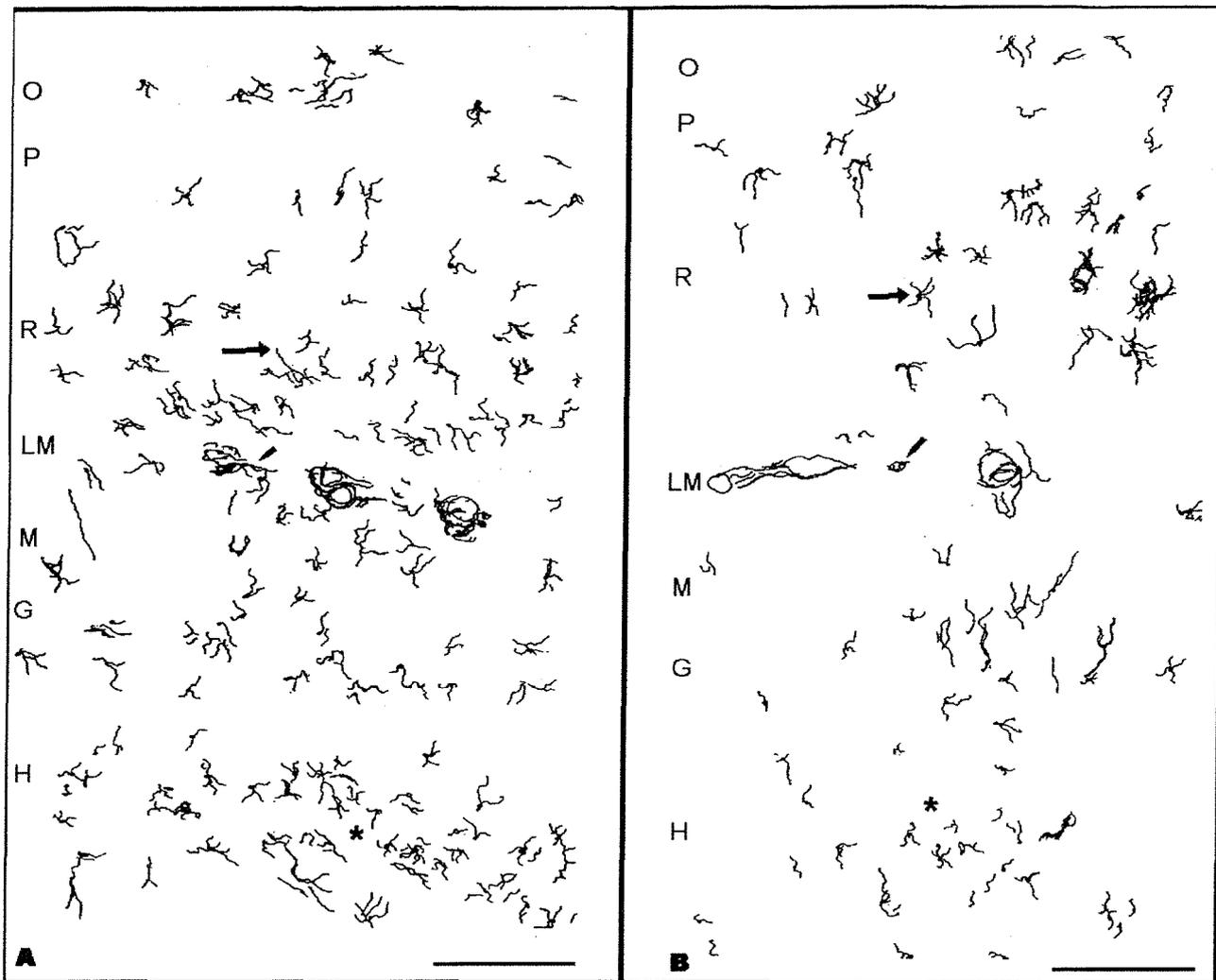


Figura 4: Desenho obtido através de câmera lúcida de cortes de hipocampo marcados com GFAP, mostrando astrócitos da região CA1 e giro dentado. **A:** animal controle, os astrócitos apresentam maior imunorreatividade nos estratos radiatum (R; seta) e lacunoso-moleculare (LM; cabeça de seta). O hilo (H) apresenta forte imunorreatividade para GFAP, com células com aspecto estrelado (asterisco). **B:** animal tratado, apresenta menor imunomarcção para GFAP nos estratos radiatum (R; seta) e lacunoso-moleculare (LM; cabeça de seta) da região CA1, bem como no hilo (H; asterisco) do giro dentado. **O:** estrato oriens; **P:** estrato piramidal; **R:** estrato radiatum; **LM:** estrato lacunoso-moleculare; **M:** camada molecular; **G:** camada granulosa; **H:** hilo. Barras **A** e **B**= 50 μ m.

