UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
INSTITUTO DO CÉREBRO
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Kelly Soares Farias

INTERFERINDO COM OSCILAÇÕES DE ALTA FREQUÊNCIA NO HIPOCAMPO EPILÉPTICO: CONSEQUÊNCIAS PARA AS CRISES ESPONTÂNEAS

Natal / RN
2012

KELLY SOARES FARIAS

INTERFERINDO COM OSCILAÇÕES DE ALTA FREQUÊNCIA NO HIPOCAMPO EPILÉPTICO: CONSEQUÊNCIAS PARA AS CRISES ESPONTÂNEAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

ORIENTADOR: Dr. Claudio Marcos Teixeira de Queiroz

Natal / RN
2012

Seção de Informação e Referência

Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Farias, Kelly Soares
Interferindo com oscilações de alta frequência no hipocampo epiléptico: consequências para as crises espontâneas / Kelly Soares Farias. – Natal, RN, 2012.
80 f. : il.

Orientador: Claudio Marcos Teixeira de Queiroz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Instituto do Cérebro. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Epilepsia do lobo temporal – Dissertação. 2. Modelos animais – Dissertação. 3. Oscilação de alta frequência – Dissertação. 4. Estimulação Intracerebral – Dissertação. 5. Hipocampo – Dissertação. I. Queiroz, Claudio Marcos Teixeira de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM CDU 616.853

KELLY SOARES FARIAS

INTERFERINDO COM OSCILAÇÕES DE ALTA FREQUÊNCIA NO HIPOCAMPO EPILÉPTICO: CONSEQUÊNCIAS PARA AS CRISES ESPONTÂNEAS

Apresentada em 11 de Outubro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy-Pereira
Instituto do Cérebro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Claudio Marcos Teixeira de Queiroz
Instituto do Cérebro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Natal / RN
2012

Dedico esta dissertação
a José Salvino Soares (*in memoriam*),
à Maria Alice Carvalho e à
Mércia de Fátima Soares.

"Quando nada parece dar certo, lembro-me do cortador de pedras martelando sua rocha... uma centena de vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as outras que vieram antes."

Jacob Riis
(1849 – 1914)
Fotógrafo documentarista norte-americano

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus.** Ele que iluminou, guiou meus passos, me deu força e me sustentou durante toda esta caminhada.

À minha mãe, **Mércia de Fátima**, cujo amor, ensinamento, confiança e credibilidade alimentaram e deram o suporte emocional que tanto foi necessário. Estar longe de casa proporcionou amadurecimento em todos os âmbitos da minha vida, e devo isto a ela.

À minha avó, **Maria Alice**, que tenho certeza que foi a que mais sentiu minha falta neste tempo, e mesmo assim, manteve-se serena e motivadora. As lágrimas por ela derramadas me deram força e coragem para continuar.

À minha irmã, **Karina Soares**, que se mostrou uma amiga e tanto durante esses dois anos. Descobri o valor de ser sua irmã na distância.

Ao meu orientador, **Claudio Queiroz**. Primeiramente pela credibilidade e confiança em mim depositadas, e posteriormente pela paciência, dedicação, cuidado, ensinamentos, conselhos e orientações que tanto foram válidos para o meu amadurecimento científico e pessoal.

Aos professores **Rodrigo Romcy-Pereira e Adriano Tort** pelos ensinamentos, conselhos e sugestões.

Ao professor **John Fontenelle,** por ter aberto as portas do seu laboratório e permitir a realização de algumas das técnicas requeridas para o desenvolvimento deste projeto, bem como pelo bom humor e incentivo de sempre.

Ao apoio nas atividades do dia a dia no laboratório de **Felipe Barros, Diego Fernandes**, **Gabriela Faria, Anderson Brito** e **Aron de Miranda..**

Aos colegas do **IINN-ELS,** do **Instituto do Cérebro** e do **Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Circadiana** pelo incentivo, paciência e dedicação para me ensinar técnicas, métodos e análises deste mundo tão novo.

Ao apoio e à confiança das professoras da graduação e desde então amigas, **Alecsandra Tomaz, Doralucia Pedrosa** e **Alba Ribeiro.**

À minha amiga **Carolina Coeli**, que me faltam até palavras pra expressar o quanto ela é essencial na minha vida. Sei que sem as risadas, sem as cartas e mensagens, sem o apoio emocional e sem as longas e maravilhosas conversas, teria sido bem mais difícil.

Às minhas amigas lindas e incríveis **Rebeca Oliveira, Rakel Ribeiro, Francielle Lopes, Pollyanna Priscila, Aluísio Silva (*in memorian*) e Ana Maria,** amizades que retratam bem a frase que amigo é coisa pra se guardar no lado esquerdo do peito, dentro do coração.

Aos anjos **Andrea Lima, Bruna Landeira, Nathália Lemos, Morgana Menezes, Priscila Tavares, Themis Tainah, Juliana Brandão, Hermany Munguba, Arthur França e Fábio Caixeta**. Anjos que tive a oportunidade de conhecer em Natal e que se tornaram amigos por opção, cada um com sua particularidade e especialidade tornaram minha vida mais feliz e mais completa.

À receptividade, a amizade e o companheirismo de **Tania Amaral, Tatianne Alves, Eufrásia Ribeiro, Isabel Lima e Henrique Moura,** amizades que me proporcionaram momentos únicos e sempre regados a boas risadas.

Resumo

Crises epilépticas são eventos paroxísticos do sistema nervoso central (SNC) caracterizadas por uma descarga elétrica neuronal anormal, com ou sem perda de consciência e com sintomas clínicos variados. Nas epilepsias do lobo temporal as crises tem início focal, em estruturas do sistema límbico. Dados clínicos e experimentais mostram que essas regiões apresentam morte neuronal (esclerose hipocampal), reorganização sináptica (brotamento aberrante das fibras musgosas) e gliose reativa, sendo esses marcadores biológicos da zona epileptogênica. Registros extracelulares mostram que além das alterações anatômicas mencionadas acima, a zona epileptogênica também apresenta oscilações de alta frequência patológicas (pOAF). As pOAF são oscilações transientes (50 – 100 ms de duração), de baixa amplitude (200 μV - 1.5 mV) e de frequências variáveis (80 – 800 Hz). A relação entre essas oscilações e a gênese das crises espontâneas ainda é desconhecida. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da estimulação elétrica intracerebral (EIC) nas pOAF e frequência de crises espontâneas de animais cronicamente epilépticos (modelo da epilepsia do lobo temporal). Atualmente, a EIC é utilizada no tratamento de distúrbios do movimento (e.g., doença de Parkinson) e em alguns casos de dor crônica, e experimentalmente, no tratamento das epilepsias de difícil controle. A hipótese de trabalho dessa dissertação é de que a indução de depressão de longa duração por EIC, ao reduzir a excitabilidade neuronal local, modulará as pOAF, bem como a frequência de crises espontâneas. Para isso, comparamos as características espectrais das pOAF e a frequência de crises espontâneas antes e depois de um protocolo de 12 horas de estimulação elétrica de baixa frequência (0,2 Hz) aplicado na via perforante. De fato, esse protocolo reduziu a amplitude do potencial de ação coletivo registrado no giro denteado (GD) do hipocampo dorsal em 45% (amplitude média da primeira e da última hora de estimulação: 7,3 ± 3,0 mV e 4,1 ± 1,5 mV, respectivamente; $p<0,05$; teste t). O monitoramento contínuo do potencial de campo local, realizado no GD e em CA3 simultaneamente, mostrou que o protocolo de estimulação empregado foi eficaz em (i) aumentar a duração (64,6 ± 9,3 ms *vs*. 70,5 ± 11,5 ms) e reduzir (ii) a entropia (3,72 ± 0,28 *vs*. 3,58 ± 0,30), (iii) o índice pOAF (0,20 ± 0,08 *vs*. 0,15 ± 0,07) e (iv) o modo espectral (237,5 ± 15,8 Hz *vs*. 228,7 ± 15,2 Hz) das pOAF (valores do GD, expressos como média ± desvio-padrão, para os períodos "pré" e "pós" estimulação respectivamente; $p<0,05$; teste t). Ainda, este protocolo reduziu significativamente a frequência de crises espontâneas (1,8 ± 0,4 *vs*. 1,0 ± 0,3 crises/hora; "pré" e "pós" estimulação, respectivamente; $p<0,05$; teste t). Curiosamente, observamos um aumento na duração média das crises espontâneas após o término do protocolo (39,7 ± 6,0 *vs*. 51,6 ± 12,5 s; "pré" e "pós" estimulação respectivamente; $p<0,05$; teste t). Estes resultados sugerem que a redução da excitabilidade neuronal, por meio de protocolos de estimulação elétrica, altera o perfil espectral das pOAF. Esse efeito foi acompanhado de redução na frequência de crises espontâneas. Apesar de preliminar, o presente trabalho contribui para o refinamento de terapias baseadas em EIC para indivíduos com epilepsia.

Palavras-chave: Epilepsia do lobo temporal, modelos animais, oscilações de alta frequência, estimulação intracerebral, hipocampo.

Abstract

Epileptic seizures are characterized by paroxysms and abnormal discharges of specific cell assemblies of the central nervous system (CNS), with or without compromising consciousness and with varied clinical symptoms. The epileptic focus in temporal lobe epilepsies are within the limbic system. Clinical and experimental data have shown extensive cell death (hippocampal sclerosis), synaptic reorganization (aberrant mossy fiber sprouting) and reactive gliosis in some these structures. These alterations are considered biological markers of the epileptogenic zone. Together with these anatomical alterations, extracellular recordings have also revealed pathological high frequency oscillations (pHFO) within structures of the epileptogenic zone. pHFO are transient oscillations (50 - 100 ms duration) of low amplitude (200 μV - 1.5 mV) and variable frequencies (150 - 800 Hz). The exact relationship pHFO and the generation of spontaneous seizures is still unknown. The objective of this study was to evaluate the effects of deep brain stimulation (DBS) in the spectral structure of pHFO, and in the frequency of spontaneous recurrent seizures in chronically epileptic animals (experimental model of temporal lobe epilepsy). DBS is currently used as an alternative method in the treatment of movement disorders (i.e., Parkinson's disease), and to some extent, of chronic pain. DBS has also been tested as an alternative method for intractable epilepsies experimentally. The working hypothesis of this thesis is that DBS-induced long-term depression, by reducing neuronal excitability locally, will modulate the spectral structure of pHFO with possible effects on spontaneous seizures frequency. For that, we compared pHFO spectral characteristics and seizures frequency before, during and after 12-hours continuous low frequency stimulation (at 0.2 Hz) applied to the perforant path. We observed that this protocol was able to reduce by 45% the amplitude of the population spike recorded in the dentate gyrus (DG) of the dorsal hippocampus (mean amplitude of the first and last hour of stimulation: 7.3 ± 3.0 mV *vs* 4.1 ± 1.5 mV, respectively, $p < 0.05$, t test). Continuous monitoring of local field potential in the DG and CA3 region showed that the stimulation protocol used was effective in (i) increasing the duration (64.6 ± 9.3 ms *vs* 70.5 ± 11.5 ms) while reducing (ii) the entropy (3.72 ± 0.28 *vs* 3.58 ± 0.30), (iii) the pHFO index (0.20 ± 0.08 *vs* 0.15 ± 0.07) and (iv) the spectral mode (237.5 ± 15.8 *vs* 228.7 ± 15.2 Hz) of pHFO (GD values, expressed as mean ± standard-deviation for "pre" and "post" epochs, in relation to stimulation protocol, respectively; $p < 0.05$, t test). Moreover, the protocol used significantly reduced spontaneous seizure frequency (1.8 ± 0.4 *vs* 1.0 ± 0.3 seizures / hour; "pre" and "post" eppochs, respectively; $p < 0.05$; t test). Interestingly, we observed an increase in the average duration of spontaneous seizures after the stimulation protocol (39.7 ± 6.0 *vs* 51.6 ± 12.5 s; for "pre" and "post" stimulation epochs, respectively; $p < 0.05$, t test). These results suggest that the reduction of neuronal excitability after low frequency electrical stimulation may change the spectral dynamics of pHFO. This effect was accompanied by a reduction in the frequency of spontaneous seizures. Although preliminary, this work contributes to the refinement of DBS-based therapies for the epilepsies.

Keywords: Temporal lobe epilepsy, animal models, high frequency oscillations, deep brain stimulation, hippocampus.

Lista de figuras

Figura 1 – Distribuição geográfica do índice DALY para epilepsias 2

Figura 2 – Classificação das crises epilépticas de acordo com a localização do foco epiléptico 3

Figura 3 – Representação da formação hipocampal e da região parahipocampal no cérebro do rato 7

Figura 4 – Representação esquemática das principais hipóteses que consideram morte neuronal no hilo (e.g., esclerose hipocampal) e diminuição do limiar para deflagração de crises epilépticas no giro denteado 8

Figura 5 – Exemplos de oscilações de alta frequência patológicas observadas no hipocampo de um animal cronicamente epiléptico e no córtex cerebral de um paciente com epilepsia do lobo temporal sem esclerose hippocampal 13

Figura 6 – Protocolo de indução do estado epiléptico (SE) pela administração de agentes convulsivantes 19

Figura 7 – Representação esquemática do sistema de registro e estimulação utilizados para o implante crônico dos eletrodos 21

Figura 8 – Fotografia da preparação experimental durante o implante crônico dos eletrodos, com realce importante dos equipamentos e tecnologias desenvolvidas nesta tese 23

Figura 9 – Exemplo do potencial extracelular registrado no giro denteado após estimulação da via perforante em um animal não anestesiado e em livre movimento 24

Figura 10 – Exemplo representativo de espícula (onda aguda) interictal (ISW, do inglês, interictal sharp wave) associada com a oscilação de alta frequência (OAF) 27

Figura 11 – Representação esquemática dos três principais parâmetros extraídos do espectro de potência utilizadas na quantificação das oscilações de alta frequência 29

Figura 12 – Distribuição cumulativa (CDF) da probabilidade de óbito dos animais que evoluíram para o estado epiléptico (SE) de acordo com os protocolos utilizados. 32

Figura 13 – Registros eletrofisiológico de animais controle e epiléptico 33

Figura 14 – Registro interictal de um animal cronicamente epiléptico .. 35

Figura 15 – Correlação cruzada entre os registros do giro denteado e de CA3 36

Figura 16 – Dinâmica das oscilações de alta frequência patológicas registradas por eletrodos posicionados no giro denteado e em CA3 37

Figura 17 – Evolução temporal das amplitudes do potencial de campo evocado após estimulação de baixa frequência (0,2 Hz) na via perforante e registrado no giro denteado do hipocampo dorsal 38

Figura 18 – Duração das ondas agudas interictais (ISW - OAF) e das oscilações de alta frequência patológicas 39

Figura 19 – Distribuição dos valores de entropia antes, durante e depois da aplicação do protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência na via perforante 40

Figura 20 – Distribuição dos valores do índice de oscilação de alta frequência patológica antes, durante e depois da aplicação do protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência na via perforante 41

Figura 21 – Distribuição dos valores do modo espectral antes, durante e depois da aplicação do protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência na via perforante 42

Figura 22 – Frequência das crises espontâneas antes, durante e depois da aplicação do protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência .. 43

Figura 23 – Espectros de potência das oscilações de alta frequência no giro denteado e CA3 antes e depois da estimulação elétrica de baixa frequência 51

Figura 24 – Ilustração esquemática exibindo algumas das características básicas da preparação experimental em animais anestesiados e não epilépticos 67

Figura 25 – Curvas de estímulo-resposta que relatam a amplitude do fEPSP e do PS em animais anestesiados e não epilépticos 68

Figura 26 – Efeitos do protocolo de estimulação de baixa frequência (900 pulsos, 1 Hz) em animais anestesiados e não epilépticos 69

Figura 27 – Espectrogramas do potencial de campo espontâneo e evocado em animais anestesiados e não epilépticos 70

Figura 28 – Espectro da densidade de potência das oscilações espontâneas em animais anestesiados e não epilépticos 71

Lista de tabelas

Tabela 1 – Escala de Racine 20

Tabela 2 – Latência para a primeira crise e estado epiléptico nos diferentes modelos de Epilepsia do Lobo temporal 31

Lista de abreviações

AMPA: Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propiônico

CA: Corno de Amon

CTX ent: Córtex entorrinal

CEUA: Comitê de Ética para Uso de Animais

EBF: Estimulação de Baixa Frequência

EEG: Eletroencefalograma

EIC: Estimulação Elétrica Intracerebral

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

fEPSP: Potencial Extracelular Pós-Sináptico, do inglês, *field Extracellular Post-Synaptic Potential*

GD: Giro Denteado

ILAE: Liga Internacional contra a Epilepsia, do inglês, *International League Against Epilepsy*

im: intramuscular

ip: intraperitoneal

LTD: Depressão de Longa Duração, do inglês, *Long-term Depression*

OAF: Oscilações de Alta Frequência

NMDA: N-metil-D-aspartato

pOAF: Oscilações de Alta Frequência Patológicas

PS: Potencial de Ação Coletivo, do inglês, *Population Spike*

sc.: subcutâneo

SE: Estado Epiléptico, do inglês, *Status Epilepticus*

OMS: Organização Mundial de Saúde

Sumário

1. Introdução 1
1.1. As epilepsias 1
1.2. Epilepsia do Lobo Temporal 4
1.3. Região hipocampal 6
1.4. Gênese e propagação de crises na formação hipocampal 8
1.5. Oscilações de alta frequência patológicas 9
1.6. Uso da neuromodulação no tratamento das epilepsias 12

2. Objetivos 17

3. Materiais & Métodos 18
3.1. Considerações éticas 18
3.2. Animais 18
3.3. Produção de modelos animais de Epilepsia do Lobo Temporal 18
3.4. Vídeo monitoramento das crises espontâneas e recorrentes 20
3.5. Implante de eletrodos e registros eletrofisiológicos agudos 21
3.5.1. Registros eletrofisiológicos crônicos 23
3.6. Desenho experimental 23
3.7. Análise dos dados 25
3.7.1. Potencial Evocado 25
3.7.2. Oscilações de alta frequência 26
3.8. Análise estatística 27
3.9. Perfusão e análise histológia 30

4. Resultados 31
4.1. Modelo experimental de Epilepsia do Lobo Temporal..... 31
4.2. Atividade epileptiforme no hipocampo epiléptico 32
4.3. Espículas interictais e oscilações de alta frequência 34
4.4. Estimulação elétrica de baixa frequência e redução da excitabilidade 37
4.5. Modulação das oscilações de alta frequência por estimulação cerebral elétrica de baixa frequência 38
4.6. Consequências para as crises espontâneas 42

5. Discussão 45
5.1. Epilepsia do Lobo Temporal: em busca de um bom modelo experimental 45
5.2. Gerador das ondas agudas interictais (ISW-OAF) e a sua relação com as oscilações de alta frequência 47
5.3. Mecanimos celulares da gênese da oscilações de alta frequência patológicas 48
5.4. Reduzindo a excitabilidade do giro denteado e da região de CA3 ... 49
5.5. Modulação das oscilações de alta frequência patológicas e as consequências para a gênese de crises 51

6. Conclusões 54

7. Referências 55

Anexos

Anexo A – Estimulação elétrica intracerebral de baixa frequência em animais anestesiados e não epilépticos..... 65

Anexo B – Considerações sobre modelos experimentais em epilepsia. 73

Anexo C – Parecer CEUA-IINN-ELS 78

Anexo D – Parecer CEUA-UFRN..... 80

1. Introdução

O encéfalo é provavelmente o tecido biológico de maior complexidade do universo. Seu funcionamento depende da produção e integração de potenciais elétricos gerados por bilhões de neurônios, muitas vezes separados por distâncias que variam de micrômetros a centímetros. Acredita-se que a coordenação temporal e espacial desses disparos neuronais seja feita por flutuações do potencial de campo local, mais comumente conhecidas por oscilações neuronais (Buzsáki, 2006). O potencial de campo local produz oscilações em faixas de frequências específicas, resultado do somatório de potenciais pós-sinápticos excitatórios e inibitórios ao longo do tempo (Buzsaki & Draguhn, 2004). Essa atividade coordenada possibilita a percepção do mundo, o processamento das informações internas e externas do organismo e o comportamento. As epilepsias podem ser coletivamente agrupadas devido ao fato de apresentarem uma desorganização da atividade neuronal sincronizada. Não é surpreendente portanto que alterações dos ritmos eletrográficos sejam características nas epilepsias. Assim, quando um grupo de neurônios dispara potenciais de ação de modo abrupto, síncrono e de maneira excessiva, tem-se uma crise epiléptica. A crise epiléptica é um evento paroxístico do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por uma descarga elétrica neuronal anormal, com ou sem perda da consciência e com sintomas clínicos variados (Fisher e cols., 2005).