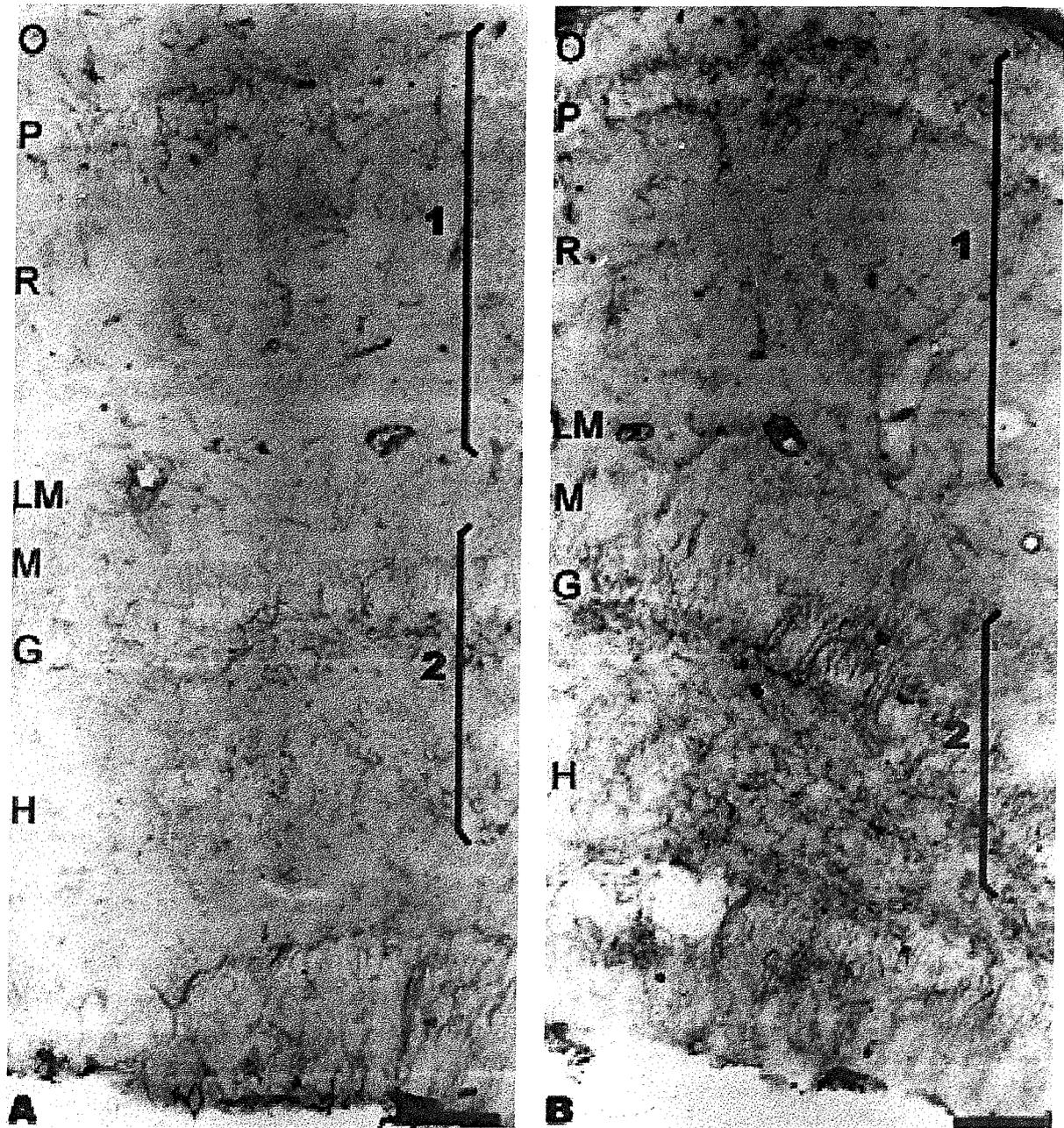


Figura 5



Figura 6

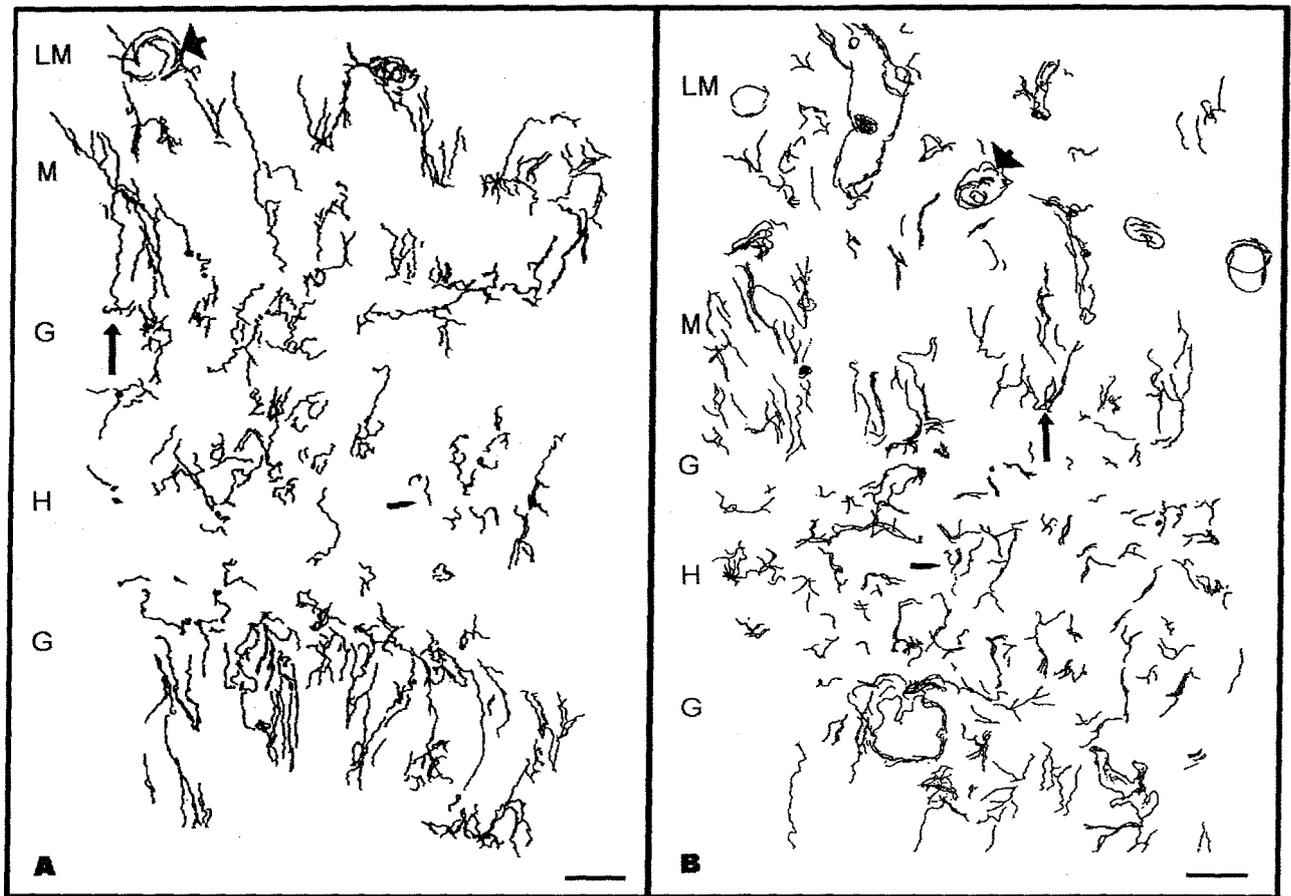


Figura 7: Desenho obtido através de câmera lúcida de cortes de hipocampo marcados com vimentina, mostrando astrócitos da camada lacunoso-molecular (LM) da região CA1 e giro dentado. **A:** animal controle, as células apresentam pouca imunomarcção na camada granulosa (G; seta longa) e no hilo (H; cabeça de seta) do giro dentado. Notar vasos imunomarcados no estrato lacunoso-molecular (LM; seta curta) da região CA1. **B:** animal tratado, maior número de glias radiais em forma de candelabro na camada granulosa (G; seta longa) do giro dentado. No hilo (H; cabeça de seta) os astrócitos imaturos apresentam forte imunorreatividade para vimentina. Na camada lacunoso-molecular (LM) da região CA1, observar a imunomarcção dos vasos (seta curta). **LM:** estrato lacunoso-molecular; **M:** camada molecular; **G:** camada granulosa; **H:** hilo. Barras **A** e **B**= 50 μ m.

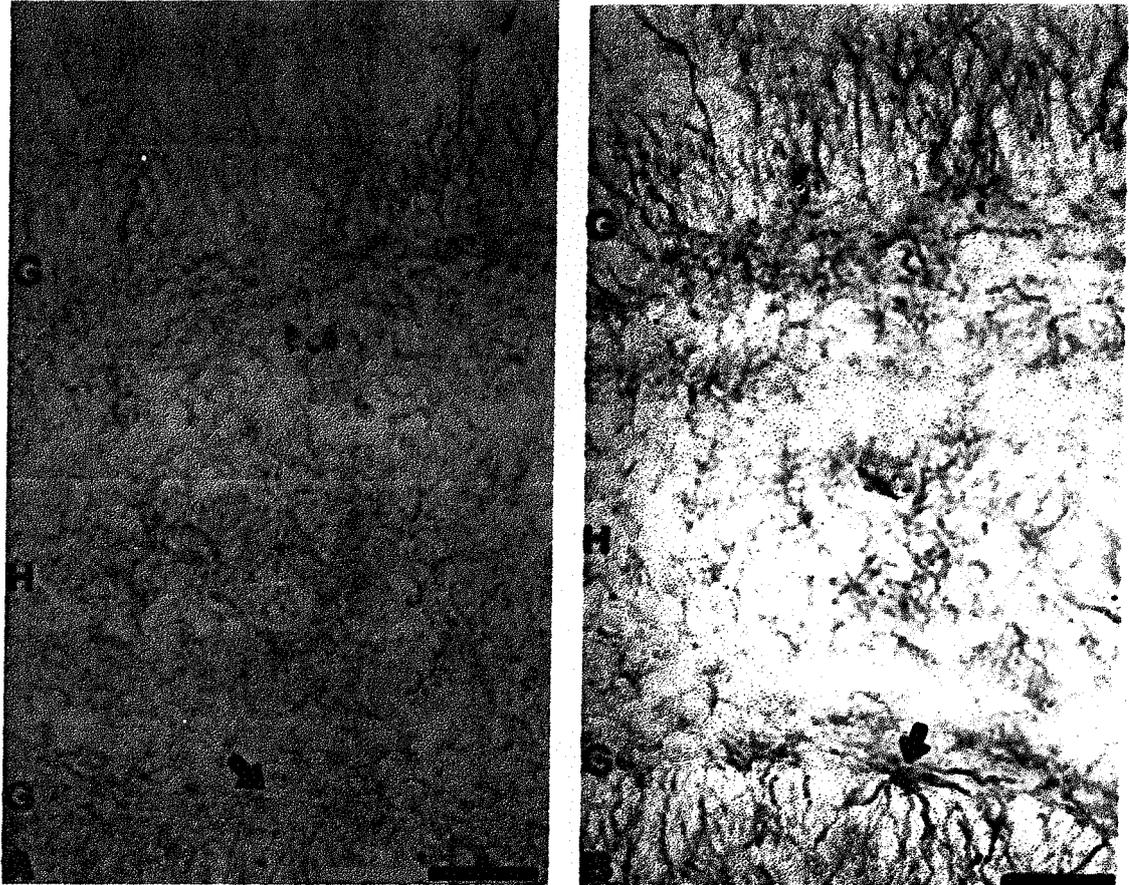


Figura 8: Fotomicrografias do giro denteado de animais imaturos marcados com vimentina. A: animal controle, observar a escassa presença de glias radiais em forma de candelabro na camada granulosa (G; seta). B: animal tratado, maior número de glias radiais em forma de candelabro imunomarcadas na camada granulosa (G; seta). G: camada granulosa; H: hilo. Barras A e B= 50µm.

DISCUSSÃO

O perfil morfológico dos astrócitos imunorreativos seguiu o padrão observado por *Nixdorf-Bergweiler et al.* (1994), onde os astrócitos imaturos possuíam pequenos corpos celulares com forma arredondada ou oval e processos curtos e orientados radialmente.

Os resultados imunocitoquímicos mostram uma vulnerabilidade seletiva do hipocampo ao tratamento com cloreto de lítio. Tal seletividade pode ser devida a vários fatores, tendo em vista que diversos parâmetros neuroanatômicos e neuroquímicos diferem ao longo do eixo temporo-septal do hipocampo (*SCHMIDT-KASTNER et al.*, 1991). Mesmo com a aparente homogeneidade hipocampal, há diferenças regionais na inervação neuroquímica (*PAXINOS*, 1995).

A exposição pré- e pós-natal ao cloreto de lítio crônico, que resultou em animais de 15 dias com litemia média de 0,4 mEq/L, parece atrasar o desenvolvimento astrogliar no hipocampo de ratos imaturos. Os resultados mostraram uma diminuição regional na imunorreatividade à GFAP e um aumento na imunorreatividade à vimentina, bem como um aumento em sua quantidade imunorreativa em fatias integrais, no hipocampo dos animais tratados em comparação aos controles, sugerindo um atraso na transformação da glia radial para astrócitos. Esse efeito pode ser devido (a) à ação direta do lítio sobre os astrócitos hipocampais, (b) à ação do lítio sobre neurônios hipocampais, resultando em um efeito secundário sobre os astrócitos, (c) ou a um efeito em outra região cerebral que reflita em mudanças no hipocampo.

No cérebro normal, a passagem da glia radial para astrócitos acontece por volta do 7^o dia pós-natal. Até o 20^o dia pós-natal ocorre o desaparecimento das células gliais corticais positivas à vimentina e o aumento do número de astrócitos GFAP-positivos (*PIXLEY et al.*, 1984; *RICKMANN et al.*, 1987). O tratamento com LiCl parece estar retardando essa passagem de

glia radial para astrócitos.

A diminuição na imunomarcção à GFAP, está de acordo com resultados prévios (ROCHA, 1996) que mostraram uma diminuição de 53 % na quantidade de GFAP-imunorreativa em fatias de hipocampo de animais imaturos filhos de mães tratadas com LiCl (Fig. 1B).

Observou-se um aumento regional na imunomarcção para vimentina, o que confirma o aumento na quantidade imunorreativa total, analisada pelo método do “dot-immunobinding”, em fatias integrais do hipocampo dos animais tratados (Figs. 1A, 5, 6 e 7). Esse é outro indício que comprova o efeito do lítio sobre o desenvolvimento astrogliar, sugerindo um retardo na diferenciação da glia radial para astrócitos, ou seja, a glia radial persiste por mais tempo no hipocampo dos animais tratados. Pode também estar havendo um atraso no amadurecimento dos astrócitos imaturos, caracterizados por apresentarem vimentina como seu principal filamento intermediário.

O efeito do tratamento com lítio foi mais pronunciado no giro denteado, mostrando que essa região foi mais vulnerável ao tratamento. De fato, encontrou-se mais glia radial na interface das camadas granulosa e molecular do giro no hipocampo dos animais tratados do que no hipocampo dos animais controles, bem como uma maior marcação dos astrócitos estelares VIM-positivos no hilo, que caracterizam astrócitos mais imaturos do que os dos controles (Figs. 5, 6, 7 e 8).

Então, como o giro denteado se caracteriza por ser a última região hipocampal a ter seu desenvolvimento celular completado (STANFIELD *et al.*, 1979; ALTMAN *et al.*, 1990), tal vulnerabilidade ao lítio pode estar ocorrendo em um período mais posterior da morfogênese hipocampal, com isso afetando seletivamente o giro denteado, uma vez que as regiões CA já tenham terminado seu desenvolvimento.

Uma seletividade foi encontrada também em animais submetidos à isquemia, como mostrado por Schmidt-Kastner *et al.* (1991), onde a região CA1 e o hilo do giro denteado foram vulneráveis, enquanto que a área

adjacente CA3 e o giro denteado foram resistentes. As lesões hilares sempre precederam os danos na camada CA1 (SCHMIDT-KASTNER *et al.*, 1991).