A presente dissertação de Mestrado teve como objetivo interferir com as oscilações patológicas observadas na condição epilética, bem como analisar a sua influência sobre a frequência das crises espontâneas.

1.1. As epilepsias

Clinicamente, as epilepsias são síndromes neurológicas crônicas caracterizadas por crises espontâneas e recorrentes na ausência de doença metabólica ou febril (Fisher e cols., 2005). Para o diagnóstico das epilepsias é necessária a ocorrência de pelo menos 2 crises espontâneas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a epilepsia é um problema de saúde

pública que atinge cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, aproximadamente 1% da população mundial. Esta prevalência pode chegar a 2% da população em países em desenvolvimento (Browne & Holmes, 2001). O impacto das epilepsias na qualidade de vida de uma população é atualmente avaliado por um indicador que mensura a mortalidade precoce e os anos de vida perdidos por incapacidade (DALY, do inglês, Disability – Adjusted Life Years). Por meio desta métrica, a OMS avalia estimativas de morbidade (incidência, prevalência, severidade, duração) e mortalidade atribuídas a uma patologia. Para as epilepsias, no ano de 2002, este índice foi maior para os países do continente Africano e para os países da América Latina (Figura 1) (WHO, 2004). Nestes países, acredita-se que 60% a 90% dos indivíduos com epilepsia não recebem tratamento adequado (Begley e cols., 2000). Isso se deve principalmente a precariedade da cobertura do sistema de saúde público, bem como ao grande preconceito e estigma associado com essa patologia. Por esse motivo, a pesquisa básica e a clínica em epilepsia são fundamentais, especialmente em países com alto índice DALY.

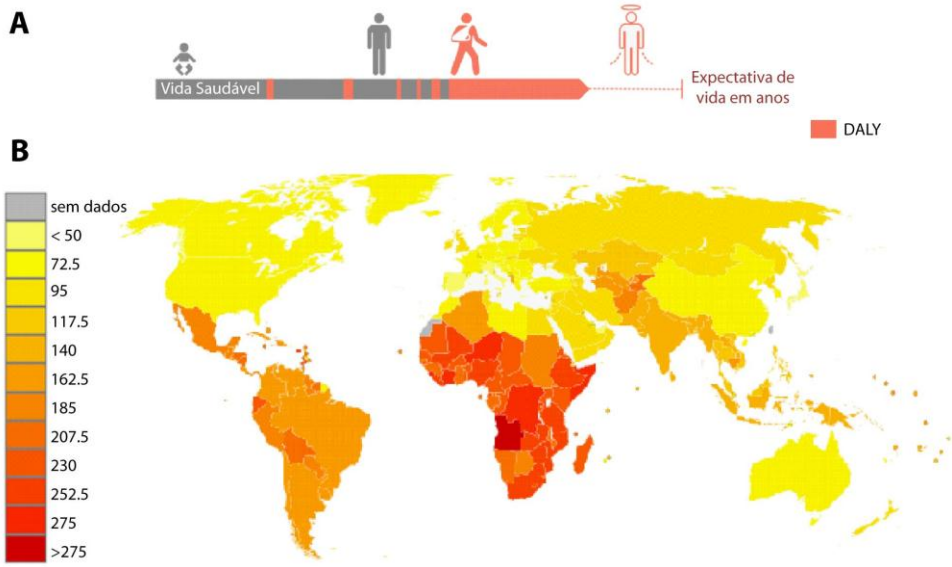

Figura 1 – Distribuição geográfica do índice DALY das epilepsias. **(A)** Diagrama explicativo do índice DALY (do inglês, Disability–Adjusted Life Years), um indicador dos anos perdidos por morte prematura e/ou anos vividos com uma patologia. O indicador é obtido pela soma dos (i) anos de vida perdidos por incapacidade ou doença e (ii) anos de vida perdidos por morte precoce, e estão representados pela cor laranja. **(B)** Taxas de DALY para as epilepsias, ajustadas para a idade, separadas por países e normalizadas para uma população de 100.000 habitantes (dados da Organização Mundial de Saúde de 2004 para o ano de 2002). Note que os países do continente africano e os países da América Latina são os que apresentam os maiores valores. Modificado a partir de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Epilepsy_world_map_-_DALY_-_WHO2002.svg

Existem vários tipos de epilepsia, com diferentes manifestações clínicas de crises. Por isso, um grande esforço em classificá-las tem sido feito nos últimos 100 anos, de forma a possibilitar um melhor diagnóstico e tratamento. De acordo com a Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE, do inglês International League Against Epilepsy) as crises epilépticas são classificadas em parciais ou focais, generalizadas e crises não classificáveis (Fisher e cols., 2005). As crises parciais originam-se em uma área cerebral restrita a um dos hemisférios. Quando estas evoluem e se propagam para outras regiões cerebrais, inclusive para o hemisfério contralateral, as crises são classificadas como parciais com generalização secundária. As crises generalizadas originam-se em uma região subcortical e rapidamente propagam-se para ambos os hemisférios cerebrais. As crises não classificáveis são as que não se enquadram nas duas classes anteriormente mencionadas (Figura 2).

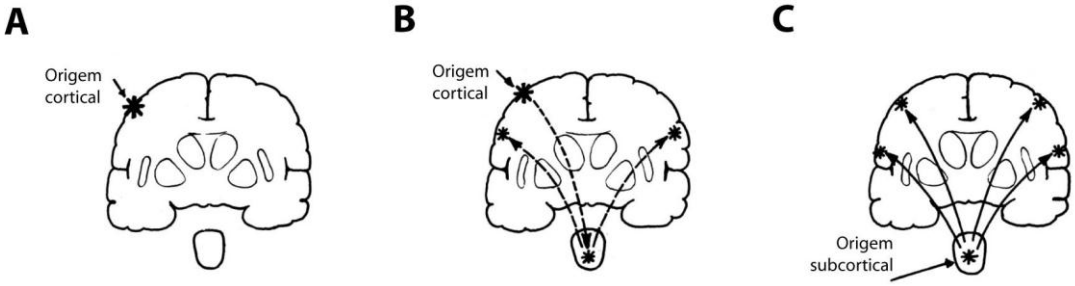

Figura 2 - Classificação das crises epilépticas de acordo com a localização do foco epiléptico. **(A)** As crises parciais. O foco epiléptico é limitado para uma região cortical. **(B)** Crises parciais com generalização secundária. As crises parciais podem evoluir e se propagar para outras regiões corticais, inclusive para o hemisfério contralateral. **(C)** Crises generalizadas. O foco epiléptico encontra-se em estruturas subcorticais e a propagação rápida afeta a totalidade do córtex cerebral. Em todas as figuras, o foco epiléptico é representado pelo asterisco e as setas mostram a direção da propagação da crise.

Por sua vez, a classificação das epilepsias é baseada em sinais e sintomas clínicos, achados de exames complementares, como o eletroencefalograma (EEG) e estudos de neuroimagem. Desta maneira, de acordo com a sua etiologia, as epilepsias são classificadas em genéticas, estruturais/metabólicas ou de causa desconhecida (antes conhecidas como idiopática, sintomática e criptogênica, respectivamente) (Berg e cols., 2010). As epilepsias genéticas são provavelmente o resultado direto de um defeito genético conhecido ou presumido em que as crises são o principal sintoma da doença. As epilepsias estruturais/metabólicas

são aquelas em que uma causa está diretamente associada com a ocorrência das crises, como por exemplo, acidente vascular cerebral, trauma, infecção, esclerose tuberosa e malformações do desenvolvimento cortical. E as epilepsias de causa desconhecida, são aquelas em que a natureza da causa subjacente é ainda desconhecida, podendo haver um defeito genético fundamental, ou ser a consequência de um distúrbio ainda não reconhecido (Berg e cols., 2010).

Atualmente, existem pelo menos 20 tipos de fármacos empregados no controle das crises epilépticas, tanto em monoterapia como combinados. Entretanto, em 30% dos pacientes as crises permanecem sem controle, ou seja, o tratamento medicamentoso não surte efeito. Esses indivíduos apresentam, portanto uma refratariedade ao tratamento farmacológico. É importante lembrar que todas as drogas antiepilépticas, apesar do termo, tratam apenas dos sintomas, isto é, não são capazes de curar o indivíduo de suas crises recorrentes (Loscher, 2002).

Nos casos em que as drogas antiepilépticas são ineficazes no controle das crises, mesmo após o uso de vários agentes, isolados ou em combinação, os pacientes podem ser encaminhados para a ressecção cirúrgica do foco epiléptico. Além de ser um procedimento economicamente custoso, nem todos os pacientes são candidatos para este método, quer seja pela não identificação do foco epiléptico, quer seja pelos possíveis prejuízos cognitivos ou motores decorrentes dessa remoção (Schulze-Bonhage e cols., 2009).

Dentre as epilepsias refratárias, destacam-se as epilepsias de lobo temporal, o tipo mais frequente de epilepsia parcial nos adultos (Browne & Holmes, 2001).

1.2. Epilepsia do Lobo Temporal

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia parcial em adultos, com cerca de 40% dos casos (Browne & Holmes, 2001). As crises tendem a ser progressivas no tempo, resultando em uma forma crônica de epilepsia que é difícil de ser tratada devido à refratariedade ao tratamento medicamentoso. A patogênese pode ser associada com infecções cerebrais,

convulsão febril, estado epiléptico (SE), tumores, trauma crânio-encefálico ou hipóxia. Depois do insulto inicial, os indivíduos passam cerca de 5 -10 anos sem crises, e após este período, as crises espontâneas e recorrentes surgem (Engel, 1993). Alterações clínicas, anatômicas e eletrográficas sugerem que as ELT podem ser divididas em dois tipos (Dantas e cols., 1998). O primeiro tipo, a ELT mesial, é comumente associado à alterações anatomo-patológicas da formação hipocampal e apresenta zona ictogênica na face interna do lobo temporal. O segundo tipo, a ELT neocortical ou também denominada lateral, é caracterizada por alterações metabólicas e/ou estruturais do neocórtex (Berg e cols., 2010). Essa divisão tem importância clínica ao auxiliar na determinação das causas, tratamento e prognóstico das ELT (O'Brien e cols., 1996).

Aproximadamente 70% dos indivíduos com ELT mesial apresentam esclerose mesial hipocampal, uma degeneração de neurônios das subregiões do hipocampo, como o hilo do giro denteado (GD) e neurônios piramidais de CA3 e CA1 (Mathern e cols., 1996). Essa morte neuronal é acompanhada de gliose e reorganização sináptica. De especial importância, está o crescimento aberrante dos axônios das células granulares do GD, denominadas de fibras musgosas em direção à camada molecular do GD, local onde estão localizados os dendritos das células granulares (Mathern e cols., 1994; Ying e cols., 1998) A formação desse circuito resulta na criação de uma alça de retroalimentação excitatória (Buckmaster & Dudek, 1997). Não existe consenso na literatura a respeito da ordem temporal dessas alterações: se elas são consequência das crises recorrentes ou se são o substrato para a geração das crises (Ben-Ari, 1985). Há evidências de que essas alterações precedem as crises e que se tornam mais evidentes com a recorrência delas (Scharfman, 2002).

Evidências de que as crises espontâneas na epilepsia ELT mesial tem origem em estruturas do sistema límbico, como o hipocampo, a amígdala e o córtex entorrinal provêm de estudos realizados em modelos animais, em observações clínicas e em material proveniente de ressecções cirúrgicas (Avoli e cols., 2002; Bragin e cols., 2003; Nair e cols., 2008). Muitos fatores contribuem para a alta epileptogenicidade dessa região, tais como a formação de circuitos excitatórios recorrentes, facilidade para plasticidade sináptica, fragilidade dos

circuitos inibitórios responsáveis pelo controle da excitação, presença de neurônios capazes de gerar disparos em salvas, forte influência da concentração iônica local, presença de junções comunicantes (gap junctions) e possível susceptibilidade a interações efáticas devido à grande compactação celular (para uma revisão sobre o tema, ver McNamara, 1994; Engel, 2001; McCormick & Contreras, 2001). Devido a sua importância para o tópico deste trabalho, uma breve revisão anatômica da região hipocampal é descrita abaixo.

1.3. Região Hipocampal

A região hipocampal está localizada na porção medial do lobo temporal e é uma das estruturas que compõe o sistema límbico. O sistema límbico[1] é um grupo de estruturas anatomicamente interconectadas que estão envolvidas em processos como emoção, aprendizado e memória.

A região hipocampal consiste da formação hipocampal e da região parahipocampal (Figura 3). A formação hipocampal é uma estrutura em forma de C e inclui o GD, Corno de Ammon (CA) ou hipocampo propriamente dito (dividido em CA1, CA2, CA3 e CA4) e o subículo. A região parahipocampal consiste do pré-subículo, para-subículo, córtex entorrinal (CTX ent), córtex perirhinal e córtex pós-rinal (van Strien e cols., 2009).

O CTX ent, como as demais regiões corticais, possui seis camadas bem definidas. Os aferentes excitatórios primários do hipocampo originam-se da camada II e III do CTX ent, cujos axônios formam a via perforante, sendo a fonte de entrada para todas as sub-regiões da formação hipocampal. Esta via projeta monossinapticamente para a camada molecular do GD e para as células piramidais de CA3 e de CA1. As principais eferências excitatórias do GD são os axônios das células granulares, denominados fibras musgosas que fazem sinapse com os neurônios piramidais de CA3. Os neurônios piramidais de CA3 recebem ainda inervação excitatória de outros neurônios da região de CA3 por colaterais

[1] O termo "límbico" foi cunhado por Paul MacLean, em 1952, sobre usos previamente apresentados por Paul Broca (1878) e James Papez (no circuito de Papez como substrato das emoções) e se refere a disposição de estruturas ao redor do diencéfalo, ou na borda do córtex cerebral.

recorrentes e impulsos de interneurônios inibitórios das subcamadas locais de CA3. A região de CA3 comunica-se com a de CA1 via colaterais de Schaffer. De CA1, as projeções atingem o subículo e as camadas V-VI do CTX ent. O subículo recebe aferências da camada III do CTX ent e envia projeções para o córtex peri e pós-rinal, pré-subiculo, para-subículo, corpo mamilar e núcleo hipotalâmico (van Strien e cols., 2009).

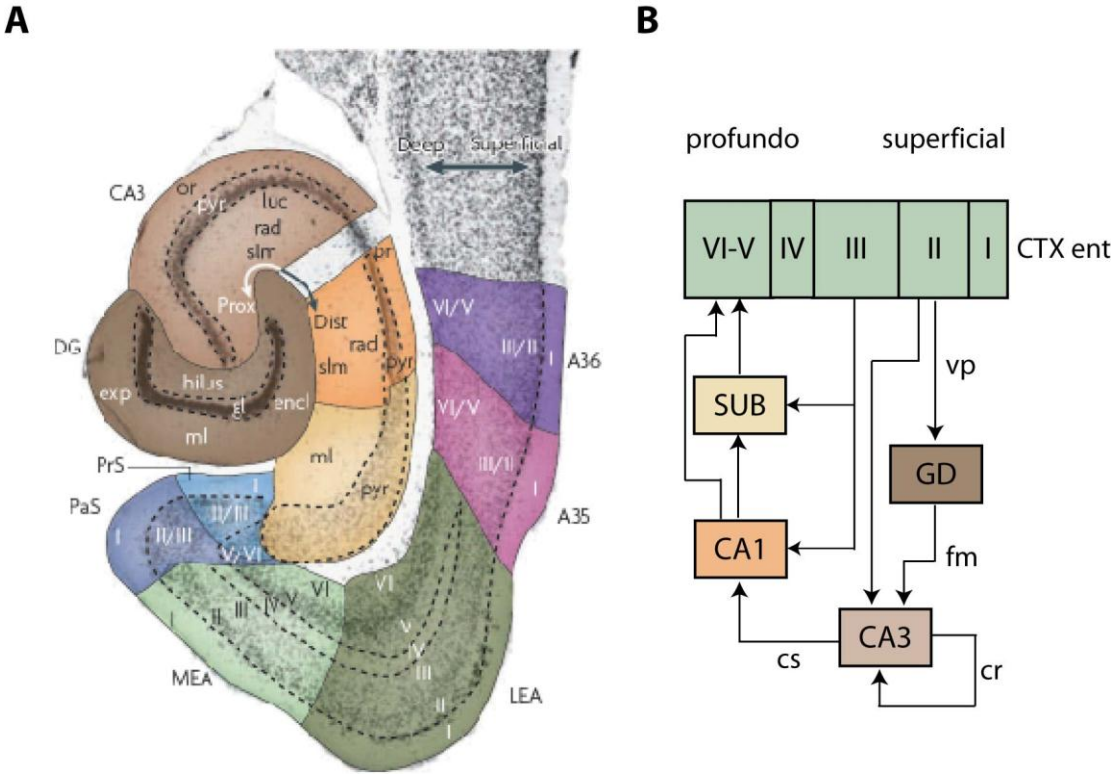

Figura 3 – Representação da formação hipocampal e da região parahipocampal no cérebro do rato. **(A)** Secção horizontal das camadas da formação hipocampal e parahipocampal. Os números romanos indicam as camadas corticais e as siglas representam as sub – camadas da formação hipocampal. **(B)** Diagrama estendido da circuitaria hipocampal, exibindo as interconexões, alças recorrentes e as respectivas camadas do córtex entorrinal (CTX ent) que se comunicam com o hipocampo. Há correspondência entre as cores das estruturas em (A) com as cores representadas em (B). O CTX ent é a fonte da via perforante, a qual projeta para todas as sub-regiões da formação hipocampal. A camada II do CTX ent projeta para camada molecular do giro denteado (GD) e para a região de CA3, enquanto que a camada III do CTX ent projeta para a região de CA1 e para o subículo (SUB). O GD comunica-se com a região de CA3 por meio das fibras musgosas (fm). Os neurônios piramidais de CA3 recebem inervação excitatória da região de CA3 via colaterais recorrentes (cr). A região de CA3 comunica-se com CA1 via colaterais de Schaffer (cs). De CA1, as projeções atingem o SUB e as camadas V-VI do CTX ent. As camadas V-VI do CTX ent também recebem aferências do SUB. CTX ent: Córtex Entorrinal. GD – Giro Denteado. CA3 – Área de CA3 do Corno de Ammon. CA1 - Área de CA1 do Corno de Ammon. SUB - Subículo. cs- colateral de Schaffer. cr- colaterais recorrentes. fm - fibras musgosas. vp – via perforante. Modificado a partir de (van Strien e cols., 2009).