Assim como os neurônios, as células astrogliais também liberam fatores neurotróficos e/ou fatores que promovem o crescimento neurítico. A expressão dessas moléculas ocorre durante o desenvolvimento e também após lesões no SNC, sendo que alguns fatores de crescimento possuem efeitos protetores ou regenerativos sobre os neurônios seguindo lesões traumáticas, químicas ou isquêmicas (MÜLLER *et al.*, 1995).

Neste caso, o lítio, através de seus efeitos sobre os neurônios, que são bastante estudados, agindo nos sistemas de transdução de sinais extracelulares que geram segundos mensageiros, poderia estar modulando a liberação de neuromoduladores, como neurotransmissores e fatores tróficos que seriam responsáveis pela plasticidade astrogliar. Por outro lado, as mudanças desenvolvimentais apresentadas pelos astrócitos, devido ao tratamento com lítio, podem estar relacionadas a mudanças na função dos mesmos, o que poderia alterar também a liberação de fatores tróficos que agiriam sobre os neurônios causando fenômenos plásticos, como pequenas alterações morfológicas e alterações metabólicas variadas.

Foi evidenciado que o fator de crescimento neuronal (NGF) existe em altas concentrações no hipocampo e sua atividade elevou-se em lesões no fórnix-fímbria e na via perforante (PP) (GAGE *et al.*, 1988). O conceito emergente é que o NGF seja sintetizado no hipocampo e transportado num sentido retrógrado para os neurônios colinérgicos do “forebrain” basal. Transecção dessas fibras colinérgicas ascendentes, bloqueiam o transporte retrógrado de NGF, resultando no acúmulo do mesmo no hipocampo (GAGE *et al.*, 1988).

No pólo temporal do hipocampo, transecções da via perforante que destróem a aferência entorrinal para a camada molecular externa das células granulares do giro denteado, resultam em uma dramática sinaptogênese reativa, exemplificada pelo brotamento de fibras colinérgicas da camada

molecular interna para preencher a zona molecular externa (GAGE *et al.*, 1988).

Foi mostrado que a atividade do NGF aumentou no giro denteado seguindo lesão à via perforante. Então, é razoável sugerir que o brotamento colinérgico observado na zona molecular externa possa ter sido provocado pelo aumento na atividade do NGF nesta zona (GAGE *et al.*, 1988).

As células GFAP-IR estão envolvidas no brotamento responsivo ao NGF dos neurônios colinérgicos central e dos neurônios catecolaminérgicos periférico que ocorre na mesma área seguindo estas lesões (GAGE *et al.*, 1988). Os astrócitos ativados secretam NGF na região da camada molecular externa do giro denteado, o qual resulta em uma atração de mais fibras colinérgicas que expressam receptor NGF nas suas membranas (GAGE *et al.*, 1988).

Sabe-se que os astrócitos estão relacionados no direcionamento da migração neuronal, agindo como guia, e também podendo influenciar no crescimento e diferenciação neuronais pela liberação de fatores neurotróficos. Da mesma forma, sabe-se que os neurônios regulam a proliferação e a morfologia das células astrogliais. Então, possivelmente, mudanças morfológicas observadas em astrócitos hipocâmpais de ratos sejam um reflexo das interações entre os processos neuronais e as células gliais (NIXDORF-BERGWEILER *et al.*, 1994).

Por outro lado, esses trabalhos mostram que uma alteração em células hipocâmpais possam ser o reflexo a uma lesão ocorrida em outra região cerebral que possua interconexões com o hipocampo. Com o lítio pode estar ocorrendo algo semelhante, o que poderia explicar também o efeito seletivo desse íon sobre o giro denteado, uma vez que aferências como por exemplo as vindas do córtex entorrinal, a via perforante, chegam ao hipocampo pelo giro denteado.

Outros tratamentos também mostraram um efeito sobre o desenvolvimento das células gliais, através da transformação das células

radiais para astrócitos.

O tratamento de ratos com outros íons, como por exemplo o chumbo, numa administração desde o nascimento, fez com que estes apresentassem, após 60 e 90 dias do início do tratamento, hipertrofia dos astrócitos do cerebelo e hipocampo, representada pelo aumento de imunorreatividade para a GFAP. Esta modificação no citoesqueleto dos astrócitos pode alterar suas funções, modificando a complexa relação astrócito-neurônio (SELVÍN-TESTA *et al.*, 1994).

Exposição pré-natal ao etanol, afetou a transformação e a proliferação dos astrócitos. A diminuição da marcação à vimentina induzida pelo etanol durante a segunda semana pós-natal e o aumento concomitante de células GFAP-IR indicam que o etanol acelerou a transformação da glia radial em astrócitos (MILLER *et al.*, 1993). O período entre o 4^o e o 10^o dia pós-natal é marcado pela transformação da glia radial em astrócitos e pelo aumento na proliferação glial (MILLER *et al.*, 1993).

Franke (1995) mostrou que o tratamento com etanol 10% por 36 semanas, provocou uma diminuição da GFAP-IR, juntamente com uma diminuição do número de astrócitos no estrato molecular do giro denteado, em hipocampo de ratos.

Estes resultados demonstram que os astrócitos hipocampais respondem de maneira diferenciada às mais variadas situações a que o cérebro está exposto.

Uma vez que o desenvolvimento dos astrócitos em ratos ocorre principalmente durante o período pós-natal, esses resultados sugerem que o etanol afete os principais precursores da astroglia, a glia radial, a qual aparece durante o início da neuroembriogênese (VALLÉS *et al.*, 1996). A exposição crônica ao etanol *in útero* diminuiu significativamente a imunorreatividade à GFAP e os níveis de seu RNAm, ambos *in vivo* e *in cultura* primária de glia radial. Diminuiu também a expressão da GFAP, devido à redução em sua taxa de transcrição, que parece estar associada com o estado de hipermetilação do

DNA da GFAP (VALLÉS *et al.*, 1997). Em contraste, os níveis de vimentina não foram afetados significativamente pelo etanol. Esses resultados sugerem que a exposição ao etanol durante os estágios iniciais embrionário/fetal altere a diferenciação da glia radial, prejudicando sua transformação em astrócitos (VALLÉS *et al.*, 1996 e 1997). Exposição pós-natal a altos níveis de etanol, causou astrogliose transitória manifestada por aumento na imunorreatividade à GFAP e nos níveis de seu RNAm em córtex cerebral de ratos. Estes resultados sugerem que o efeito do etanol nos astrócitos e na expressão da GFAP, seja dependente dos níveis de etanol, duração e tempo de exposição ao mesmo e ao estágio de maturação glial (VALLÉS *et al.*, 1997).

Considerando que os efeitos do etanol parecem ser dose dependentes, neste caso, sugerimos que as diferenças individuais na concentração de lítio no plasma dos animais tratados, podem ter efeitos morfológicos diferentes. Durante nosso estudo, observamos um animal cuja litemia ficou em 0,6 mEq/L, nível mais elevado do que a média que foi de 0,4 mEq/L. A análise morfológica das lâminas com cortes hipocâmpais desse animal, mostrou um efeito contrário ao observado nos demais animais que se mantiveram na faixa de litemia média, houve uma redução das células VIM-IR no hipocampo do animal tratado. Altas litemias, entre 1,7 - 2,0 mEq/L, em animais adultos tratados com lítio, aumentaram o estado de fosforilação de algumas proteínas, como a vimentina, que em situações de litemia dentro da faixa terapêutica para humanos, não é afetada em seu estado fosforilativo (ROCHA, 1996). Este dado pode estar apontando para um efeito morfológico diferenciado relacionado à variação na litemia, o que será investigado posteriormente.