Dada a complexidade dessa circuitaria neuronal, a gênese e a propagação das crises em estruturas do lobo temporal tem sido um desafio para os clínicos, uma vez que muitos indivíduos não são tratados adequadamente.

1.4. Gênese e propagação de crises na formação hipocampal

Apesar da grande quantidade de informação clínica, eletrofisiológica, histológica e de imagens obtidas tanto de indivíduos com ELT como de modelos animais, pouco se sabe a respeito dos mecanismos responsáveis pela deflagração e propagação das crises espontâneas nas ELT (Sloviter, 2005). Atualmente, a

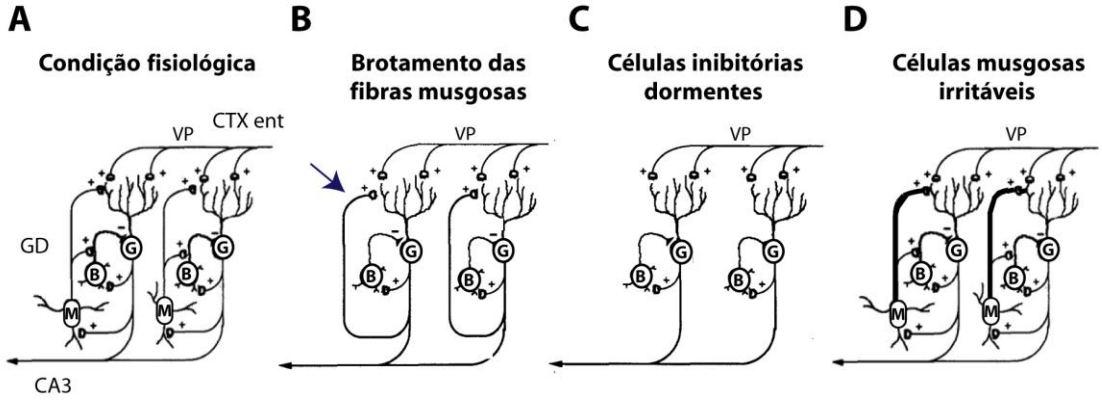

Figura 4 - Representação esquemática das principais hipóteses que associam morte neuronal no hilo (e.g., esclerose hipocampal) e diminuição do limiar para crises no giro denteado. **(A)** Na condição fisiológica, as células musgosas (M) fornecem estímulos excitatórios para os interneurônios inibitórios (células em cesto, B) e para as células granulares (G). **(B)** Na hipótese do brotamento aberrante das fibras musgosas, a perda de células musgosas (neurônios) deixaria os sítios de contato sináptico "órfãos" deflagrando o brotamento *de novo* dos axônios das células granulares de maneira aberrante, em direção à camada molecular do giro denteado, formando, portanto uma alça de retroalimentação excitatória. A seta azul indica brotamento das fibras musgosas (Tauck & Nadler, 1985). **(C)** Na hipótese das células em cesto dormentes, a perda de células musgosas reduziria o tônus excitatório sobre essa classe de interneurônio, induzindo-as a um tipo de quiescência (por isso o termo dormente). Nesse caso, o resultado seria uma diminuição da inibição sobre as células granulares (Sloviter, 1991). **(D)** A hipótese das células musgosas irritáveis enfatiza a importância das células musgosas sobreviventes após o insulto gerador das crises espontâneas. Nesse caso, as células sobreviventes amplificariam a excitabilidade neuronal por meio do brotamento das fibras musgosas ou pela potenciação das sinapses ao longo do circuito fibras musgosas -> células musgosas -> células granulares ou pela combinação de ambas (Ratzliff e cols., 2002). Modificado a partir de (McNamara, 1994) e (Ratzliff e cols., 2002)

maioria das hipóteses invoca alterações anatômicas da circuitaria hipocampal, em especial no GD (Figura 4). A primeira hipótese, mencionada brevemente acima, refere-se à formação de circuitos aberrantes excitatórios, que postula que as crises epilépticas são consequência da retroalimentação monossináptica e excitatória sobre as células granulares do GD, resultado do brotamento aberrante das fibras musgosas que reinerva os próprios dendritos na camada molecular do GD (onde estas conexões não são comumente encontradas) (Sloviter, 1992). Essa hipótese foi questionada pela observação de que não há relação linear entre o nível de brotamento das fibras musgosas e a frequência das crises epilépticas (Gorter e cols., 2001) e que em estados interictais, o GD apresenta maior inibição quando comparado com estruturas de indivíduos não epilépticos (Queiroz e cols., 2009). A segunda hipótese refere-se às células inibitórias dormentes, que postula que a perda das células musgosas do hilo do denteado diminui os impulsos excitatórios para os interneurônios, tornando-os inativos (McNamara, 1994). A terceira hipótese, das células musgosas irritáveis, enfatiza a importância das células musgosas sobreviventes após o insulto gerador das crises espontâneas. Segundo esta hipótese, as células sobreviventes amplificariam a excitabilidade sobre as células granulares, quer seja pelo brotamento de fibras musgosas, quer seja pela potenciação das sinapses ao longo do circuito: fibras musgosas - células musgosas - células granulares ou pela combinação de ambas (Ratzliff e cols., 2002).

Uma das explicações para o pouco conhecimento a respeito da gênese das crises espontâneas apesar da grande volume de dados decorre do fato de que a maioria desses estudos não analisou a dinâmica do sistema, e sim, um recorte. Os avanços tecnológicos aplicados a registros eletrofisiológicos possibilitaram um avanço considerável no entendimento das oscilações de redes neurais nas epilepsias (Buzsaki & Silva, 2012).

1.5. Oscilações de Alta Frequência Patológicas

Oscilações neurais são flutuações periódicas no potencial de campo, registradas por meio de eletrodos posicionados tanto no parênquima cerebral quanto no escalpo, em torno de uma frequência definida. Existem vários tipos de

oscilações, estudadas tanto em situações fisiológicas como patológicas. Partindo de oscilações lentas, como os ritmos delta (0,1 - 4 Hz) em direção a oscilações mais rápidas, como os ritmos gama (30 – 100 Hz) e *ripples* fisiológicos (80 – 200 Hz). Durante o ciclo sono-vigília de roedores, cada uma dessas oscilações neurais é associada com determinados comportamentos. Por exemplo, o ritmo teta com comportamentos de exploração, o ritmo beta e gama com comportamentos de imobilidade desperta e os *ripples* fisiológicos com processos de aprendizado e de consolidação de memória. Para uma breve revisão, (Buzsáki, 2006).

No final do século passado, um novo tipo de oscilação foi registrado em modelos animais crônicos de ELT (Bragin e cols., 1999b) e posteriormente em pacientes candidatos para a cirurgia de ressecção do foco epiléptico (Bragin e cols., 1999a). Essas oscilações, denominadas inicialmente como *fast ripples*, foram registradas durante sono de ondas lentas e imobilidade em áreas capazes de gerar crises espontâneas e recorrentes (Bragin e cols., 1999b; Bragin e cols., 2002b; Bragin e cols., 2004).

Essas oscilações foram descritas *in vivo*, no modelo experimental da ELT pela administração do ácido caínico (Bragin e cols., 1999b; Bragin e cols., 2003; Bragin e cols., 2004; Bragin e cols., 2007), da pilocarpina (Bragin e cols., 2011; Levesque e cols., 2011) e da toxina tetânica (Jiruska e cols., 2010b; Rolston e cols., 2010) e em modelos *in vitro*, com baixas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) e de magnésio (Mg^{2+}) e com altas concentrações de potássio (K^{+}) (Foffani e cols., 2007). São oscilações transientes (50 – 100 ms de duração), de baixa amplitude (200 μV - 1.5 mV) e de frequências variáveis (80 – 800 Hz) (Bragin e cols., 1999b). Em decorrência de sua estrita relação com o tecido patológico da zona epileptogênica, essas oscilações passaram a ter valor diagnóstico ou preditivo para a ocorrência das crises epilépticas (Bragin e cols., 2010).

A nomenclatura atual opta por designar o termo *fast ripples* como oscilações de alta frequência patológicas (pOAF), nomenclatura que foi adotada nesta dissertação. Para maiores informações, ver (Jefferys e cols., 2012).

Os mecanismos responsáveis pela gênese das pOAF ainda são desconhecidos, porém acredita-se que são potenciais de campo produzidos por agrupamento de neurônios principais interconectados patologicamente que

disparam potenciais de ação em salvas (Bragin e cols., 1999b; Bragin e cols., 2002b). Esses neurônios disparam de forma hipersíncrona em altas frequências (maiores do que 250 Hz). Em um modelo de epilepsia induzido pela administração da pilocarpina, Bragin e colaboradores detectaram a presença de pOAF no GD e após a análise eletrofisiológica e celular, demonstraram que as células granulares do GD aumentaram a sua frequência de disparo e que os interneurônios diminuíram sua frequência de disparo durante as pOAF (Bragin e cols., 2011). Porém, outros estudos sugerem que as pOAF são harmônicos das oscilações fisiológicas de alta frequência (os *ripples*), cuja sincronia está prejudicada na condição epiléptica (Foffani e cols., 2007). Os autores sugerem que tais oscilações emergem da desorganização do padrão de disparo das células de CA3 devido a uma grande flutuação do potencial de membrana. Ou seja, os neurônios disparam fora de fase e as frequências registradas apresentam-se mais altas do que as oscilações fisiológicas. Fatores como a perda neuronal, redução das interações efáticas, aumento do ruído sináptico ou canalopatias são citados como potenciais determinantes para a gênese das pOAF (Foffani e cols., 2007; Ibarz e cols., 2010).

Independentemente de seu mecanismo gerador, existem fortes evidências que as pOAF sejam consideradas como biomarcadores da zona geradora de crises epilépticas. Modelos experimentais com a pilocarpina e com o ácido caínico indicam que as pOAF surgem cerca de 6 dias após o SE e que sua presença é correlacionada positivamente com a probabilidade e severidade das crises epilépticas (Bragin e cols., 2003, 2007; Levesque e cols., 2011). No modelo da epilepsia induzido pelo ácido caínico, as pOAF podem ser detectadas no GD dias antes das crises epilépticas acontecerem, apenas em animais que desenvolvem crises espontâneas e recorrentes (Bragin e cols., 2004). Vale acrescentar que em situações fisiológicas, esta sub-região hipocampal não apresenta oscilações de alta frequência (Bragin e cols., 1995). No modelo da toxina tetânica, a frequência das pOAF é maior na zona de origem da crise e menor ou ausente nas áreas de propagação e essas oscilações precedem as crises epilépticas em escala de segundos (Jiruska e cols., 2010b).

A perda neuronal não é pré-requisito para a ocorrência das pOAF, mas pode contribuir para a sua gênese (Jiruska e cols., 2010b). Acredita-se que o volume tecidual mínimo capaz de gerá-las seja da ordem de 1mm^3, volume este que pode ser expandido pela aplicação de antagonistas gabaérgicos, a exemplo da bicuculina. O que sugere que a extensão espacial da zona geradora das pOAF é controlada por inibição local (Bragin e cols., 2002b). Além de espontâneas, as pOAF podem ser evocadas por meio da estimulação elétrica da via perforante (Bragin e cols., 2002b) e da região de CA3 (Ibarz e cols., 2010; Rolston e cols., 2010).

Na clínica, as pOAF podem ser registradas a partir de microeletrodos profundos (área de superfície de $\sim 10^{-3}$ mm^2) (Bragin e cols., 1999a; Bragin e cols., 1999b) e de macroeletrodos profundos (área de superfície de 1 – 10 mm^2) (Worrell e cols., 2004; Jirsch e cols., 2006; Urrestarazu e cols., 2007; Worrell e cols., 2008; Zijlmans e cols., 2011) posicionados no foco epiléptico. Sob o registro com macroeletrodos, sua amplitude varia entre 5 – 30 μV (Jirsch e cols., 2006) e dura em média 40 ms (Urrestarazu e cols., 2007). Sob o registro com microeletrodos, sua duração varia entre 15 e 100 ms (Bragin e cols., 1999a). Frequentemente, as pOAF ocorrem em associação com as ondas agudas interictais (ISW, do inglês, interictal sharp wave) (Worrell e cols., 2008; Rolston e cols., 2010). Acredita-se que as ondas agudas interictais associadas com as pOAF sejam as mais estritamente relacionados com a zona epileptogênica (Bragin e cols., 1999a; Bragin e cols., 1999b; Staba e cols., 2004; Jacobs e cols., 2008). A Figura 5 mostra pOAF observadas no hipocampo de um animal cronicamente epiléptico (modelo experimental) e no córtex cerebral de um paciente com epilepsia do lobo temporal sem esclerose hippocampal

1.6. Uso da neuromodulação no tratamento das epilepsias

O uso de estímulos elétricos para o tratamento das mais variadas doenças data de mais de dois milênios. As primeiras intervenções utilizaram choques elétricos oriundos de peixes elétricos (*Torpedo nobiliana*) no tratamento de dores de cabeça e gota (para uma revisão, ver Schwalb & Hamani, 2008) Atualmente, a estimulação elétrica é utilizada com sucesso no tratamento da dor

crônica e no alívio dos sintomas da doença de Parkinson (Kern & Kumar, 2007). Experimentalmente, outras patologias são candidatas ao tratamento por meio de estimulação elétrica, como por exemplo, a depressão, ansiedade, transtornos obsessivos compulsivos e as epilepsias (Fodstad & Hariz, 2007).

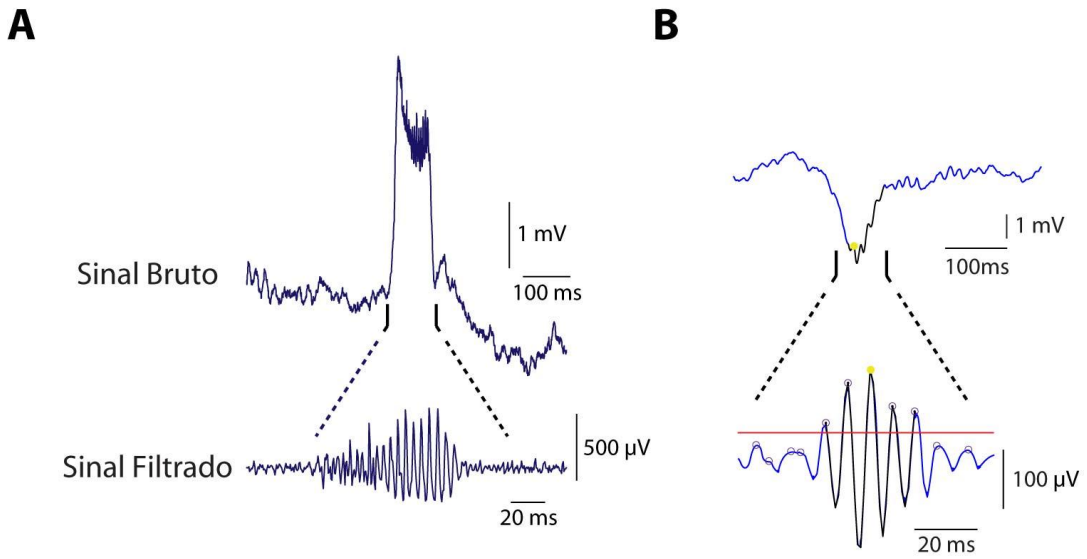

Figura 5 – Exemplos de oscilações de alta frequência patológicas observadas no hipocampo de um animal cronicamente epiléptico (modelo experimental) e no córtex cerebral de um paciente com epilepsia do lobo temporal sem esclerose hippocampal. **(A)** Registro do potencial de campo da região do giro denteado em animal cronicamente epiléptico com presença de pOAF (porção inferior) depois que o sinal bruto foi filtrado em altas frequências 150 a 800 Hz. **(B)** Eletrocorticograma de um humano com epilepsia. Observa-se a presença de pOAF que foram associadas com as ondas agudas depois que o sinal bruto foi filtrado em altas frequências (80 – 300 Hz). Registro em ser humano cedido por Dr. Tonicarlo Velasco e Anderson Brito, 2012.

Nas epilepsias, o uso de estimulação elétrica é empregado com certo sucesso no tratamento adjuntivo daquelas de difícil controle. Um dos protocolos amplamente difundidos é a estimulação do sistema nervoso periférico, em especial, a estimulação do nervo vago. A técnica envolve a estimulação intermitente do nervo vago com frequência de 20 a 30 Hz. A comunicação deste nervo com o tálamo, amígdala e regiões corticais através do núcleo do trato solitário e da formação reticular medular é conhecida por exibir função modulatória na atividade epiléptica (para uma breve revisão, ver Vonck e cols., 2003).

De maneira experimental, a estimulação elétrica intracerebral (EIC) vem sendo utilizada para o controle das crises epilépticas desde o início da década de 1970 (Cooper e cols., 1973; Riklan e cols., 1976; Van Buren e cols., 1978). A EIC pode modificar a eficiência sináptica de maneira controlada e reversível por meio de estímulos elétricos em eletrodos posicionados em diferentes estruturas no encéfalo (Fodstad & Hariz, 2007).

Atualmente, os protocolos empregados para modulação da atividade epiléptica por meio da EIC podem ser classificados em dois tipos: alta frequência, com estimulação contínua a uma frequência de 130 Hz e baixa frequência, com estimulação intermitente de 1 a 5 Hz. Entretanto, não existe um consenso quanto ao melhor protocolo de estimulação a ser utilizado. O primeiro protocolo mimetiza um protocolo utilizado no tratamento dos sintomas da doença de Parkinson (Schwalb & Hamani, 2008). A estimulação de alta frequência pode bloquear a atividade patológica, prevenindo assim a sua propagação (Rolston e cols., 2011). E a alguns autores sugerem que este protocolo promova resultados análogos ao da lesão cirúrgica (MicIntyre e cols., 2004; Jensen & Durand, 2007). O segundo protocolo baseia-se no desenvolvimento da depressão de longa duração (Ito, 1989; Malenka, 1994; Abraham & Bear, 1996; Malenka & Bear, 2004)uma forma de plasticidade sináptica que reduz a excitabilidade neuronal tanto *in vivo* como *in vitro*.

Apesar da efetividade de algumas abordagens experimentais, pouco se avançou no entendimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos anticonvulsivantes das estimulações elétricas. Os efeitos agudos e crônicos da estimulação elétrica dependem das propriedades bioquímicas, anatômicas e eletrofisiológicas do tecido estimulado, bem como sua relação com a origem da patologia (Mockett e cols., 2002; Kringelbach e cols., 2007; Skarpaas & Morrell, 2009). No caso das epilepsias, com o foco epiléptico. Atualmente, contribuem para o efeito terapêutico da estimulação elétrica (i) fatores moleculares do tecido estimulado, como a composição iônica, coativação de neuromoduladores e peptídeos, entre outros; (ii) anatomia específica da região alvo, com presença de fibras de passagem, distribuição espacial de aferências, eferências e compactação dos corpos celulares; (iii) padrão do estímulo, como a intensidade, duração e

forma do pulso e (iv) regime de estimulação, como a frequência e a periodicidade (Rolston e cols., 2011). Existem quatro hipóteses que tentam explicar os mecanismos de ação da EIC (i) bloqueio da despolarização. A partir de alterações na ativação de correntes dependentes de voltagem (aumento do K^+ extracelular), ocorre o bloqueio da atividade neuronal local. (ii) inibição sináptica. A estimulação ocasiona uma inibição funcional por bloquear a estrutura estimulada, efeito que é semelhante ao da ressecção cirúrgica. (iii) depressão sináptica. A estimulação pode alterar a eficiência sináptica por meio de processos de plasticidade sináptica e assim, diminuir a excitabilidade neuronal. (iv) modulação da atividade patológica. A estimulação interfere com a propagação da atividade patológica para outras estruturas (MicIntyre e cols., 2004; Rolston e cols., 2011). Alguns estudos ainda sugerem que os benefícios terapêuticos são baseados no efeito da lesão associada com o implante de eletrodos (Hodaie e cols., 2002).