Assim como o tratamento com etanol, a exposição pré-natal ao lítio pode estar afetando a expressão gênica para GFAP. Sabe-se que o gene que codifica a GFAP possui um promotor com múltiplos domínios, que podem ser afetados por uma série de moléculas, entre elas o AMPc (HATTEN *et al.*, 1991). A proteína quinase A (PKA), dependente de AMPc é translocada do citosol para o núcleo por ação do lítio e outros antidepressivos (GUITART *et*

al., 1992). *Ozaki et al.* (1997) relatam que o tratamento crônico de ratos com carbonato de lítio aumentou significativamente a atividade de alguns fatores de transcrição como o Jun, Fos e o CREB, que podem estar envolvidos na expressão da GFAP e em um aumento na GFAP-IR, caracterizando uma gliose.

No caso deste estudo, sugere-se que o lítio possa estar inibindo a atividade de alguns fatores de transcrição nos animais com 15 dias, o que é passível de verificação.

O tratamento crônico de ratos adultos com LiCl, resultou em astrogliose reativa, com hipertrofia celular, caracterizada pelo aumento das células GFAP-IR, bem como mudanças na orientação dos processos astrocíticos no hipocampo. Ocorreu também aumento do imunocontéudo de GFAP nos mesmos animais (ROCHA, 1996). Isso mostra que o lítio age de forma diferenciada no cérebro de animais adultos e imaturos, talvez pela diferença no estado de maturação celular, ou por diferenças na vulnerabilidade nas diferentes idades, ou até mesmo pela diferente via de administração do lítio.

A exposição pré-natal à cocaína causa alteração no desenvolvimento normal do cérebro de ratos. Nos animais expostos pré-natalmente à cocaína, o aumento na marcação da vimentina indica que a grande proporção de células astrogliais estavam no estágio de desenvolvimento da glia radial. Uma vez que a glia radial tem um importante papel na migração neuronal e no crescimento dos neurônios, pode-se esperar que o aumento da vimentina possa ser acompanhado pela presença contínua de marcadores neuronais imaturos. Nos animais expostos à cocaína, houve uma perda dramática nos astrócitos em proliferação na zona subventricular. Células do giro denteado marcadas positivamente para GFAP foram em menor número nos animais expostos à cocaína do que nos controles. Isso pode representar uma diminuição na proliferação de astrócitos e neurônios, uma vez que o giro denteado é uma das poucas regiões do cérebro que continuam a mostrar neurogênese pelo 6^o dia

pós-natal. Porém há um aumento na marcação das células da camada piramidal na região CA3 do hipocampo. Uma possível explicação para esse efeito é a possível similaridade da ação da cocaína em cérebros imaturos e maduros na liberação e inibição da recaptação das principais monoaminas neurotransmissoras dopamina, noradrenalina, e serotonina. Foi mostrado que a liberação de serotonina induzida por cocaína foi maior no cérebro imaturo do que no maduro. Então, o tratamento crônico com cocaína pode esgotar a serotonina do cérebro fetal e levar a um atraso na maturação astrogliar. No giro denteado há mais serotonina do que na região CA3, onde a quantidade de noradrenalina é muito maior que a de serotonina (CLARKE *et al.*, 1996).

O lítio aumenta a liberação de serotonina e noradrenalina (WANG *et al.*, 1989; GOODMAN & GILMAN, 1996) e dessensibiliza auto-receptores pré-sinápticos para serotonina (WANG *et al.*, 1988). Tanto as regiões CA3 e CA1 como o giro denteado recebem aferências noradrenérgicas e serotoninérgicas conforme foi citado na introdução (página 31), porém o giro denteado possui mais aporte de serotonina do que a região CA3. A serotonina está envolvida na maturação, migração e produção de fatores de crescimento pelos astrócitos (CLARKE *et al.*, 1996). Estes dados sugerem que o lítio possa ter um efeito semelhante ao efeito da cocaína sobre o cérebro dos animais imaturos, uma vez que o perfil de alterações ocorridas sob efeito do lítio lembra as ocorridas sob a ação da cocaína.

Outra hipótese é que alterações ocorridas sobre outras áreas que projetam fibras monoaminérgicas para o hipocampo, também contribuam, indiretamente, para as mudanças morfológicas encontradas nos astrócitos do giro denteado.

Muitas das hipóteses aqui citadas para explicar as mudanças morfológicas no hipocampo de animais imaturos, necessitam de estudos mais aprofundados, que serão sugeridos adiante no ítem de perspectivas.

Cabe salientar que esse trabalho faz parte de um projeto pioneiro para estudar os efeitos do lítio sobre os astrócitos de cérebro de ratos tratados

cronicamente com LiCl. Não foi encontrada nenhuma referência na literatura especializada sobre os efeitos do lítio no período de desenvolvimento cerebral estudado, destacando portanto a importância de um estudo como esse.

Muitas mulheres são tratadas com sais de lítio durante sua fase de fertilidade. O lítio teria efeitos abortivos e teratogênicos, porém esses efeitos não foram confirmados ainda. Em caso de gravidez, recomenda-se a suspensão do tratamento, uma vez que não se tem certeza do efeito do lítio sobre o feto. Esse estudo tem importância clínica no sentido que vem reforçar as recomendações acima, mostrando que o tratamento de fêmeas com lítio alterou o desenvolvimento hipocampal de seus filhotes, o que poderá resultar em profundas alterações no desenvolvimento normal dos mesmos, bem como no comportamento, aprendizado, desenvolvimento motor, entre outros.

CONCLUSÕES

O tratamento crônico de fêmeas adultas com LiCl antes e durante a prenhez, e na lactação, mostrou que em animais com 15 dias de idade, a litemia ficou na média de 0,4 mEq/L, dentro da faixa terapêutica para humanos. Observou-se um aumento na marcação regional dos astrócitos VIM-IR e uma diminuição dos astrócitos GFAP-IR no hipocampo dos filhos de mães tratadas, em relação aos controles da mesma idade, porém sem alterações morfológicas. Ocorreu um aumento no imunoconteúdo total de vimentina no hipocampo desses animais, bem como uma diminuição da quantidade de GFAP imunorreativa, mostrada em trabalho realizado previamente, com animais que receberam o mesmo tratamento (ROCHA, 1996). Esses resultados indicam que o tratamento com lítio esteja atrasando o desenvolvimento astrogliar, por um provável retardo na transformação da glia radial para astrócitos.

Embora existam muitos estudos sobre o mecanismo de ação do lítio e seu efeito sobre o SNC, tais estudos foram realizados apenas em neurônios, não havendo referências sobre esse assunto em astrócitos nem neste período de desenvolvimento cerebral. Desta forma, esse trabalho possui uma importância fundamental, que é tentar esclarecer alguns efeitos do Li^+ sobre o desenvolvimento do SNC, enfocando as células astrogliais, levando em consideração sua íntima relação com os neurônios.

PERSPECTIVAS

Com base nos resultados anteriores, propomos como prosseguimento a esse trabalho:

↳ Para verificar se a diminuição na imunomarcção da GFAP é devido a uma diminuição no número de células astrogliais:

Realização da técnica histológica de marcação com Hematoxilina-Eosina, onde através da contagem de núcleos celulares verificaremos a possível ocorrência de perda celular;

Marcação com Timidina marcada (PETITO *et al.*, 1990), para verificar a expressão gênica (DNA) e analisar se houve ou não mitoses.

↳ Para verificar se o efeito do lítio é diretamente sobre os astrócitos ou é um reflexo de alterações sobre os neurônios:

Em fatias hipocampais, analisar o imunocontéudo das proteínas GFAP e vimentina, por técnicas de imunodeteção, separadamente nas regiões CA3, CA2, CA1 e o giro denteado

Tratamento de culturas primárias de astrócitos, com várias concentrações de lítio, e verificar os parâmetros neuroquímicos, como fosforilação e imunodeteção, bem como os parâmetros morfológicos, analisando tanto GFAP como vimentina;

Tratamento de cultura primária de neurônios, com várias concentrações de lítio e analisando os mesmos parâmetros acima, com outras proteínas marcadoras.

↳ Para verificar os diferentes efeitos do LiCl em cérebro de animais jovens e adultos:

Mapeamento do efeito do tratamento crônico com LiCl, gerando variadas litemia, em animais com várias idades, realizando estudos neuroquímicos e morfológicos, bem como estudos comportamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. **J. Comp. Neurol.**, **301**: 325 - 342, 1990.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. **J. Comp. Neurol.**, **301**: 343 - 364, 1990.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. **J. Comp. Neurol.**, **301**: 365 - 381, 1990.
- ATAK, J. R.; BROUGHTON, H. B.; POLLACK, S. J. Inositol Monophosphatase - a Putative Target for Li⁺ in the Treatment of Bipolar Disorder. **T.L.N.S.**, **18**: 343- 349, 1995.
- AVISSAR, S.; MURPHY, D. L.; SCHREIBER, G. Magnesium reversal of lithium inhibition of β -adrenergic and muscarinic receptor coupling to G proteins. **Biochem. Pharmacol.**, **41/2**: 171 - 175, 1991.
- BEVAN, S. Ion channels and neurotransmitter receptors in glia. **Seminars in The Neurosciences**, **2**: 467 - 481, 1990.
- CALVO, J. L.; CARBONELL, A. L.; BOYA, J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein in reactive astrocytes following brain injury in rats. **Brain Res.**, **566**: 333 - 336, 1991.
- CHO, Y. W. Lithium-induced inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase and Ca²⁺/ATPase activities in rat brain synaptosomes. **J. Korean - Med.- Sci.**, **10**: 7 - 13, 1995.
- CHRISTENSEN, S.; KUSANO, E.; YUSIFI, A. N. K.; MURAYAMA, N.; DOUSA, T. P. Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus due to chronic administration of lithium in rats. **J. Clin. Invest.**, **75**: 1869 - 1879, 1985.
- CLARKE, C.; CLARKE, K.; MUNEYYIRCI, J.; AZMITIA, E.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. Prenatal cocaine delays astroglial maturation: immunodensitometry shows increased markers of immaturity (vimentin and GAP-43) and decreased proliferation and production of the growth factor S-100.

- Develop. Brain Res.**, **91**: 268 - 273, 1996.
- COLE, G. J.; LEE, J. Immunocytochemical localization of a novel radial glial intermediate filament protein. **Develop. Brain Res.**, **101**: 225 - 238, 1997.
- COTMAN, C. W.; GÓMEZ-PINILLA, F.; KAHLE, J. S.. Neural Plasticity and Regeneration. *In*: SIEGEL, G.J.; et al. (eds.), **Basic Neurochemistry**, 5th Ed., New York, Raven Press, 1994.
- DALBY, N. O.; RONDOUIN, G.; LERNER-NATOLI, M. Increase in GAP-43 and GFAP Immunoreactivity in the Hippocampus Subsequent to Perforant Path Kindling. **J. Neurosci. Res.**, **41**: 613 - 619, 1995.
- DALMAU, I.; FINSEN, B.; TONDER, N.; ZIMMER, J.; GONZÁLEZ, B.; CASTELLANO, B. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. **J. Comp. Neurol.**, **377**: 70 - 84, 1997.
- DRINGEN, R.; GEBHARDT, R.; HAMPRECHT, B. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. **Brain Res.**, **623**: 208 - 214, 1993.
- ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S. GFAP and Astrogliosis. **Brain Pathol.**, **4**: 229-237, 1994.
- FRANKE, H. Influence of chronic alcohol treatment on the GFAP-immunoreactivity in astrocytes of the hippocampus in rats. **Acta Histochem.**, **97**: 263 - 271, 1995.
- GAGE, F. H.; OLEJNICZAK, P.; ARMSTRONG, D. M. Astrocytes are important for sprouting in the septohippocampal circuit. **Exp. Neurol.**, **102(1)**: 2-13, 1988.
- GALOU, M.; COLUCCI-GUYON, E.; ENSERGUEIX, D.; RIDET, J.; GIMENEZ Y RIBOTTA, M.; PRIVAT, A.; BABINET, C.; DUPOUEY, P. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. **J. Cell Biol.**, **133/4**: 853 - 863, 1996.
- GLOWINSKI, J.; MARIN, P.; TENCE, M.; STELLA, N.; GIAUME, C.; PREMONT, J. Glial receptors and their intervention in astrocyto-astrocytic and astrocyto-neuronal interactions. **Glia**, **11**: 201 - 208, 1994.
- GONÇALVES, C. A.; RODNIGHT, R. Apparent identity of ppH-47, a protein highly phosphorylated in the hippocampus with a form of glial fibrillary acidic protein. **Neurosci. Res. Commun.**, **11**: 109 - 117, 1992.
- GOODLETT, C. R.; LEO, J. T.; O'CALLAGHAN, J. P.; MAHONEY, J.; WEST, J. R. Transient cortical astrogliosis induced by alcohol exposure during the neonatal brain growth spurt in rats. **Dev. Brain Res.**, **72**: 85 - 97, 1993.
- GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**, 9 ed.

International Edition, 1996.