Muitos trabalhos clínicos aplicam estímulos elétricos em diferentes estruturas, como o núcleo anterior do tálamo (Cooper e cols., 1982), o núcleo centro medial do tálamo (Velasco e cols., 1989; Velasco e cols., 1997; Velasco e cols., 2007), o núcleo subtalâmico (Benabid e cols., 2002) e o hipocampo (Velasco e cols., 2000; Vonck e cols., 2002; Velasco e cols., 2007). Entretanto, muitos desses trabalhos foram feitos de modo não controlado e/ou pouco documentados e suas diretas aplicações não sobreviveram a um estudo controlado.

Na prática com animais, modelos de crises induzidas química ou eletricamente são utilizados. Os resultados sugerem que estimulação elétrica reduz a severidade e aumenta o limiar para as crises, independente do órgão alvo: hipocampo (Wyckhuys e cols., 2007; Wyckhuys e cols., 2009; Zhang e cols., 2009), amígdala (Wu e cols., 2008; Cota e cols., 2009), corpo caloso (Ozen & Teskey, 2009) e núcleo anterior do tálamo (Hamani e cols., 2008). Entretanto, nenhum desses trabalhos apresentou os mecanismos de ação responsáveis pelo efeito terapêutico e como os modelos de crises empregados são variáveis, os achados não podem ser aplicados à clínica experimental.

Apesar das dificuldades inerentes a este tipo de investigação, a área de EIC está em forte expansão (Hamani e cols., 2009; Berenyi e cols., 2012) e modelos animais que permitam um maior controle experimental bem como uma maior similaridade com a condição patológica humana, podem contribuir significativamente no avanço dessa terapia inovadora para as epilepsias.

Até o presente momento, nenhum protocolo de EIC de baixa frequência apresentou os mecanismos de ação responsáveis pelo efeito anti-epileptogênico e/ou anti-ictogênico em modelos animais crônicos de epilepsia e a sua influência sobre as oscilações de alta frequência patológicas é desconhecida.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a eficácia da estimulação intracerebral de baixa frequência na modulação das oscilações de alta frequência patológicas em animais cronicamente epilépticos (modelo de epilepsia do lobo temporal), bem como avaliar seus efeitos sobre a frequência de crises espontâneas.

Utilizando um protocolo de estimulação de baixa frequência (EBF) procuramos produzir uma diminuição da excitabilidade da principal aferência hipocampal, a via perforante, e testar a consequência sobre as oscilações de alta frequência patológicas.

Os objetivos específicos deste trabalho incluiram:

- Desenvolver um modelo experimental da epilepsia do lobo temporal em ratos;
- Desenvolver ferramentas de detecção e análise das oscilações de alta frequência no hipocampo de animais cronicamente epilépticos;
- Implementar a tecnologia de estimulação elétrica intracerebral e registro de potencial de campo local, de modo simultâneo;
- Testar a eficácia de um protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência capaz em modular as oscilações de alta frequência;
- Avaliar a influência desse protocolo na frequência e duração das crises espontâneas.

Esperamos que os resultados do presente trabalho possam auxiliar no aprendizado da relação entre a estimulação elétrica de baixa frequência e as oscilações de alta frequência patológicas, bem como contribuir com o refinamento dos protocolos de estimulação elétrica intracerebral empregados no controle das crises epilépticas.

3. Materiais & Métodos

3.1. Considerações éticas

Para a realização deste estudo foi necessário o uso de animais de laboratório. Todas as questões éticas foram consideradas e os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com a Lei Arouca (Lei no. 11.794/2008), que regulamenta o uso de animais em atividades de pesquisa. Os protocolos empregados foram previamente aprovados pelos Comitês de Ética para Uso de Animais (CEUA) locais (Protocolos #07/2010, CEUA-IINN-ELS, e #039/2011, CEUA-UFRN, anexo C e D).

3.2. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, com 2 - 4 meses de idade, com 200 - 300g no início do experimento, provenientes dos biotérios do IINN-ELS e do Instituto do Cérebro da UFRN. Os animais foram mantidos em ambientes com temperatura e umidade controladas (21 - 24°C e 50 - 70%), com ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara começando às 6am) e com livre acesso à comida e à água. Nesta dissertação, o número de animais é representado pela letra N e o número de eventos/amostras pela letra n.

3.3. Produção de modelos animais de Epilepsia do Lobo Temporal

Animais foram feitos epilépticos por meio da indução química de um estado epiléptico (SE; para maiores informações sobre modelos experimentais em epilepsia ver Anexo B). Para isso, utilizamos diferentes agentes convulsivantes (Figura 6). No modelo da pilocarpina, um agonista muscarínico, 3 protocolos foram utilizados. No primeiro, animais (N = 6) receberam 320 mg/kg de pilocarpina (Merck) por via intraperitoneal (ip), 30 minutos após a injeção de 1 mg/kg de metil-escopolamina (ip, SIGMA) (Cavalheiro e cols., 1991). A metil-escopolamina é um antagonista muscarínico que não atravessa a barreira hematoencefálica e por isso, atenua a ativação colinérgica periférica produzida pela alta dose de pilocarpina. No segundo protocolo, a pilocarpina (30 - 40

mg/kg, ip) foi administrada 24 horas após a administração do cloreto de lítio (127 mg/kg, ip). Neste protoclo, os animais (N = 7) foram pré-tratados com metil-escopolamina como descrito anteriormente (Honchar e cols., 1983). No terceiro protocolo, os animais (N = 4) receberam pilocarpina diretamente no parênquima cerebral (2,4 mg/µl) por meio de uma cânula guia posicionada no hipocampo ventral com o auxílio de um atlas de estereotaxia (a partir do bregma, em mm, AP: 4,6; ML: 4,8 e DV: 5,0) (Paxinos & Watson, 1997). Com uma seringa tipo Hamilton com volume total de 10 µl, 1 µl de pilocarpina foi injetada, com um fluxo de 0,5 µl/min. A agulha injetora permaneceu no local por 5 min após o término da injeção para evitar o refluxo da solução (Furtado e cols., 2002). Finalmente, outro grupo de animais (N = 2) recebeu 12 mg/kg de ácido caínico (ip). Os animais que não apresentaram crises comportamentais até 60 min foram injetados novamente com o ácido caínico (5 mg/kg, ip) até a dose máxima de três injeções (Ben-Ari e cols., 1984).

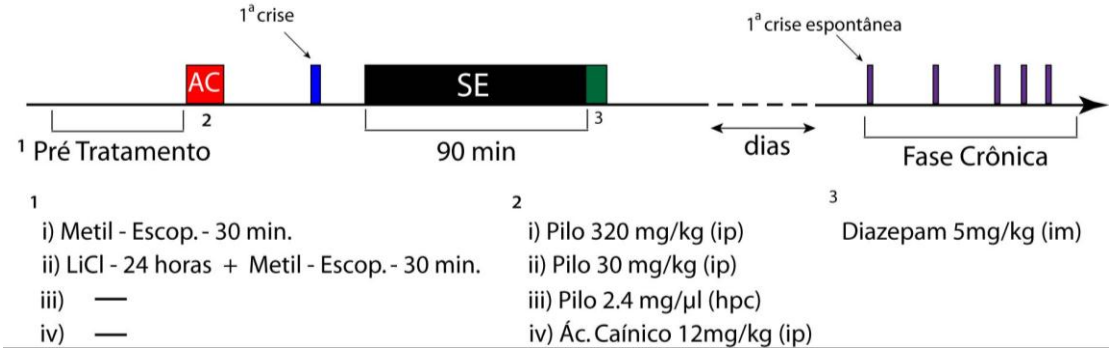

Figura 6 – Protocolo de indução do estado epiléptico (SE) pela administração de agentes convulsivantes (AC). No presente trabalho, utilizamos o agonista colinérgico, pilocarpina ou o agonista glutamatérgico, ácido caínico, para induzir um quadro de convulsão sustentada. O primeiro protocolo (i) utilizou uma alta concentração de pilocarpina (Turski e cols., 1983), enquanto que no segundo protocolo (ii), a concentração de pilocarpina foi reduzida pelo pré-tratamento com cloreto de lítio (LiCl) (Honchar e cols., 1983). Em ambos os protocolos, um pré-tratamento com metil-escopolamina foi utilizado para reduzir os efeitos periféricos do colinomimético. O terceiro protocolo (iii) administrou pilocarpina diretamente no hipocampo ventral (Furtado e cols., 2002). Nesse caso, uma cânula guia foi posicionada no local 7 dias antes da indução do SE. No quarto protocolo (iv), os animais foram tratados sistemicamente com ácido caínico (Ben-Ari e cols., 1984). Após 90 minutos de SE, os animais receberam 5 mg/kg de diazepam (i.m.), como forma de reduzir a severidade do SE e a mortalidade. Após um período latente, que varia de dias a meses, as primeiras crises espontâneas são observadas (fase crônica do modelo). AC: agente convulsivante; LiCl: Cloreto de Lítio ; SE: estado epiléptico. A ilustração tem fim didático e não respeita as relações temporais entre os eventos.

Após a administração dos fármacos, os animais foram colocados em caixas de acrílico transparentes e seu comportamento foi observado. Iniciou-se assim a fase aguda do protocolo, na qual os animais apresentam comportamentos estereotipados, como hipocinesia, salivação, automatismos orofaciais e clonias. As manifestações ictais foram classificadas de acordo com a Escala de Racine (Racine, 1972) (Tabela 1). O SE foi considerado como a persistência de crises comportamentais contínuas por mais de 5 minutos (Cavalheiro e cols., 1991; Mello e cols., 1993). Noventa minutos após o início do SE, 5 mg/kg de diazepam foi administrado por via intramuscular (im) para reduzir a severidade do SE e diminuir a mortalidade. Os animais que entraram em SE receberam cuidado especial, sendo hidratados oralmente com solução de sacarose (2%) diluída em soro fisiológico. Para contribuir com a hidratação, fatias de frutas (maçã) foram colocadas diariamente na caixa moradia por um período de 4 dias.

Tabela 1 - Escala de Racine (Racine, 1972) que quantifica a progressão comportamental de crises límbicas.

Estágio	Comportamento
0	Imobilidade
1	Automatismos Orofaciais
2	Clonia Cabeça
3	Clonia das patas dianteiras
4	Elevação
5	Queda

3.4. Vídeo monitoramento das crises espontâneas e recorrentes

Os animais que evoluíram para o SE foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à comida e à água, sendo monitorados por câmeras individuais de vídeo para a ocorrência de crises espontâneas (24 h/dia) por até 6 meses. O sistema de vídeo monitoramento consistiu de câmeras de vídeo com luz infravermelha (VTEK) conectadas a um sistema digital de aquisição de imagens (Digital Video Recorder - DVR, Seykon Eletronics). O sistema de monitoramento utilizou tecnologia de detecção de movimento para iniciar o registro (registro

mínimo de 40 s). Os vídeos foram analisados utilizando um programa comercial, o Windows Media Player, reproduzido a uma velocidade de oito vezes a original.

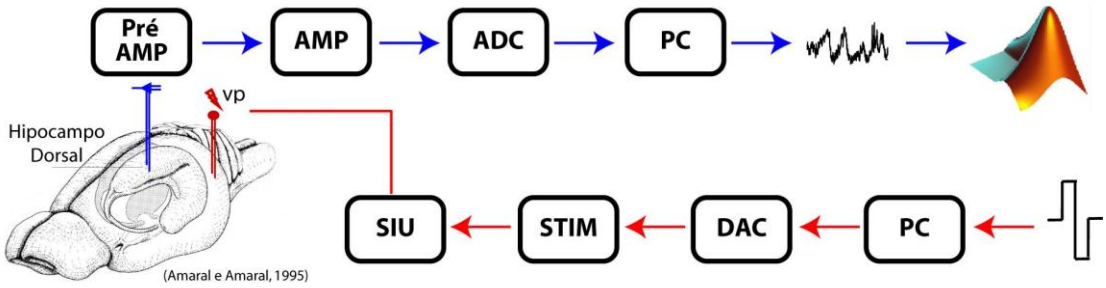

Figura 7 – Representação esquemática do sistema de registro e estimulação utlizados para o implante crônico dos eletrodos. Pulsos de diferentes frequências e intensidades foram gerados no computador (PC) e convertidos em um sinal analógico pela placa conversora digital-analógica (DAC). Esta alimenta um estimulador (STIM) que regula a intensidade do pulso a ser aplicado, após o sinal ser isolado opticamente pela unidade isoladora de estímulos (SIU). Para cada pulso aplicado, um fEPSP e um PS é produzido. Esse potencial de campo local (LFP, do inglês, local field potential) é captado por eletrodos posicionados no GD e em CA3. Esse LFP é pré-amplificado (Pré-AMP), amplificado (AMP) e digitalizado (ADC). O sinal registrado é visualizado no monitor e armazenado no PC por um programa escrito especificamente para esse fim. Todas as análises foram feitas por rotinas escritas em Matlab.

3.5. Implante de eletrodos e registros eletrofisiológicos agudos

Aproximadamente 1 mês após o SE, os animais foram implantados com eletrodos de registro e estimulação nas regiões do GD e de CA3, e na via perforante, respectivamente. Para isso, os animais receberam a administração de antibiótico Flotril 2,5% (2ml/kg; sb), foram anestesiados com um mistura de cetamina/xilazina (100/20 mg/kg; ip) e colocados em um aparelho estereotáxico. A temperatura corporal foi mantida a 37 ^{o}C com o auxílio de uma placa de aquecimento e os olhos foram cobertos com um papel umedecido em solução salina. Após incisão longitudinal do escalpo e remoção do periósteo, o crânio foi exposto e orifícios para o acesso à via perforante, GD e CA3 foram feitos com o auxílio de uma broca de acordo com o atlas de estereotaxia (Paxinos & Watson, 1997). Um par de eletrodos feitos de aço inoxidável (60 µm de diâmetro, desnivelados com 500 µm de distância entre as pontas; California Fire Wire Company) para estimulação foi posicionado na via perforante do hipocampo (a partir do bregma, em mm, AP: 7,2; ML: 4,5; e DV: 2) para estimular

as fibras aferentes do hipocampo. O potencial de campo espontâneo e evocado foi registrado no hipocampo dorsal com eletrodos monopolares de aço inoxidável (60 μm de diâmetro; California Fire Wire Company) colocados no GD (a partir do bregma, em mm, AP: 3,6; ML: 1,19; DV: 2,5) e na região de CA3 (a partir do bregma, em mm, AP: 3,6; ML: 3,4; DV: 2). O perfil dos potenciais evocados durante o implante dos eletrodos foi utilizado para maximizar as respostas no eixo dorso-ventral conforme descrito anteriormente (Queiroz e cols., 2009).

Os eletrodos de registros e estimulação foram inseridos em um conector comum, e este, a um headstage preso a um dos braços do aparato estereotáxico. O sinal foi pré-amplificado (MAP, Plexon Inc), amplificado (A-M Systems), filtrado entre 0,3 Hz e 5 kHz e digitalizado (12-bits, National Instruments) com uma taxa de amostragem de 2 kHz. O sinal adquirido foi visualizado na tela de um computador utilizando um software de aquisição caseiro, escrito em Matlab e paralelamente, em um osciloscópio digital (Tektronix, TDS2000B) (Figura 7). O sistema de estimulação foi composto por: (i) unidade isoladora de estímulo PSIU6 (Grass Instruments); (ii) estimulador DS9A (Digitime Stimulator); (iii) placa conversora digital analógica (National Instruments) e (iv) programa de controle e aquisição (Neuron, rodando em Matlab). Os estímulos consistiram de pulsos bifásicos quadrados com duração de 200 μs, com diferentes intensidades. Eletrodos de referência foram posicionados em parafusos transcranianos, acima do córtex frontal / bulbo olfatório. Após otimizar as respostas evocadas, os eletrodos foram fixados ao crânio utilizando cimento acrílico polimerizante. Detalhes sobre o procedimento cirúrgico é ilustrado na Figura 8.

Após a cirurgia, os animais receberam a administração subcutânea (sc) de antibiótico Flotril 2,5% (2ml/kg) e a analgesia pós-cirúrgica foi obtida pelo uso de buprenorfina (0,5 - 2,5mg/kg, sc), dados imediatamente após a cirurgia e repetidos por até 5 dias. Terminado o procedimento, os animais retornaram para gaiolas individuais. A temperatura corporal foi mantida a 37 ^{o}C até o fim da anestesia (marcada pelo início da ambulação).

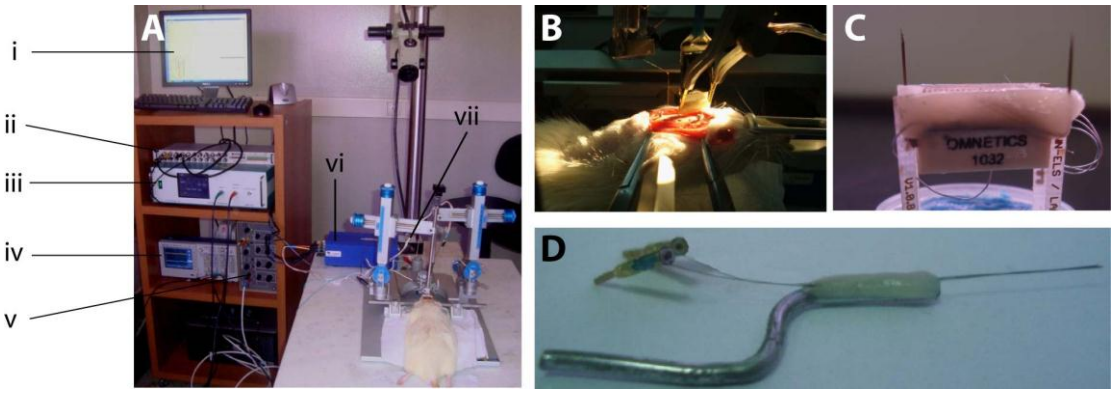

Figura 8 – Fotografia da preparação experimental durante o implante crônico dos eletrodos, com realce importante dos equipamentos e tecnologias desenvolvidas nesta tese. **(A)** Visão geral do centro cirúrgico: (i) monitor do computador, (ii) placa conversora analógica-digital, (iii) amplificador, (iv) osciloscópio e (v) estimulador. À direita, pode-se observar o aparelho estereotáxico com o rato anestesiado durante o procedimento cirúrgico. Pode-se ver também o pré-amplificador (vi) e a unidade isoladora de estímulos (vii). **(B)** Fotografia da cabeça do rato durante a cirurgia estereotáxica para implante de eletrodos. Note o posicionamento perpendicular ao crânio dos eletrodos de estimulação e de registro. **(C)** – Exemplo de uma matriz de eletrodos (tungstênio, 50 µm de diâmetro) utilizado em registros agudos e crônicos do Instituto. **(D)** Arranjo de 2 eletrodos de aço inoxidável, de 60 µm de diâmetro, utilizados na estimulação.

3.5.1. Registros eletrofisiológicos crônicos

Os registros começaram aproximadamente 7 - 10 dias após o implante dos eletrodos. Para isso, os animais foram manipulados por três dias consecutivos antes dos experimentos começarem com o objetivo de reduzir o estresse associado à situação experimental. Depois desse período, os animais foram mantidos em uma gaiola de acrílico (40 x 40 x 80 cm) e conectados ao sistema de registro e estimulação. Os equipamentos e configurações do sistema de registros e estimulação foram os mesmos dos descritos acima, no tópico de *Implante de eletrodos e registros eletrofisiológicos agudos*.

3.6. Desenho experimental

Após a habituação, a atividade espontânea e as respostas evocadas no GD e em CA3 foram avaliadas. Para cada animal, foram determinadas as intensidades de estimulação mínima e máxima, capazes de evocar uma resposta limiar (0%) e uma resposta saturada (100%), respectivamente. As curvas de estímulo - resposta foram construídas utilizando intensidades de corrente

intermediárias, com os seguintes valores: 0% (limiar), 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 80% e 100% (saturada). Tal mensuração foi importante para normalizar a intensidade de estimulação entre os animais durante o protocolo de estimulação de baixa frequência. Como forma de assegurar a indução de plasticidade sináptica, utilizamos intensidades de 80%. Com esta intensidade, recrutamos a maioria da população neuronal ao redor do eletrodo de registro e consequentemente, obtivemos uma resposta evocada de grande amplitude (Figura 9).

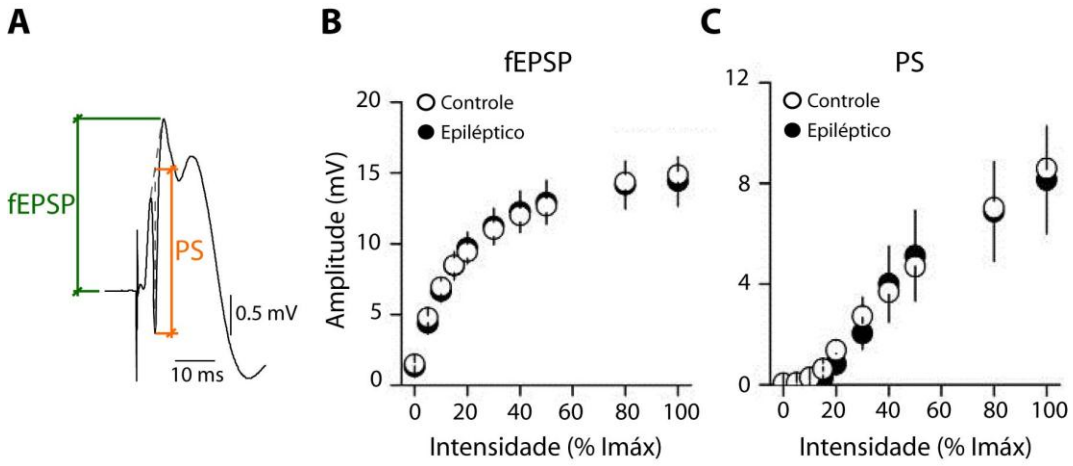

Figura 9 – Exemplo do potencial extracelular registrado no giro denteado após estimulação da via perforante em um animal não anestesiado e em livre movimento. **(A)** O potencial evocado típico é composto de pelo menos dois eventos, o potencial extracelular pós-sináptico (fEPSP) e o potencial de ação coletivo (PS). A amplitude do fEPSP foi calculada como a variação da amplitude entre o primeiro pico positivo e a média da amplitude dos 1,5 ms que precederam a estimulação (linha verde), enquanto que a amplitude do PS foi calculada pelo ponto médio da distância do pico negativo para os picos positivos precedente e subsequente (linha laranja). **(B)** Curvas estímulo-resposta registradas no giro denteado após estimulação da via perforante em animais cronicamente epilépticos e controles. As intensidades mínimas (0%) e máxima (100%) são aquelas capazes de evocar uma resposta minimamente discernível e uma resposta saturada, respectivamente. Note que apesar da condição epiléptica não existe diferença quanto à amplitude da resposta evocada Dados expressos como média ± erro padrão. Modificado a partir de (Queiroz e cols., 2009).

O protocolo de estimulação de baixa frequência (EBF) iniciou quando os animais apresentaram grande quantidade de crises espontâneas e frequência de crises relativamente estáveis ao longo dos dias. Essa situação possui semelhança fenomenológica com as crises de pacientes com ELT refratária. O protocolo experimental apresentou três momentos específicos:

Momento Pré-Estimulação (PRÉ): Os animais foram registrados por 6 dias consecutivos durante os quais estímulos esporádicos foram aplicados na via perforante com o objetivo de avaliar a excitabilidade da rede e determinar a intensidade de estimulação no protocolo de EBF. O número de horas do registro eletrofisiológico analisadas neste período variou entre 4 e 15 horas por dia (média de 9 ± 2 h/dia).

Momento Estimulação de Baixa Frequência (EBF): Com o objetivo de modular as oscilações hipocampais em animais cronicamente epilépticos aplicamos estímulos elétricos na via perforante a uma frequência de 0,2 Hz, durante 12h (8640 pulsos no total). Utilizamos pulsos quadrados bifásicos únicos, com duração de 200 μs e intensidade de 80% (conforme descrito acima). O tempo de registro e análise nesse momento foi de 13 horas (incluindo 30 min antes e 30 min depois).

Momento Pós-Estimulação (PÓS): Após a EBF, o estímulo elétrico foi desligado e os animais foram registrados por mais 10 dias consecutivos. O número de horas registradas e analisadas neste período variou entre 19 e 24 horas (média de 22 ± 1 h/dia).

3.7. Análise dos dados

Todas as análises foram conduzidas utilizando rotinas específicas escritas em Matlab (MathWorks). O registro eletrofisiológico foi inspecionado para quantificação de três tipos de eventos: (i) os potenciais evocados; (ii) as oscilações de alta frequência e (iii) as crises espontâneas.

3.7.1. Potencial evocado

A estimulação da via perforante ativa os neurônios granulares do GD de maneira síncrona, produzindo uma despolarização característica (fEPSP, do inglês, field Extracellular Postsynaptic Potential) que, a partir de uma certa intensidade, resulta em um potencial de ação coletivo (PS, do inglês, Population Spike) bem definido. Ambos os eventos podem ser interpretados como medidas

de excitabilidade neuronal. Quando registrado por um eletrodo posicionado no hilo do GD, o fEPSP apresenta-se como uma deflexão positiva, com duração de 8 a 15 ms, e amplitude dependente da intensidade de estimulação. Caso essa estimulação produza uma despolarização acima do limiar de disparo, um potencial de ação coletivo será produzido. No potencial de campo, esse PS apresenta-se como uma deflexão negativa, geralmente na fase ascendente do fEPSP, com duração entre 2 e 5 ms. As amplitudes de ambos os eventos foram calculadas conforme ilustrado na Figura 9.

3.7.2. Oscilações de alta frequência

Apenas animais com epilepsia apresentaram oscilações de alta frequência nas regiões do GD e de CA3. Essas oscilações ocorreram exclusivamente durante uma onda aguda (espícula) interictal (Figura 10). Animais controle não apresentaram nenhum dos dois eventos acima citados.

Inicialmente o registro foi pré-processado, com a identificação dos períodos de ocorrência das ondas agudas interictais associadas às oscilações de alta frequência como forma de restringir as análises a um evento consistente, de perfil eletrográfico bem definido. Essa etapa teve o objetivo de reduzir o tempo de análise computacional e garantir baixa incidência de eventos falsos-positivos. Os critérios de inclusão dos trechos de interesse foram: (i) ocorrência de espículas interictais por pelo menos 30 s (presença mínima de 8 eventos; intervalo inter-espícula de aproximadamente 4 s); (ii) amplitude da espícula interictal pelo menos 3 x a amplitude da atividade basal; (iii) presença de oscilações de alta frequência no ponto de maior positividade da onda aguda interictal e (iv) co-ocorrência nos eletrodos posicionados no GD e em CA3.

Após a pré-seleção dos trechos, os registros foram filtrados para frequências abaixo de 40 Hz utilizando um filtro de resposta finita linear (FIR) por meio da função *eegfilt*. Esse filtro, parte do toolbox EEGLAB, filtra o sinal em ambas as direções, evitando atrasos ou avanços de fase. Para as oscilações de alta frequência, utilizamos o mesmo processo, entretanto, filtrando o sinal entre 150 e 800 Hz. Ondas agudas interictais com amplitude acima de 3 desvios-padrão

(considerando todo o traçado) foram identificadas. O pico positivo de cada onda aguda interictal foi utilizado como etiqueta temporal (do inglês, *time stamp*) nas análises subsequentes. As durações das ondas agudas interictais e das oscilações de alta frequência foram calculadas como o intervalo de tempo entre os cruzamentos ascendentes e descendentes do registro com um valor limiar (Figura 10). Para as ondas agudas interictais, o limiar foi calculado como sendo a média + 3 desvios-padrão do sinal filtrado abaixo de 40 Hz. Para as oscilações de alta frequência, o limiar foi calculado como sendo a média + 3 desvios-padrão da potência instantânea do sinal entre 150 e 800 Hz. A potência instantânea foi calculada utilizando a transformada de Hilbert (função *hilbert*, Signal Processing Toolbox, Matlab).

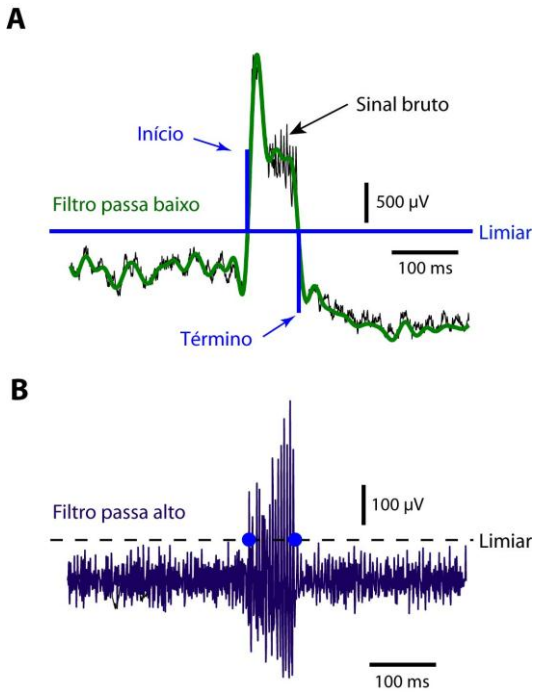

Figura 10 - Exemplo representativo de espícula (onda aguda) interictal (ISW, do inglês, interictal sharp wave) associada com a oscilação de alta frequência (OAF). **(A)** Para a quantificação da duração da ISW o sinal foi filtrado para baixas frequências (< 40 Hz) e um limiar de 3 desvios-padrão (linha azul) foi estabelecido. O cruzamento do limiar demarcou os momentos de início e fim do evento, cuja duração foi calculada a partir da diferença entre esses dois pontos. **(B)** Para a quantificação da duração da OAF, o sinal foi filtrado entre (150 e 800 Hz) e o envelope de potência calculado utilizando a transformada de Hilbert. Como em A, o cruzamento do limiar (3 desvios-padrão) demarcou os momentos de início e fim do evento, sendo a duração calculada a partir da diferença entre esses dois pontos.

Para evitar a inclusão de falsos-positivos, decorrentes de artefatos de movimento ou filtro, os eventos pré-selecionados foram validados por inspeção visual do espectrograma (função *spectrogram*; 50% de sobreposição, em janelas tipo Hanning de 50 ms de duração). Para as análises estatísticas (ver abaixo) o espectro de potência das oscilações de alta frequência foi calculado por meio da função *pwelch* (50% de sobreposição, em janelas tipo Hanning de 100 ms de duração), aplicado a 600 ms do registro filtrado para altas frequências (centrado no pico da espícula interictal), tanto para registros do GD como para registros de CA3. Três parâmetros foram utilizados para quantificar a dinâmica espectral a partir do espectro de potência normalizado (Figura 11): (i) a entropia do espectro, (ii) o índice de oscilação de alta frequência e (iii) o modo espectral, conforme (Ibarz e cols., 2010). A entropia mede a desorganização / dispersão espectral e pode ser calculada por meio da fórmula

$$-\sum_f p(\mathrm{f}) \log_2(p(\mathrm{f}))$$

onde p(f) é a potência normalizada entre 150 - 800 Hz em cada frequência f. Por definição, a entropia não depende da frequência e é máxima para ruídos branco ou rosa (Figura 11B). O segundo parâmetro, o índice de oscilação de alta frequência (pOAFi) quantifica a proporção do espectro na faixa superior das oscilações de alta frequência (380 - 720 Hz). O índice é calculado por meio da razão entre as potências na faixa de 380 - 720 Hz e 150 - 720 Hz (Figura 11C). Seu valor varia de 0 a 1, sendo que valores próximos a 1 indicam oscilações predominantes acima de 380 Hz. Finalmente, o terceiro parâmetro, o modo espectral, refere-se a frequência de maior potência no espectro (Figura 11D).

A quantificação das crises espontâneas foi feita por inspeção visual de dois tipos qualitativamente distintos de registro. O monitoramento por vídeo utilizou a expressão comportamental das crises, sendo o início da crise determinado pela ocorrência de clonias orofaciais e o fim caracterizada por imobilidade, acompanhada ou não de chacoalhada corporal (wet-dog shakes). O início e o fim das crises eletrográficas foram caracterizados pela primeira espícula que precedeu a atividade paroxística, ou seja, atividade eletrográfica de grande amplitude e frequência, e a depressão gradual da amplitude do sinal, geralmente acompanhada de disparos em salva. Em ambos os casos, a duração

das crises foi calculada como o tempo entre o início e o fim. Considerando a diferença entre os tempos de amostragem ao longo dos dias de registro, a frequência de crises espontâneas foi normalizada (crises/ hora).

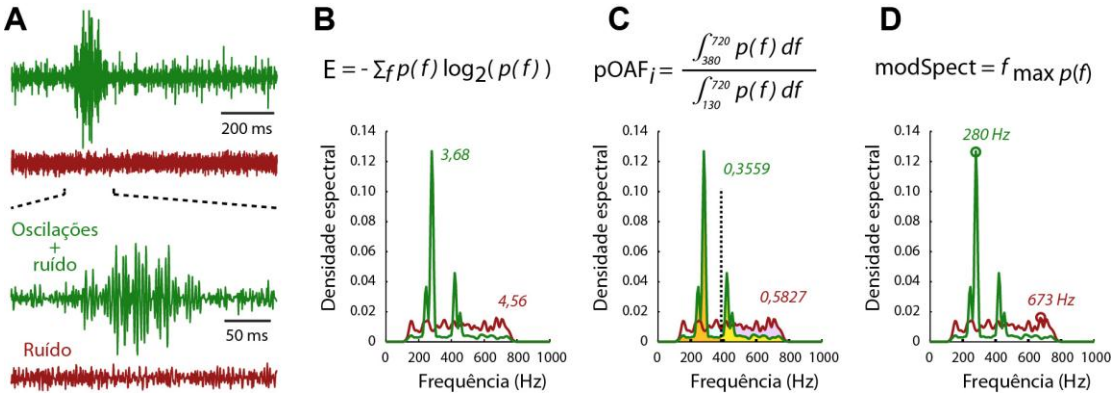

Figura 11 – Representação esquemática dos três principais parâmetros extraídos do espectro de potência utilizadas na quantificação das oscilações de alta frequência **(A)** Exemplo de dois registros distintos, um contendo um envelope de oscilações de alta frequência e ruído (verde) e outro contendo apenas ruído (vermelho). O par de traçados abaixo é uma expansão do trecho demarcado acima. **(B)** A entropia quantifica o grau de desorganização espectral. Os valores são máximos para registros sem oscilações definidas. Note que a entropia (ver valores no gráfico) do ruído (vermelho) é maior quando comparada com o sinal contendo uma oscilação (verde). **(C)** O índice de oscilação de alta frequência (pOAFi) quantifica a proporção do espectro nas faixas de frequência das oscilações de alta frequência (de 380 – 720 Hz). Seu valor varia de 0 a 1 e índices altos indicam maior prevalência de oscilações acima de 380 Hz. **(D)** O modo espectral representa a frequência de maior potência no espectro. Observe que o registro em verde apresenta modo espectral de 280 Hz, enquanto que o registro em vermelho apresenta modo espectral de 673 Hz. A fórmula matemática utilizada em cada um dos métodos está descrita acima dos gráficos em B-D. Método adaptado a partir de (Ibarz e cols., 2010).

3.8. Análise estatística

Apenas os animais cronicamente epilépticos, com crises espontâneas, foram considerados para análise. Os parâmetros de entropia, índice de oscilação de alta frequência e modo espectral foram promediados em cada um dos momentos experimentais (antes, durante e depois da estimulação) e comparados utilizando análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste t de Student, quando necessário. Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão (para eventos, n) ou média ± erro-padrão (para grupo, N). Valores de significância abaixo de 5% (p<0,05) foram utilizados para refutar a hipótese H_0.

3.9. Perfusão e análise histológica

Após o término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental (Cristália) na dose de 60 mg/kg e perfundidos. A perfusão consistiu na injeção de 0,1 µl de heparina no ventrículo esquerdo, seguido por 300 ml de salina (NaCl 0,9%) e 300 ml de paraformaldeído 4% (PFA 4%). Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e colocados em solução crioprotetora (sacarose 30%) por cerca de três dias. Em seguida, os cérebros foram congelados e colocados em um meio de inclusão (TissueTek®) e fatiados em secções coronais de 60 µm de espessura com um criostato (Microm, HM550). Os cortes foram montados sobre lâminas previamente silanizadas (Amitel, Brasil), coradas com Nissl (cresil-violeta), visualizadas e fotografadas com o auxílio de um microscópio óptico (NIKON, H600L) como o objetivo de verificar o posicionamento dos eletrodos e lesões macroscópicas.

4. Resultados

4.1. Modelo experimental de Epilepsia do Lobo Temporal

A administração de pilocarpina, em todos os protocolos utilizados, resultou em crises comportamentais bem caracterizadas, com progressiva severidade até o estabelecimento do SE. As alterações pré-ictais foram observadas a partir de 1 - 5 min após a administração e consistiram em acinesia, piloereção, tremor, automatismos orofaciais e chacoalhadas corporais (wet-dog shakes). Essas alterações progrediram para crises límbicas e SE em 82% dos animais (N = 14; 3 protocolos). O grupo que recebeu a pilocarpina intra-hipocampal apresentou latência menor para o aparecimento da primeira crise quando comparado com os grupos que receberam a pilocarpina sistêmica, associada ou não ao cloreto de lítio (14 ± 2 min, 26 ± 12 min e 30 ± 4 min, respectivamente; $p<0,05$). A latência para o SE também foi menor para a via de administração intra-hipocampal quando comparada a via sistêmica, associada ou não ao cloreto de lítio (23 ± 1 min, 39 ± 13 min e 41 ± 9 min, respectivamente; $p<0,05$). Os animais tratados com ácido caínico (N = 2) também apresentaram crises límbicas e SE, entretanto com uma latência superior (44 ± 11 min e 72 ± 25 min, respectivamente).

Tabela 2 – Latência para a primeira crise e SE nos diferentes modelos de ELT.