- GUITART, X.; NESTLER, E. J. Chronic administration of lithium or other antidepressants increases levels of DARPP-32 in frontal cortex. **J. Neurochem.**, **59**: 1164 - 1167, 1992.
- HATTEN, M. E.; LIEM, R. K. H.; SHELANSKI, M. L.; MASON, C. A. Astroglia in CNS injury. **Glia**, **4**: 233 - 243, 1991.
- HAWRYLAK, N.; GREENOUGH, W. T. Monocular deprivation alters the morphology of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytes in the rat visual cortex. **Brain Res.**, **683**: 187 - 199, 1995.
- HIRVONEN, M. Cerebral lithium, inositol and inositol monophosphatases. **Pharmacol. & Toxicol.**, **69**: 22 - 27, 1991.
- HOZUMI, I.; CHIU, F.; NORTON, W. T. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. **Brain Res.**, **524**: 64 - 71, 1990.
- INAGAKI, M.; NAKAMURA, Y.; TAKEDA, M.; NISHIMURA, T.; INAGAKI, N. Glial Fibrillary Acidic Protein: Dynamic Property and Regulation by Phosphorylation. **Brain Pathol.**, **4**: 239 - 243, 1994.
- JACOBSON, M. Neuroglial ontogeny. In: JACOBSON, M. (eds.), **Develop. Neurobiology**, 3th Ed., Plenum Press, New York and London, 1991.
- JANAS, M. S.; NOWAKOWSKI, R. S.; MOLLGARD, K. Glial cell differentiation in neuron-free and neuron-rich regions. **Anat. Embryol.** **184**: 559 - 569, 1991.
- JEGLINSKI, W.; KOCZYK, D.; ZAREMBA, M.; ODERFELD-NOWAK, B. Bilateral gliosis in unilaterally lesioned septohippocampal system: changes in GFAP immunoreactivity and content. **J. Neurosc. Res.**, **41**: 394 - 402, 1995.
- JOPE, R. S.; WILLIAMS, M. B. Lithium and brain signal transduction systems. **Biochemical Pharmacology**, **47/3**: 429 - 441, 1994.
- KARNIOL, I. G.; BOTEAGA, N. J. Farmacocinética do lítio. **J. Bras. Psiqu.**, **33/5**: 366 - 370, 1984.
- KIMELBERG, H. K.; NORENBURG, M. D. Astrocytes. **Sci. Amer.**: 66 - 76, Abril 1989.
- KLEMFUSS, H.; KRIPKE, D. F. Potassium reduces lithium toxicity: circadian rhythm actions are maintained. **Life Sciences**, **40**: 2531 - 2538, 1987.
- KOENIG, M. L.; JOPE, R. S. Effects of lithium on synaptosomal Ca^{2+} fluxes. **Psychopharmacol.**, **96**: 267 - 272, 1988.

- LAM, H. R.; CHRISTENSEN, S. Regional and subcellular localization of Li⁺ and other cations in the rat brain following long-term lithium administration. *J. Neurochem.*, **59/4**: 1372 - 1380, 1992.
- LEE, C. H.; DIXON, J. F.; REICHMAN, M.; MOUMMI, C.; LOS, G.; HOKIN, L. E. Li⁺ increases accumulation of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in cholinergically stimulated brain cortex slices in guinea pig, mouse and rat. *Biochem. J.* **282**: 377 - 385, 1992.
- LENOX, R. H.; WATSON, D. G. Lithium and the brain: A psychopharmacological strategy to a molecular basis for manic depressive illness. *Clin. Chem.*, **40/2**: 309 - 314, 1994.
- LENZ, G.; MANOZZO, L.; GOTTARDO, S.; ACHAVAL, M.; SALBEGO, C.; RODNIGHT, R. Temporal profiles of the in vitro phosphorylation rate and immunocontent of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after kainic acid-induced lesions in area CA1 of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. *Brain Res.*, **764/1-2**: 188-196, 1997.
- LINDER, J.; FYRÖ, B.; PETTERSSON, U.; WERNER, S. Acute antidepressant effect of lithium is associated with fluctuation of calcium and magnesium in plasma. *Acta Psychiatr. Scand.*, **80**: 27 - 36, 1989.
- LIU, W.; SHAFIT-ZAGARDO, B.; AQUINO, D. A.; ZHAO, M.-L.; DICKSON, D. W.; BROSNAN, C. F.; LEE, S. C. Cytoskeletal alterations in human fetal astrocytes induced by interleukin-1 β . *J. Neurochem.*, **63**: 1625 - 1634, 1994.
- MANJI, H. K.; LENOX, R. H. Long-term action of lithium: a role for transcriptional and posttranscriptional factors regulated by protein kinase C. *Synapse*, **16**: 11 - 28, 1994.
- MANUAL of histologic and special staining technics, 2th Ed., New York, McGraw-Hill, pp. 25 - 32, 1960.
- MASOOD, K.; BESNARD, F.; SU, Y.; BRENNER, M. Analysis of a segment of the human glial fibrillary acidic protein gene that directs astrocyte-specific transcription. *J. Neurochem.*, **61/1**: 160 - 166, 1993.
- McEWEN, B. S.; MAGARINOS, A. M. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann. New York Acad. of Sci.*: 271 - 284, 1996.
- McMILLIAN, M. K.; THAI, L.; HONG, J. S.; O'CALLAGHAN, J. P.; PENNYPACKER, K. R. Brain injury in a dish: a model for reactive gliosis. *T.I.N.S.*, **17/4**: 138 - 142, 1994.
- MILLER, M. W.; ROBERTSON, S. Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *J.*

Comp. Neur., 337: 253 - 266, 1993.

MISSLER, M.; EINS, S.; BÖTTCHER, H.; WOLFF, J. R. Postnatal development of glial fibrillary acidic protein, vimentin and S100 protein in monkey visual cortex: evidence for a transient reduction of GFAP immunoreactivity. **Dev. Brain Res.**, 82: 103 - 117, 1994.

MORI, S.; ZANARDI, R.; POPOLI, M.; SMERALDI, E.; RACAGNI, G.; PEREZ, J. Inhibitory effect of lithium on cAMP dependent phosphorylation system. **Life Sciences**, 59/9: 99 - 104, 1996.

MORK, A. Actions of lithium on second messenger activity in the brain. The adenylate cyclase and phosphoinositide systems. **Lithium**, 1: 131 - 147, 1990.

MORK, A.; GEISLER, A.; HOLLUND, P. Effects of lithium on second messenger systems in the brain. **Pharm. Toxicology**, 71 Suppl. 1: 4 - 17, 1992.

MÜLLER, H. W.; JUNGHANS, U.; KAPPLER, J. Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors. **Pharmac. Ther.**, 65: 1 - 18, 1995.

MUÑOZ-MONTAÑO, J. R.; MORENO, F. J.; AVILA, J.; DÍAZ-NIDO, J. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. **FEBS Letters**, 411: 183 - 188, 1997.

NEARY, J. T.; BAKER, L.; JORGENSEN, S. L.; NOREMBERG, M. D. Extracellular ATP induces stellation and increases glia fibrillary acidic protein content and DNA synthesis in primary astrocyte cultures. **Acta Neuropat.**, 87: 8 - 13, 1994.

NIXDORF-BERGWEILER, B. E.; ALBRECHT, D.; HEINEMENN, U. Developmental Changes in the Number, Size, and Orientation of GFAP-Positive Cells in the CA1 Region of Rat Hippocampus. **Glia**, 12: 180 - 195, 1994.

NOREMBERG, M. D. Astrocyte responses to CNS injury. **J. Neuropathol. and Exper. Neurol.**, 53(3): 213 - 220, 1994.

OZAKI, N.; CHUANG, D. M. Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain. **J. Neurochem.**, 69: 2336 - 2344, 1997.

PARPURA, V.; BASARSKY, T. A.; LIU, F.; JEFTINJA, K.; JEFTINJA, S.; HAYDON, P. G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, 369: 744 - 747, 1994.

PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**, 2. ed. edited by G. Paxinos, Austrália, Academic Press, 1995.

- PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, H. F. The Neuroglial Cells. *In*: PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, H. F. (eds.), **The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells**, New York, Oxford University Press, 1991.
- PETITO, C. K.; MORGELLO, S.; FELIX, J. C.; LESSER, M. L. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. **J. Cer. Blood Flow and Metab.**, **10**: 850 - 859, 1990.
- PEUCHEN, S.; CLARK, J. B.; DUCHEN, M. R. Mechanisms of intracellular calcium regulation in adult astrocytes. **Neurosci.**, **71/3**: 871 - 883, 1996.
- PIXLEY, S. K.; VELLIS, J. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. **Dev. Brain Res.**, **15**: 201 - 209, 1984.
- PORTER, J. T.; McCARTHY, K. D. Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. **J. Neurosci.**, **16/16**: 5073 - 5081, 1996.
- PRIVAT, A.; GIMENEZ-RIBOTTA, M.; RIDET, J. L. Morphology of astrocytes. *In*: KETTENMANN, H.; RANSOM, B. R. (eds.), **Neuroglia**, New York, Oxford University Press, 1995.
- RAINE, C. S. Neurocellular Anatomy. *In*: SIEGEL, G. J.; et al. (eds.), **Basic Neurochemistry**, 5th Ed., New York, Raven Press, 1994.
- RICKMANN, M.; AMARAL, D. G.; COWAN, W. M. Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. **J. Comp. Neur.**, **264**: 449 - 479, 1987.
- ROCHA, E. Efeitos do tratameno crônico com cloreto de lítio, produzindo litemia terapeuticamente relevante, sobre parâmetros neuroquímicos, comportamentais e morfologia de astrócitos em ratos. Porto Alegre: UFRGS, 1996. Tese de Doutorado.
- ROCHA, E.; ACHAVAL, M.; SANTOS, P.; RODNIGHT, R. Lithium treatment causes gliosis and modifies the morphology of hippocampal astrocytes in rats. Submetido à revista Neuroreport.
- ROCHA, E.; RODNIGHT, R. Chronic Administration of Lithium Chloride Increases Immunodetectable Glial Fibrillary Acidic Protein in the Rat Hippocampus. **J. Neurochem.**, **63(4)**: 1582 - 1584, 1994.
- RODNIGHT, R.; ZAMANI, R.; TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **J. Neurosc. Methods**, **24**: 27 - 38, 1988.

- SANTOS, P. **Efeito do tratamento crônico com lítio sobre o hipocampo de ratos adultos: abordagem morfológica e imunocitoquímica.** Porto Alegre: UFRGS, 1996. Dissertação de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Bioquímica.
- SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, **40/3**: 599 - 636, 1991.
- SCHNITZER, J.; FRANKE, W.W.; SCHACHNER, M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. **J. Cell Biol.**, **90**: 435 - 447, 1981.
- SCHOU, M. **Lithium Treatment of Manic-Depressive Illness - A Practical Guide**, edited by S. Karger, Basel- München- Paris- London- New York- Sydney, 1980.
- SELVÍN-TESTA, A.; LOIDL, C. F.; LÓPEZ-COSTA, J. J.; LÓPEZ, E. M.; PECCI-SAAVEDRA, J. Prolonged Lead Exposure Modifies Astrocyte Cytoskeletal Proteins in the Rat Brain. **Neurotoxicol.**, **16**: 389 - 402, 1994.
- SIEVERS, J.; HARTMANN, D.; PEHLEMANN, F. W.; BERRY, M. Development of astroglial cells in the proliferative matrices, the granule cell layer, and the hippocampal fissure of the hamster dentate gyrus. **J. Comp. Neur.**, **320**: 1 -32, 1992.
- STANFIELD, B. B.; COWAN, W. M. The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. **J. Comp. Neur.**, **185**: 423 - 460, 1979.
- STERNBERGER, L. A. Immunocytochemistry. Chicester, Wiley & Sons. 1979. 338p.
- STRINGER, J. L. Repeated seizures increase GFAP and vimentin in the hippocampus. **Brain Res.**, **717**: 147 - 153, 1996.
- TRAVIS, J. Glia: the brain's other cells. **Science**, **266**: 970 - 972, 1994.
- TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P. J. Metabolic coupling between glia and neurons. **J. Neurosc.**, **16/3**: 877 - 885, 1996.
- VALLÉS, S.; PITARCH, J.; RENAUP-PIQUERAS, J; GUERRI, C. Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development. **J. Neurochem.**, **69**: 2484 - 2493, 1997.
- VALLÉS, S.; SANCHO-TELLO, M.; MIÑANA, R.; CLIMENT, E.; RENAUP-PIQUERAS, J; GUERRI, C. Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. **J. Neurochem.**, **67**: 2425 - 2433, 1996.

- VAN DEN BERG, K. J.; GRAMSBERGEN, J. B. P. Long-term changes in glial fibrillary acidic protein and calcium levels in rat hippocampus after a single systemic dose of kainic acid. **Ann. New York Acad. of Sci.**: 394 - 401.
- VERNADAKIS, A. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. **Progress in Neurob.**, **49**: 185 - 214, 1996.
- VOIGT, T. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. **J. Comp. Neur.**, **289**: 74 - 88, 1989.
- WANG, H.-Y.; FRIEDMAN, E. Chronic lithium: desensitization of autoreceptors mediating serotonin release. **Psychopharmac.**, **94**: 312 - 314, 1988.
- WANG, H.-Y.; FRIEDMAN, E. Lithium inhibition of protein kinase C activation-induced serotonin release. **Psychopharmac.**, **99**: 213 - 218, 1989.
- WENZEL, J.; LAMMERT, G.; MEYER, U.; KRUG, M. The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. **Brain Res.**, **560**: 122 - 131, 1991.
- WOFCHUK, S. T.; RODNIGHT, R. Glutamate Stimulates the Phosphorylation of Glial Fibrillary Acidic Protein in Slices of Immature Rat Hippocampus Via a Metabotropic Receptor. **Neurochem. Int.**, **24**: 517 - 523, 1994.
- WU, D.; JHAVERI, S.; SCHNEIDER, G. E. Glial environment in the developing superior colliculus of hamsters in relation to the timing of retinal axon ingrowth. **J. Comp. Neur.**, **358**: 206 - 218, 1995.
- WYSS, J. M.; VAN GROEN, T. The limbic system. *In*: CONN, P. M. (ed.), **Neurosc. in Medicine.**, Philadelphia, J. B. Lippincott Company, 1995.
- YANES, C.; MONZON-MAYOR, M.; GHANDOUR, M. S.; BARRY, J. DE; GOMBOS, G. Radial glia and astrocytes in developing and adult telencephalon of the lizard *Gallotia galloti* as revealed by immunohistochemistry with anti-GFAP and anti-vimentin antibodies. **J. Comp. Neur.**, **295**: 559 - 568, 1990.
- ZILLES, K.; HAJÓS, F.; KÁLMÁN, M.; SCHLEICHER, Z. Mapping of glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in the rat forebrain and mesencephalon by computerized image analysis. **J. Comp. Neurol.**, **308**: 340 - 355, 1991.