			Latência (min)		**Ocorrência**
Agente convulsivante	**Via**	**Dose**	**1a crise**	**SE**	**SE**
Pilocarpina	i.p.	320 mg/kg	26 ± 12	39 ± 13	5/6 (83%)
Pilocarpina e Lítio	i.p.	30 mg/kg + LiCl 127mg/kg	30 ± 4	41 ± 9	5 / 7 (71%)
Pilocarpina	intra-hpc	2.4mg/µl	14 ± 2 ★	23 ± 1	4 / 4 (100%)
Ácido caínico	i.p.	12 mg/kg	44 ± 11 ☆	72 ± 25	2 / 2 (100%)

★ e ☆ $p<0,05$ em comparação com os demais grupos. Dados expressos como média ± erro-padrão. i.p.: intraperitoneal e intra-hpc: intra-hipocampal.

Apesar de todos os animais que entraram em SE terem recebido um dose de diazepam (5 mg/kg, im) como forma de atenuar o insulto, muitos animais vieram a óbtido. A Figura 12 mostra a função de distribuição acumulada da mortalidade na primeiras 40 horas após o início do SE para os diferentes protocolos utilizados.

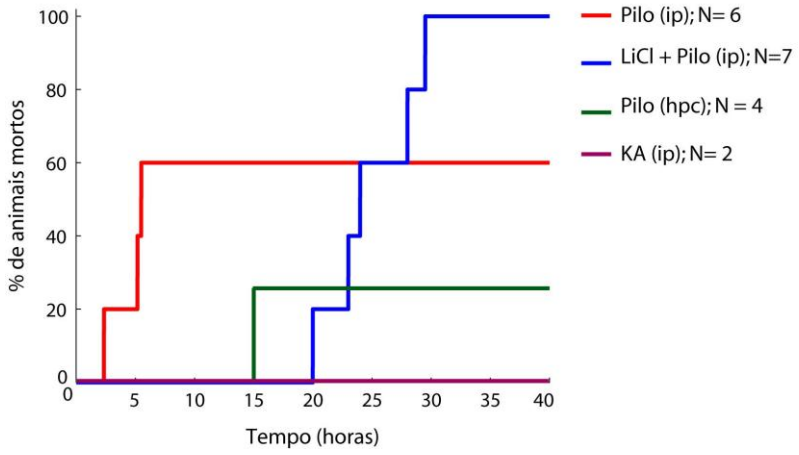

Figura 12 - Distribuição cumulativa (CDF) da probabilidade de óbito dos animais que evoluíram para o estado epiléptico (SE) de acordo com os protocolos utilizados. Note que a administração sistêmica da pilocarpina (Pilo) apresenta alta mortalidade, quer quando administrada isoladamente (vermelho) ou quando administrada associada ao cloreto de lítio (LiCl; azul). A administração intra-hipocampal de pilocarpina, bem como a administração sistêmica de ácido caínico (KA) tiveram baixa mortalidade.

Os animais que receberam ácido caínico foram aqueles que apresentaram maior taxa de sobrevida após o SE (100%). Diante disso, os animais deste grupo experimental foram os utilizados nos registros eletrofisiológicos descritos a seguir.

4.2. Atividade epileptiforme no hipocampo epiléptico

Animais cronicamente epilépticos e controles foram registrados de maneira intermitente durante 8 meses após o SE para quantificação de crises e oscilações de alta frequência. Animais controle (i.e., que não receberam qualquer administração de agentes convulsivantes) não apresentaram crises ou qualquer outra atividade epileptiforme em nenhum momento do registro (Figura 13A).

Por outro lado, animais epilépticos (modelo do ácido caínico) apresentaram atividade epilepforme, como espículas interictais (Figura 13B) e crises espontâneas (Figura 13D e E). Importante mencionar que observamos diferentes

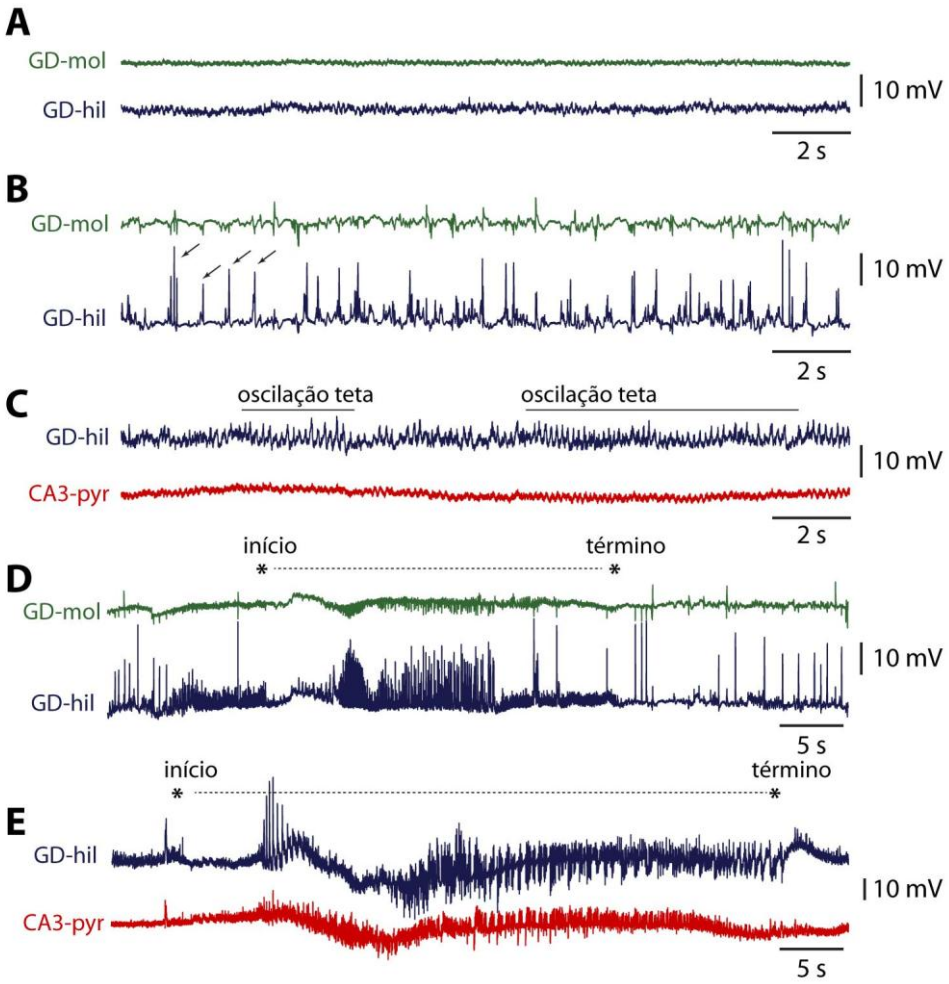

Figura 13 - Registros eletrofisiológicos de animais controle e epiléptico. **(A)** Potencial de campo local (LFP) obtido por um eletrodo posicionado no hipocampo dorsal de um animal controle. **(B)** LFP de um animal cronicamente epiléptico durante um período de imobilidade / sono de ondas lentas, com presença de espículas interictais (setas mostram apenas os 4 primeiros eventos). **(C)** LFP de um animal (diferente de B) cronicamente epiléptico, durante sono paradoxal. Note a presença de oscilações de teta (6 - 9 Hz; linha sobre o traçado) e completa ausência de espículas interictais. **(D)** LFP de um animal cronicamente epiléptico mostrando uma crise espontânea, 2 meses após o SE, com duração aproximada de 28 segundos. **(E)** LFP de um animal cronicamente epiléptico mostrando outro exemplo de crise (outro animal), com duração aproximada de 52 segundos. A duração da crise é representada em D e E por asteriscos e linhas pontilhadas. Note a diferença na escala de tempo entre os traçados. GD-hil: eletrodo posicionado no hilo do giro denteado. GD-mol: eletrodo posicionado na camada molecular do giro denteado. CA3-pyr: eletrodo posicionado próximo à camada piramidal de CA3.

tipos de espículas interictais (ver abaixo), e sua ocorrência dependia significativamente dos estados comportamentais e das oscilações espontâneas do encéfalo. O exemplo mais interessante é ilustrado na Figura 13C, onde o sono paradoxal, caracterizado por oscilações entre 4 e 12 Hz (ritmo teta) no hipocampo dorsal suprime completamente as espículas interictais. Importante notar que a ocorrência de espículas interictais foi observada de maneira mais abundante durante a ocorrência de ritmos lentos, como o mostrado na Figura 13B. Nos animais com crises espontâneas (N = 2), observamos que a frequência de crises nos primeiros meses pós-SE é bastante variada. Por esse motivo, aplicamos o protocolo de estimulação quando a frequência de crises ficou mais estável. Isso aconteceu aproximadamente 6 meses após o SE, em apenas 1 animal. Os resultados descritos abaixo se referem a esse animal.

4.3. Espículas interictais e oscilações de alta frequência

Espículas interictais e crises espontâneas são os principais marcadores da condição epiléptica. Os registros crônicos realizados em animais epilépticos mostram que as espículas interictais apresentam grande variabilidade, tanto de amplitude, como também em duração e forma. Um tipo de espícula interictal, que denominamos aqui de onda aguda interictal (ISW, do inglês, interictal sharp wave), nos chamou a atenção por apresentar em seu ponto de maior positividade uma oscilação de alta frequência (Figura 14). Denominamos esse característico evento eletrofisiológico de *complexo onda aguda interictal associado à oscilação de alta frequência* (ISW-OAF). O ISW-OAF é de fácil identificação e foi observado em registros obtidos a partir de eletrodos posicionados tanto no GD como em CA3. São eventos transientes, de alta amplitude, periódicos e característicos de momentos em que o animal não está engajado em nenhuma tarefa comportamental específica (como explorar, comer, beber, se limpar, entre outras). Assim, observamos períodos de ISW-OAF mais frequentemente durante o sono de ondas lentas e períodos de imobilidade. Nas 291,3 horas de registro (17 ± 7 h/dia; faixa 4,2 – 24 h / dia), identificamos 65 trechos com ISW-OAF (duração média de 5,1 ± 2,2 min), representando 1,91% do tempo total de registro. A periodicidade das ISW-OAF é outra característica interessante, pois

observamos que o intervalo é pouco variável, sendo de aproximadamente 5 s. Todas as análises das OAF descritas a seguir se referem às obtidas durante o ISW.

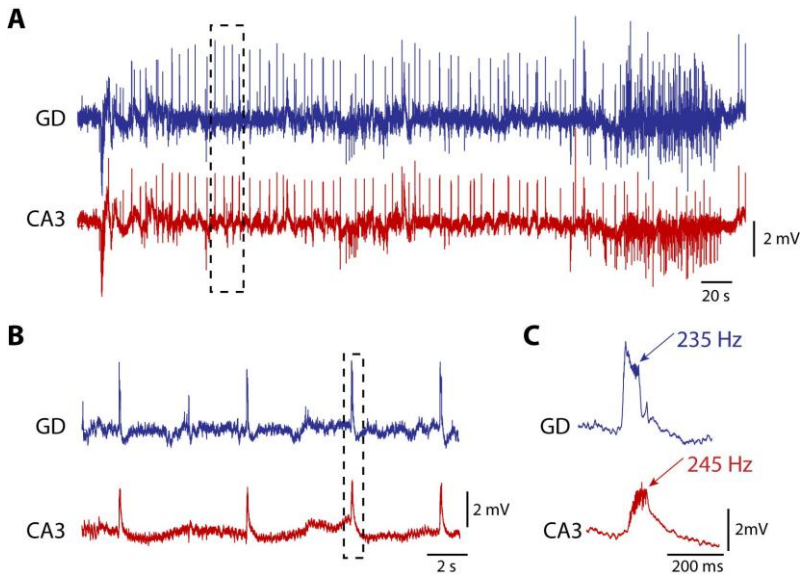

Figura 14 - Registro interictal de um animal cronicamente epiléptico. **(A)** Atividade interictal periódica caracterizada por espículas (ondas agudas) periódicas de alta amplitude (ISW) associadas a oscilações de alta frequência (ISW-OAF). O retângulo tracejado indica o trecho do traçado que está expandido na letra B. **(B)** As espículas interictais com OAF ocorrem durante períodos de imobilidade / sono de ondas lentas. A frequência de recorrência da ISW/OAF é de 0,2 Hz (i.e., um evento a cada 5 s). **(C)** Destaque para as oscilações de alta frequência patológicas que ocorrem no pico da ISW tanto nos eletrodos posicionado no giro denteado, como no CA3. Todas as quantificações dos OAF foram realizadas nesse tipo de evento epileptiforme. Importante notar que as espículas interictais mostradas na Figura 13B (setas) se distinguem dessas por não apresentarem OAF.

Ainda que o mecanismo gerador das OAF seja desconhecido, acredita-se que essas oscilações sejam produzidas por pequenos grupos de neurônios, restritos a uma região circunscrita do encéfalo. Conforme ilustrado na Figura 14C, as OAF foram registradas por eletrodos posicionados tanto no GD como em CA3. Assim, procuramos determinar se o registro captado em ambos os canais se referiam a um único evento propagado por condução de volume, ou se refletiam oscilações de dois (ou mais) grupos neuronais ocorrendo no mesmo momento do tempo. Para isso, calculamos a correlação cruzada (função *xcorr* no Matlab, Signal Processing Toolbox) entre ambos os registros, tanto para a ISW como para a OAF (Figura 15). Para o registro não filtrado, a correlação cruzada mostra que a

ISW ocorre primeiro no GD (Figura 15A). O atraso entre a onda aguda em ambas as regiões é de aproximadamente 15 ms (inset no gráfico da direita da Figura 15A). Para o sinal filtrado para frequências altas (Figura 15B), a correlação cruzada mostra que as OAFs são síncronas em ambas as estruturas, com atraso próximo a zero (inset no gráfico da direita da Figura 15B). Entretanto, o potencial de campo filtrado sobreposto mostra que a amplitude varia diferentemente em ambos. Enquanto que no GD a amplitude tende a crescer na metade final da OAF, a amplitude em CA3 tende a diminuir após a metade da oscilação.

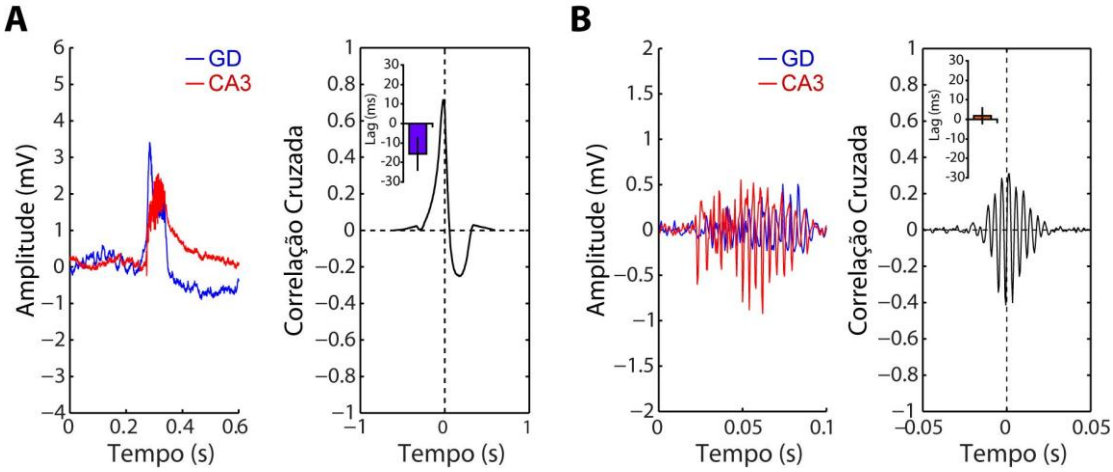

Figura 15 – Correlação cruzada entre os registros do giro denteado e de CA3. **(A)** Exemplo do LFP bruto registrado no giro denteado (azul) e em CA3 (vermelho) (esquerda) e a média da correlação cruzada. O gráfico de barras inserido mostra o atraso (lag) entre os sinais (n=65 eventos pré-estimulação; giro denteado liderando). **(B)** Exemplo do LFP filtrado para oscilações de alta frequência (150 – 800 Hz), como em A. Nesse caso, a correlação cruzada (direita) mostra que os eventos estão correlacionados, com atraso próximo a zero (gráfico de barras), apesar de estarem fora de fase. Note ainda que a amplitude da oscilação de alta frequência registrada com o eletrodo posicionado no GD aumenta ao longo dos ciclos, enquanto que a registrada em CA3 diminui.

Com o objetivo de avaliar essa dinâmica de maneira mais detalhada, calculamos o espectrograma as OAF. A análise do espectrograma permite avaliar a dinâmica da frequência no domínio temporal. Como exposto na Figura 16A, para a região do GD, as oscilações de alta frequência iniciam com frequências entre 100 e 200 Hz e depois aceleram, atingindo um pico de alta energia entre 200 e 300 Hz. Para a região de CA3 (16B) as oscilações atingem frequências mais

altas quando comparado com o GD. Esta estrutura apresenta dois pontos de alta anergia no espectrograma, um entre 200 e 320 Hz e outro entre 450 e 600 Hz. A frequência das oscilações diminui ao longo dos ciclos, tanto para o GD como para o CA3.

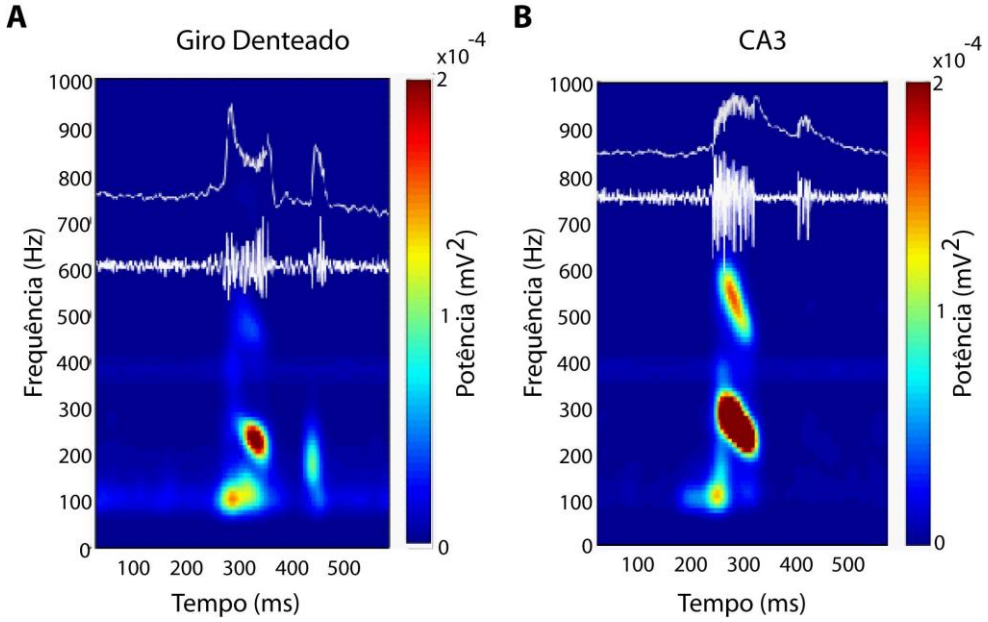

Figura 16 – Dinâmica das oscilações de alta frequência patológicas registradas por eletrodos posicionados no giro denteado e em CA3. **(A)** Espectrograma médio (n = 65 eventos) da pOAF no giro denteado no período pré-estimulação. Como referência, o LFP bruto e filtrado (80 – 800 Hz) é mostrado em branco. **(B)** O mesmo que em A, para o CA3. Note que a frequência das oscilações diminui ao longo dos ciclos, tanto para o giro denteado como para o CA3. Nesta região existem dois picos no espectrograma um entre 200 e 320 Hz e outro entre 450 e 600 Hz.

Após analisar as características espectrais das ISW-OAF e das oscilações de alta frequência, analisamos a influência da estimulação de baixa frequência da excitabilidade neuronal.

4.4. Estimulação elétrica de baixa frequência e redução de excitabilidade

A evolução temporal da amplitude do fEPSP e do PS da região do GD durante a aplicação da EBF por 12 horas é uma forma de mensurar a excitabilidade neuronal dessa rede. E como exposto na Figura 17, observamos que o protocolo de EBF influenciou a excitabilidade neuronal dessa rede. Houve

diminuição progressiva da amplitude do PS em 45% (amplitude média da primeira e da última hora de estimulação: 7,3 ± 3,0 mV e 4,1 ± 1,5 mV, respectivamente; $p<0,05$; teste t) e não houve modificação na amplitude do fEPSP, que se manteve constante durante todo o protocolo.

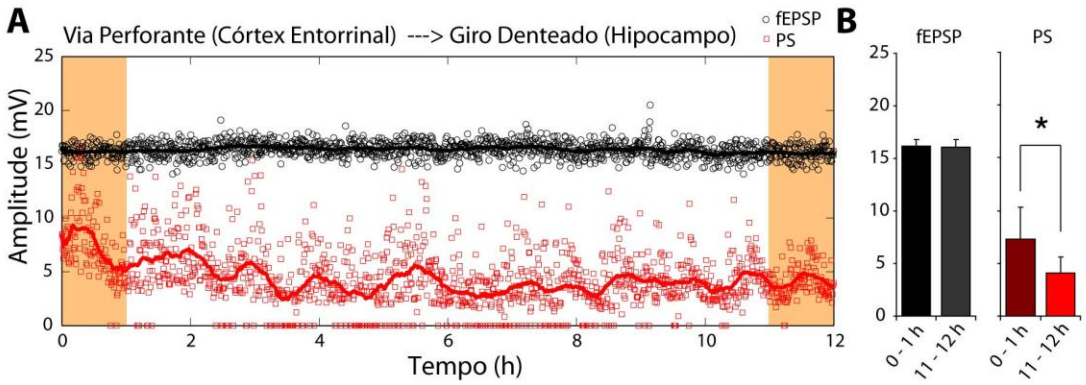

Figura 17 – Evolução temporal das amplitudes do potencial de campo evocado após estimulação de baixa frequência (0,2 Hz) da via perforante e registrado no giro denteado do hipocampo dorsal. Note que a amplitude do potencial extracelular pós-sináptico (fEPSP) se mantém constante ao longo das horas (círculo preto), enquanto que a amplitude do potencial de ação coletivo (PS) diminui progressivamente (quadrado vermelho).Tal protocolo reduziu significativamente a excitabilidade no giro denteado (amplitude média da primeira e da última hora: 7 ± 1 mV *vs.* 4 ± 1 mV; $p<0,05$; teste t de Student).

Este resultado demonstra que houve modulação da rede neuronal após a EBF, com redução da excitabilidade neuronal. Entretanto, a relação e a influência da estimulação elétrica sobre as oscilações são desconhecidas.

4.5. Modulação das oscilações de alta frequência por estimulação cerebral elétrica de baixa frequência

Com o objetivo de caracterizar os eventos selecionados durante o protocolo de estimulação, a duração da ISW-OAF e das pOAF foi mensurada (Figura 18). Durante a EBF, houve diminuição da duração de ambos os eventos. A duração da ISW-OAF passou de 72,8 ± 9,0 ms para 68,0 ± 6,4 ms e a duração das pOAF passou de 64,6 ± 9,3 ms para 54,9 ± 6,9 ms. Após o término do protocolo, a duração aumentou para ambos os eventos: 82,3 ± 13,8 ms para a onda aguda interictal e 70,5 ± 11,5 para a pOAF ($p<0,05$; teste t).

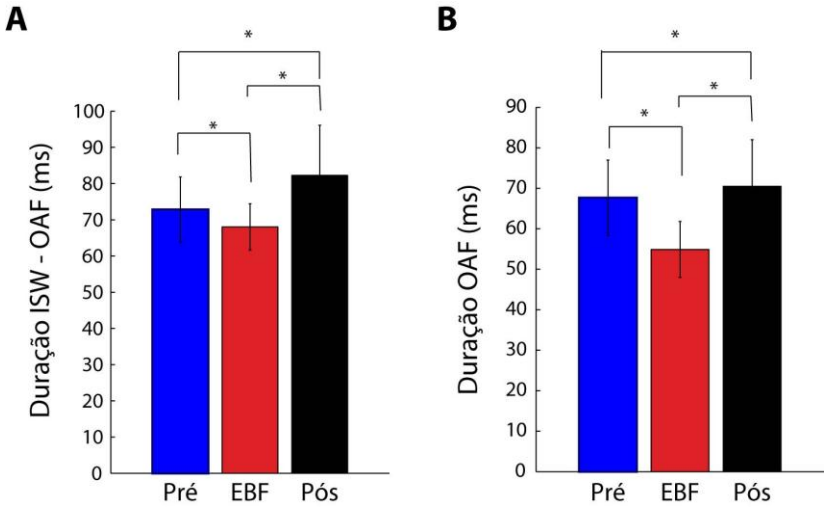

Figura 18 – Duração das ondas agudas interictais (ISW-OAF) **(A)** e das oscilações de alta frequência patológicas **(B)** detectadas na região do giro denteado antes, durante e após a estimulação de baixa frequência prolongada. Note que a duração dos eventos diminuiu e aumentou durante e após a aplicação dos estímulos, respectivamente. Dados expressos como média ± desvio padrão. Pré (azul,n = 185 eventos); EBF (vermelho, n = 18 eventos); Pós estimulação (preto, n = 618 eventos). *p<0,05; teste t de Student.

Após isso, as características espectrais das OAF foram mensuradas. A partir da análise de três parâmetros principais: entropia, índice de oscilação de alta frequência e modo espectral durante os três momentos do protocolo foi possível avaliar o efeitos da estimulação cerebral sobre a dinâmica das OAF. O nível de organização espectral foi mensurado a partir da entropia. (Figura 19). Antes do protocolo, estes valores eram 3,7 ± 0,3 para o GD e 3,7 ± 0,2 para a região de CA3. Durante o protocolo, houve redução significativa em ambas as regiões: 3,5 ± 0,2 para o GD e 3,3 ± 0,2 para CA3. Depois do protocolo, a entropia para o GD apresentou tendência para aumento, mas seu valor permaneceu inferior ao da situação basal: 3,6 ± 0,3. Já para a região de CA3, o valor da entropia aumentou depois do protocolo, mas também permaneceu inferior ao da situação basal: 3,5 ± 0,2 (p<0,05; teste t).

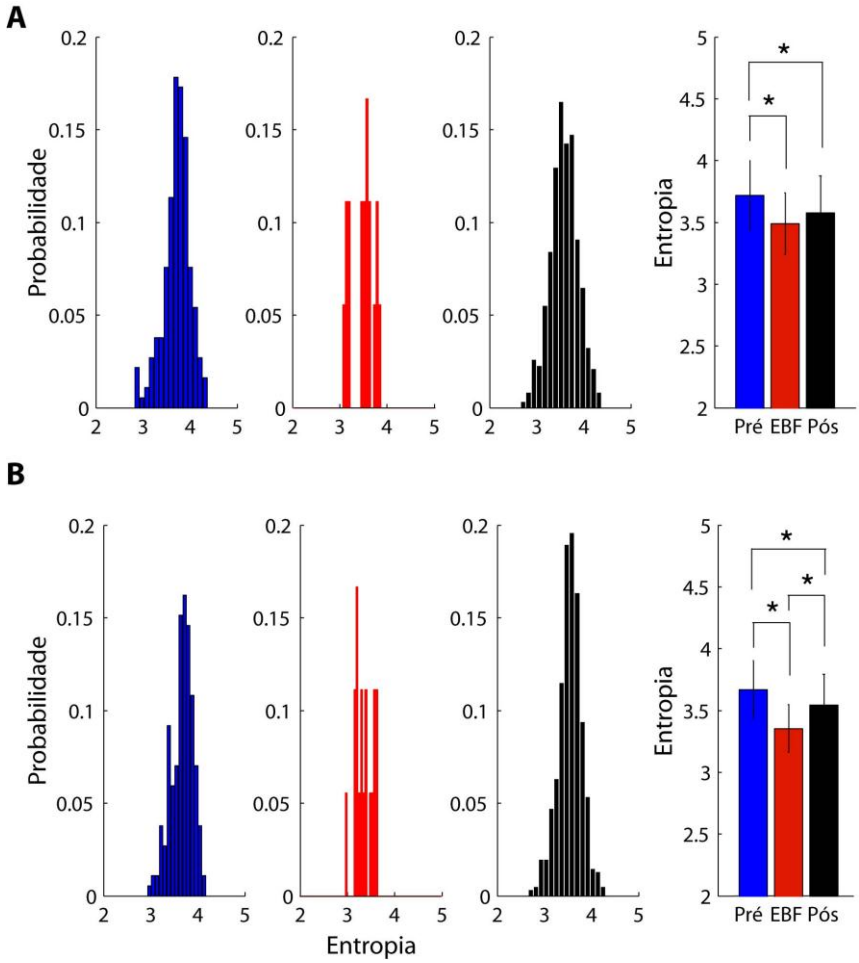

Figura 19 – Distribuição dos valores de entropia antes, durante e depois da aplicação do protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência na via perforante no **(A)** giro denteado e **(B)** CA3. Dados expressos como média ± desvio padrão. Pré (azul, n = 185 eventos); EBF (vermelho, n = 18 eventos); Pós estimulação (preto, n = 618 eventos). *p<0,05; teste t de Student.

Com o objetivo de quantificar a proporção do espectro nas faixas de frequência das OAF (de 380 – 720 Hz), foi mensurado o índice de oscilação de alta frequência (Figura 20). Antes do protocolo, os valores obtidos para a região do GD foram 0,20 ± 0,10 e 0,24 ± 0,07 para a região de CA3. Durante a EBF, ambas as regiões apresentaram redução neste valor: 0,16 ± 0,06 para o GD e 0,18 ± 0,05 para CA3. Após o protocolo, os valores permaneceram menores do que o da situação basal: 0,15 ± 0,07 para o GD e 0,16 ± 0,07 para a região de CA3 (p<0,05; teste t).

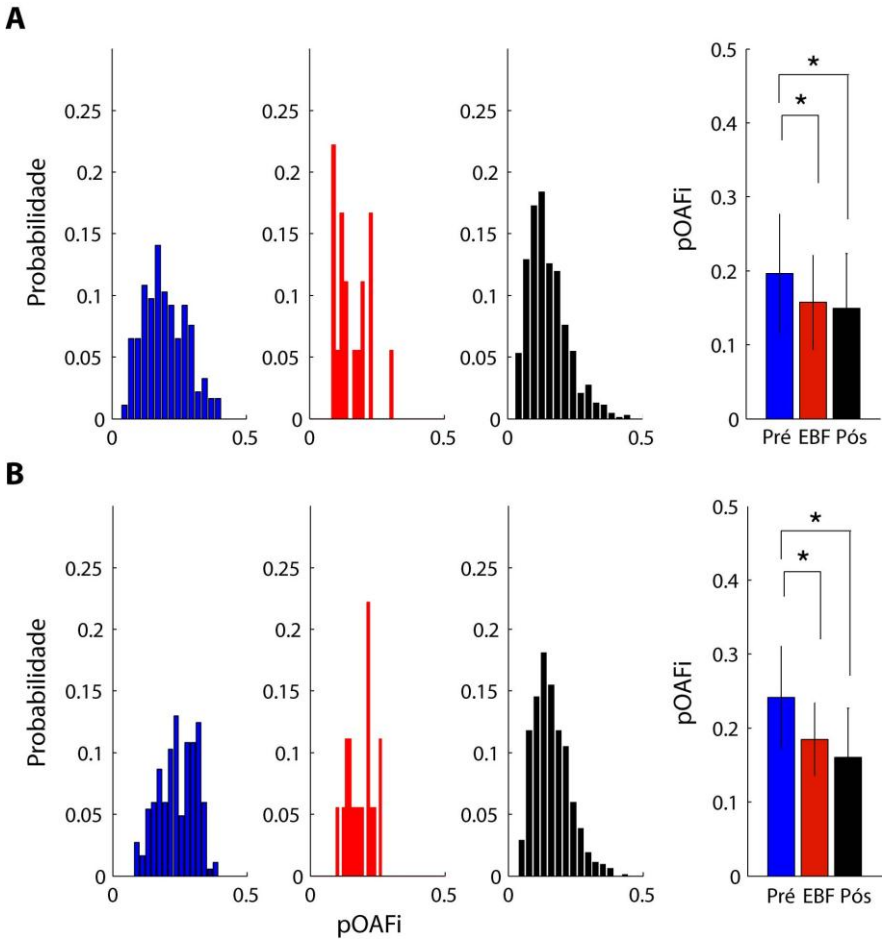

Figura 20 - Distribuição dos valores do índice de oscilação de alta frequência patológica antes, durante e depois da aplicação do protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência na via perforante no **(A)** giro denteado e **(B)** CA3. Dados expressos como média ± desvio padrão. Pré (azul, n = 185 eventos); EBF (vermelho, n = 18 eventos); Pós estimulação (preto, n = 618 eventos). *p<0,05; teste t de Student.

Após isto, a frequência de maior potência no espectro foi mensurada por meio do modo espectral (Figura 21). Antes do protocolo, as duas regiões apresentaram valores altos: 237,5 ± 15,8 Hz para o GD e 248,0 ± 15,3 Hz para a região de CA3. Durante a EBF, este parâmetro comportou-se de maneira diferente entre as duas regiões, apresentou tendência para aumento na região do GD: 240,5 ± 7,6 Hz e tendência para redução na região de CA3: 242,2 ± 8,0 Hz. Após o protocolo, a frequência de maior potência diminuiu, atingindo o valor de 228,7 ± 15,2 Hz para o GD, que também permaneceu inferior ao da situação basal. Para a região de CA3, este valor permaneceu inferior ao da situação pré-estimulação: 239,9 ± 15,8. (p<0,05; teste t).

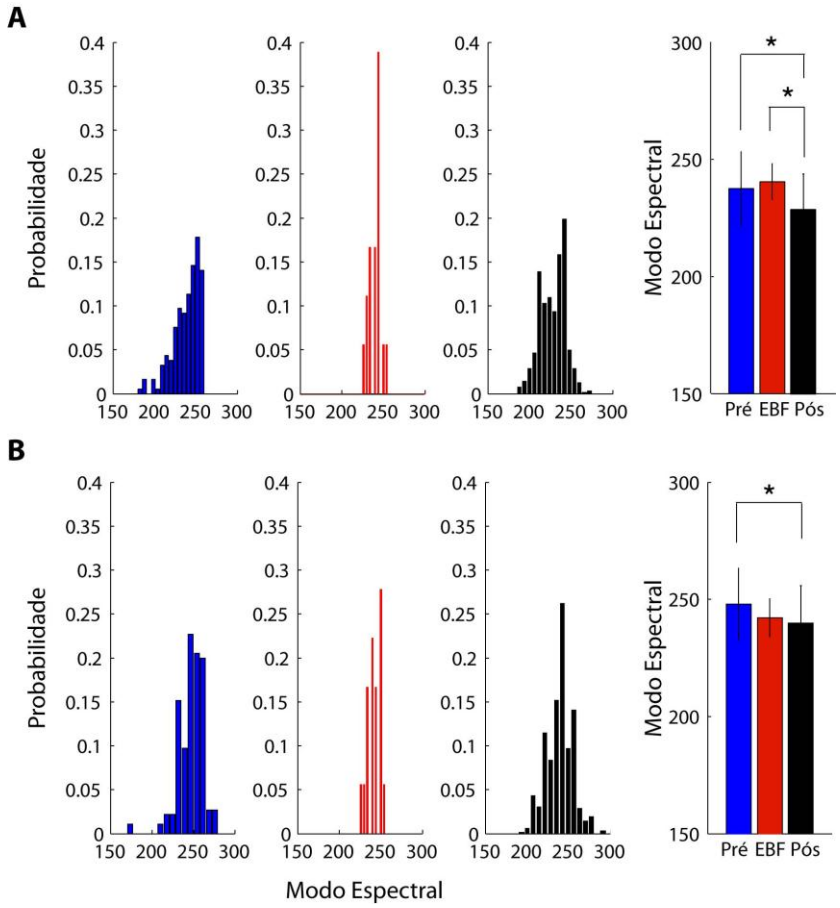

Figura 21 - Distribuição dos valores do modo espectral antes, durante e após a aplicação do protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência na via perforante no **(A)** giro denteado e **(B)** CA3. Dados expressos como média ± desvio padrão. Pré (azul, n = 185 eventos); EBF (vermelho, n = 18 eventos); Pós estimulação (preto, n = 618 eventos). *p<0,05; teste t de Student.

Assim, os resultados obtidos nesta sessão foram bastante promissores. Houve interferência positiva da EBF sobre a organização espectral das oscilações de alta frequência nos canais registrados. Houve redução de todos os parâmetros mensurados quando comparando os períodos "pré" e "pós" estimulação. Diante disso, buscou-se analisar as consequências de tais achados para as crises espontâneas.

4.6. Consequências para as crises espontâneas

A análise eletrofisiológica foi realizada durante 17 dias, totalizando 291,3 horas de registro. Durante este período, foram computadas 325 crises. Destas, 93

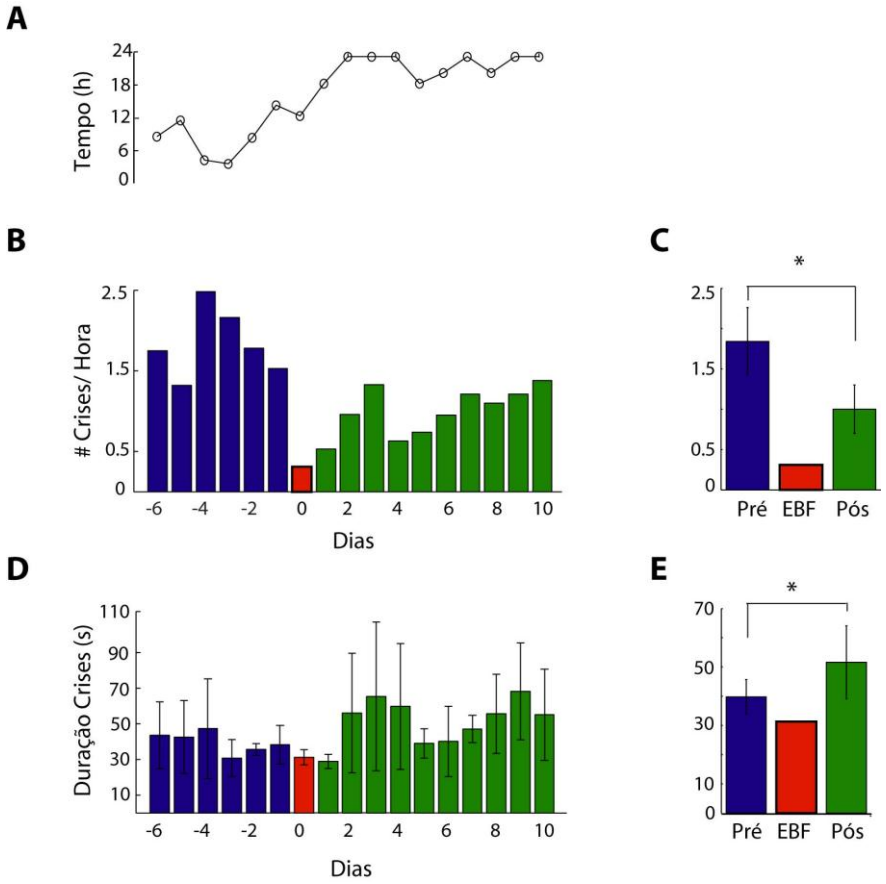

Figura 22 – Frequência das crises espontâneas antes, durante e depois do protocolo de estimulação elétrica de baixa frequência. **(A)** Número de horas de registro eletrofisiológico analisadas por dia. No total, foram analisadas 291,3 horas. Dia 0: dia da estimulação. **(B)** Evolução da frequência e **(D)** duração média de crises ao longo dos dias experimentais. Note que a frequência de crises diminui durante a estimulação elétrica de baixa frequência e que esse efeito persiste após o término da estimulação. **(C)** Curiosamente, a duração média das crises aumenta após o término da estimulação elétrica **(E)**. Dados expressos como média ± desvio padrão. *p<0,05; teste t de Student.

aconteceram antes do protocolo de estimulação, 4 durante a estimulação e 228 crises depois do protocolo. Em decorrência da variabilidade do número de horas analisadas por dia (Figura 22A), a frequência de crise foi normalizada.

O protocolo de EBF empregado foi eficaz em reduzir a frequência de crises. Antes do protocolo, a média de crises por hora era de 1,8 ± 0,4 e depois da estimulação, a frequência de crises reduziu para 1,0 ± 0,3 crises/hora. Importante notar que esse efeito persistiu após o término da estimulação (Figura 22B e C).

Curiosamente, observamos um aumento na duração média das crises espontâneas após o término do protocolo de EBF. A duração média das crises passou de 39,7 ± 6,0 segundos para 51,6 ± 12,5 segundos (Figura 22D e E). Diante do exposto, observamos que a EBF influenciou as crises espontâneas, promovendo redução na frequência de crises por hora e aumento na sua duração média.

5. Discussão

O trabalho apresentado nessa dissertação teve como objetivo interferir com a dinâmica das oscilações hipocampais patológicas em animais cronicamente epilépticos. Para isso utilizamos a estimulação elétrica intracerebral, aplicada a uma baixa frequência durante um longo período, como forma de reduzir a excitabilidade da principal aferência hipocampal. Paralelamente, avaliamos as consequências sobre as crises espontâneas. De maneira resumida, os resultados obtidos foram: (i) o modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pelo ácido caínico mostrou-se mais eficaz do que o da pilocarpina, dada a menor mortalidade; (ii) animais cronicamente epilépticos apresentaram oscilações de alta frequência patológicas no giro denteado e em CA3, sendo que essas oscilações não foram detectadas em animais controle (não epilépticos); (iii) a estimulação elétrica intracerebral de baixa frequência reduziu a excitabilidade hipocampal, além de alterar a dinâmica espectral das oscilações de alta frequência patológicas; e (iv) ambos os eventos foram acompanhados por uma redução na frequência e um aumento na duração das crises espontâneas. Abaixo, discutimos esses resultados com o auxílio da literatura científica da área de epilepsia, plasticidade sináptica, oscilações de alta frequência e neuromodulação.

5.1. Epilepsia do Lobo Temporal: em busca de um bom modelo experimental

A descoberta de que a administração de que alguns agentes convulsivantes produzem uma crise sustentada, e que esta resulta em crises espontâneas e recorrentes depois de alguns dias, mudou completamente nossa compreensão a respeito das epilepsias. O estabelecimento desses modelos é complexo e depende de vários fatores, como a titulação da droga conforme o peso do animal, a duração do SE (sendo atenuado ou não com agonistas GABAérgicos), as condições de saúde do animal e sanitárias do biotério que ele se encontra, bem como dos cuidados tomados pelos pesquisadores durante o estabelecimento do modelo. Nesse trabalho confirmamos achados prévios ao mostrar que a intensa ativação colinérgica, com subsequente participação do sistema glutamatérgico, produz crises comportamentais de características

compatíveis com ativação límbica (Turski e cols., 1986; Cavalheiro e cols., 1991; Mello e cols., 1993). Entretanto, a mortalidade encontrada em nosso trabalho superou significativamente a descrita na literatura. Depois de 40 horas do início do SE, a mortalidade de nossos animais chegou a 80% (Figura 12). Nos primeiros trabalhos com o modelo, Turski e colaboradores reportaram uma mortalidade de 14% (Turski e cols., 1986). Nos muitos estudos subsequentes, os valores variam entre 38% (Bortel e cols., 2010) e 50% (Glien e cols., 2001). A utilização de uma dose de diazepam (5 mg/kg) 90 minutos após o início do SE não foi suficiente para reduzir a mortalidade em nosso estudo (Bortel e cols., 2010). Outro fator importante para a sobrevivência dos animais é a atenuação da ativação autonômica, em especial a parassimpática, após a administração de pilocarpina. O uso prévio de metil - escopolamina não foi suficiente para evitar a alta mortalidade no nosso estudo. Por isso, resolvemos utilizar uma variação do modelo, na qual a dose de pilocarpina é significativamente reduzida pela administração prévia de cloreto de lítio.

O cloreto de lítio exerce ação modulatória sobre a atividade colinérgica, e quando associado com a pilocarpina em baixas doses, induz a convulsões que evoluem para o SE (Honchar e cols., 1983; Druga e cols., 2003; Gao e cols., 2007; Ekstrand e cols., 2011). Quando a associação com lítio foi proposta, acreditava-se que a mortalidade seria menor, sem entretanto, interferir com a porcentagem de animas que evoluíriam para o SE (Clifford e cols., 1987; Rigoulot e cols., 2003). Isso não foi observado em nossos experimentos. Nossa mortalidade com lítio e pilocarpina foi de 100%, conforme mostrado por outros (Glien e cols., 2001). Nesse trabalho a mortalidade foi de 100% para animais com SE com mais de 4 horas de duração. Para aqueles experimentando SE de até 90 minutos, a mortalidade foi de 45%. Esses achados sugerem que a mortalidade no modelo da pilocarpina sistêmica é dependente da duração do SE.

Quando administrada por via intra-hipocampal, a pilocarpina mostrou-se de fato com alta eficiência na indução do SE e com baixa mortalidade. A latência para a primeira crise comportamental e para o desenvolvimento do SE nesses animais foi menor, consistente com os dados da literatura (Tabela 2) (Furtado e cols., 2002; Furtado e cols., 2011). Entretanto, a realização de uma segunda

cirurgia esterotáxica para posicionamento da matriz de eletrodos prejudicou a qualidade do sinal obtido. Dos 3 animais que sobreviveram ao SE e que receberam o implante da matriz de eletrodos, um teve de ser sacrificado 11 dias após o insulto devido a uma infecção generalizada. Os outros dois animais apresentaram baixa qualidade no sinal eletrofisiológico obtido e tiveram que ser retirados do experimento. Assim, concluimos que diminuir a ativação colinérgica periférica é fundamental na redução da mortalidade. Apesar da administração intra-hipocampal permitir o controle de qual estrutura será estimulada, contribuindo para maior especificidade na gênese do foco epiléptico, o implante crônico de uma cânula dificulta o implante subsequente de uma matriz de eletrodos. Uma saída, apesar de maior complexidade, seria realizar uma única cirurgia esterotáxica, para implante concomitante da cânula e da matriz de eletrodos. Tal abordagem será tratada em experimentos futuros.

Como forma de contornar os problemas descritos acima, buscamos outro modelo experimental de epilepsia do lobo temporal. O modelo do ácido caínico é bastante popular entre os pesquisadores das epilepsias (Lothman & Collins, 1981; Sloviter, 1992; Hellier & Dudek, 1999; Queiroz e cols., 2009). Apesar do grande custo do ácido caínico, essa toxina mostrou-se bastante eficaz em induzir o SE e apresentou-se com baixa mortalidade (0%). Além disso, esses animais apresentaram crises espontâneas por até 8 meses pós-SE. Essas crises (Figura 13C) são compatíveis com as descritas na literatura, e caracterizam-se por um aumento gradativo da amplitude e da sincronia das ondas agudas interictais, seguida por oscilações rápidas e finalmente por uma depressão (alastrante?) de longa duração associada a disparos em salvas.

5.2. Gerador das ondas agudas interictais (ISW-OAF) e a sua relação com as oscilações de alta frequência

Oscilações de alta frequência foram primeiramente descritas por Bragin e colaboradores no final do século passado (Bragin e cols., 1999b). O registro dessa “nova” atividade epileptiforme foi feito em animais tratados com ácido caínico. Após essa primeira descrição, outros artigos se seguiram, confirmando a existência de oscilações de alta frequência patológicas no hipocampo de animais

submetidos ao SE (Bragin e cols., 2003; Bragin e cols., 2004; Bragin e cols., 2007). Nesse trabalho, descrevemos oscilações de alta frequência patológicas tipicamente associadas a ondas agudas interictais (ISW-OAF; Figura 14). Conforme mencionado anteriormente, esse tipo de oscilação não foi observado em animais não submetidos ao SE (Figura 13).

Interpretamos que uma possível origem das ondas agudas interictais da região do GD e de CA3 seja a somatória de despolarizações dos neurônios granulares ou pirâmidais após a ativação síncrona da via perforante. Análise de correlação sugere que essa despolarização acontece primeiro no GD, refletindo uma maior proximidade anatômica com o CTXent ou alterações na atividade pré-sináptica na epilesia (Figura 15A). Disparos neuronais que seguem essa despolarização contribuem para as oscilações de alta frequência registradas, que ocorrem com latências próximas a zero entre ambas as estruturas (Figura 15B).

Importante notar que escolhemos estudar pOAF associadas à ondas agudas interictais, e não todas as OAF, como forma de reduzir nossas análises a um evento específico, estereotipado e bem definido. A co-ocorrência de ondas agudas interictais e pOAF já foi descrita em trabalhos experimentais (Jiruska e cols., 2010b; Jiruska e cols., 2010a) e clínicos (Worrell e cols., 2008), sendo a prevalência superior a 90%. Isso significa que outros tipos de OAF podem ser registrados (Bragin e cols., 2002b; Bragin e cols., 2007), entretanto, a sua ocorrência e significado eletrofisiológico não foram avaliados no presente trabalho.

5.3. Mecanimos celulares da gênese das oscilações de alta frequência patológicas

As pOAF tem sido identificadas no hipocampo de animais cronicamente epilépticos e de pacientes com epilepsia há aproximadamente 12 anos. Entretanto, a sua base celular permanece controversa. Segundo Bragin e colaboradores, estas oscilações são decorrentes do disparo hipersíncrono de população de neurônios patologicamente interconectados que disparam a altas frequências (Bragin e cols., 1999b). No espectrograma, tais oscilações

apresentam apenas um pico de frequência e são classificadas como pOAF puras (Ibarz e cols., 2010). Os dados do presente trabalho (Figura16) mostram que as pOAF, nas duas estruturas registradas, apresentam-se com dois picos de frequência no espectrograma, o que sugere um mecanismo de gênese diferente do proposto anteriormente. Foffani e colaboradores, utilizando um modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por cloreto de lítio e pilocarpina, em uma preparação *in vitro* (baixas concentrações de Mg^{2+}, de Ca^{2+} e altas concentrações de K^{+}), mostraram que na situação epiléptica, os neurônios disparam em frequências fisiológicas, mas de forma desorganizada. Ou seja, os neurônios disparam fora de fase e as frequências registradas apresentam-se mais altas do que as oscilações fisiológicas. Tal desorganização favorece o aparecimento de pOAF emergentes, o que resulta em diferentes picos no espectrograma (Foffani e cols., 2007). Fatores como a perda neuronal, redução das interações efáticas, aumento da flutuação do potencial de membrana ou alterações em canais iônicos são citados como determinantes nas modificações observadas (Foffani e cols., 2007; Ibarz e cols., 2010). É importante ressaltar que um mecanismo não exclui o outro. Utilizando simulações computacionais, Ibarz e colaboradores sugerem que as pOAF são resutado de ambos os fenômenos descritos acima (Ibarz e cols., 2010).

Independente do mecanismo gerador das pOAF, existem fortes evidências que as consideram marcadores da zona epileptogêncica. Modelos experimentais sugerem que a presença de pOAF é correlacionada positivamente com a probabilidade e severidade das crises epilépticas (Bragin e cols., 2003, 2007; Levesque e cols., 2011). No modelo da epilepsia induzido pelo ácido caínico, as pOAF podem ser detectadas no GD dias antes das crises espontâneas e recorrentes acontecerem (Bragin e cols., 2004). Importante ressaltar que esta região não apresenta oscilações de alta frequência em situações fisiológicas(Bragin e cols., 1995).

5.4. Reduzindo a excitabilidade do giro denteado e da região de CA3

Desde a descoberta da potenciação de longa duração por Bliss e Lomo (Bliss & Lomo, 1973), o número de protocolos de estimulação elétrica

empregados no estudo da plasticidade celular cresceu significativamente (Ito, 1989; Malenka, 1994; Errington e cols., 1995; Abraham e cols., 1996; Bear & Abraham, 1996; Mockett e cols., 2002). Além disso, outras regiões e vias neurais começaram a ser estudadas. Esses estudos mostraram que a plasticidade é específica para cada região e via neural. Por exemplo, uma diminuição aguda e persistente do potencial evocado no córtex pré-frontal pode ser induzida por estímulos de baixa freqüência (1 Hz) aplicados em CA1 (Abraham & Bear, 1996; Abraham e cols., 1996; Bear & Abraham, 1996; Aguiar e cols., 2012) e no GD (Trommer e cols., 1996; Manahan-Vaughan, 1998; Poschel e cols., 2005). Fenômeno comumente conhecido por depressão de longa duração. Entretanto, alguns trabalhos (Errington e cols., 1995; Abraham e cols., 1996; Fung e cols., 2011) demonstram que a estimulação elétrica de baixa frequência aplicada à via perforante não provoca depressão de longa duração no GD. Essa diferença adiciona mais um grau de complexidade (i.e., as especificidades de cada via neural) a formulação de uma regra ou propriedade geral a respeito dos mecanismos de plasticidade sináptica.

De nosso conhecimento, o protocolo utilizado no presente trabalho é o mais longo já relatado no estudo da plasticidade sináptica do GD (8640 pulsos a 0,2 Hz, durante 12 horas). Comparando as respostas iniciais (0 – 1 h) e finais (11 – 12 h), observamos uma redução de 45 % na amplitude do PS (Figura 17). Este parâmetro reflete a sincronia neuronal e a sua diminuição sugere que protocolos longos, de baixa frequência, podem ser mais eficazes na plasticidade do GD, em comparação com protocolos breves (~15 min), com frequências entre 1 – 15 Hz utilizados com sucesso em CA1 e no córtex pré-frontal.

Após o término da EBF não voltamos a estimular a via perforante para evitar possíveis interferências entre os potenciais evocados e a dinâmica das pOAF. Entretanto, acreditamos ser importante monitorar a excitabilidade neuronal nos dias subsequentes como forma de estudar a correlação entre a excitabilidade neural, a dinâmica das pOAF e as crises espontâneas o que será perseguido em próximos experimentos.

5.5. Modulação das oscilações de alta frequência patológicas e as consequência para a gênese de crises

Através do protocolo de estimulação de baixa frequência (0,2 Hz) por 12 horas foi possível modular as pOAF no GD e na região de CA3. A Figura 23 exibe a influência da estimulação elétrica sobre a potência das oscilações. Observa-se que antes da estimulação existia um pico a 232 Hz para o GD e dois picos para a região de CA3: 247 Hz e 500 Hz. Fatores estes que contribuem para o alto valor da entropia no sistema (Figura 19). Após a estimulação, observa-se que o efeito foi mais marcante para a região de CA3: o pico da frequência em 500 Hz desaparece. Para a região do GD, houve aumento da potência das oscilações menores de 200 Hz e o pico antes a 232 Hz, reduziu para 222 Hz. Embora os mecanismos pelos quais a estimulação elétrica intracerebral modula as pOAF sejam desconhecidos, os dados do presentes neste trabalho indicam que houve reorganização da rede neuronal a nível da dinâmica espectral.

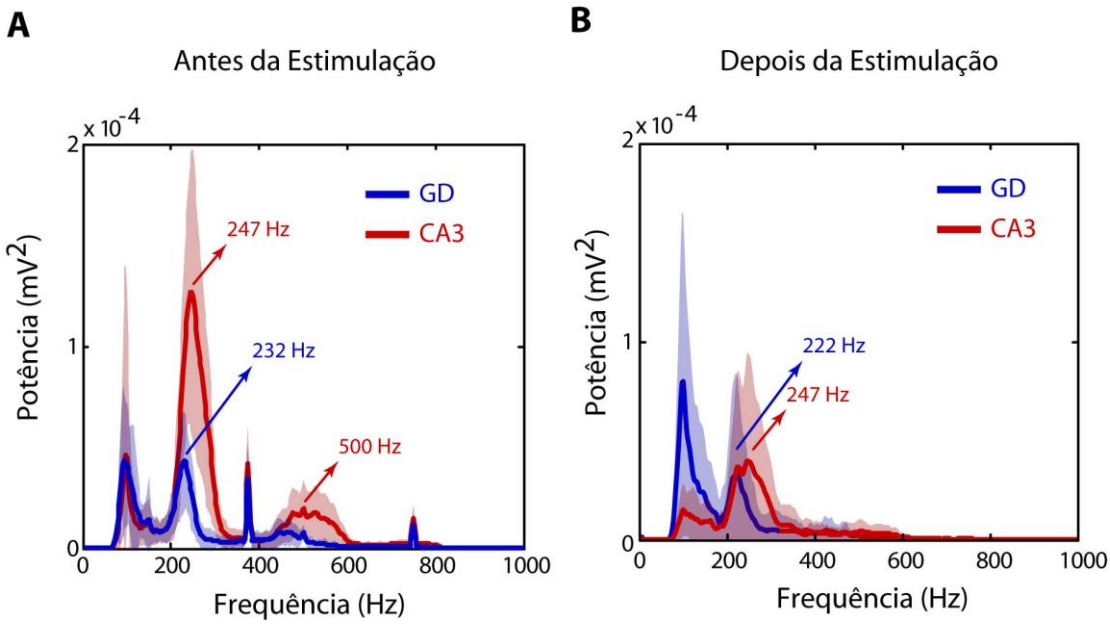

Figura 23 – Espetros de potência das oscilações de alta frequência no giro denteado e CA3 antes **(A)** e depois **(B)** da estimulação elétrica de baixa frequência. Em CA3 (vermelho), onde o efeito foi mais marcante, o espectro de potência antes do protocolo de estimulação apresenta dois picos: um em 247 Hz e 500 Hz. Essas oscilações são significativamente atenuadas após o protocolo de estimulação. Note que o pico da frequência em 247 Hz permanece o mesmo, enquanto que o de 500 Hz desaparece.

Uma vez que o nosso protocolo modulou a dinâmica espectral das pOAF e reduziu a excitabilidade neuronal, avaliamos a consequência de tais achados para as crises espontâneas e encontramos redução na frequência de crises por hora. Como previamente exposto, em um modelo experimental de epilepsia com ácido caínico, Bragin e colaboradores encontraram correlação positiva entre a redução do PS e o aumento do limiar para a ocorrência das crises espontâneas (Bragin e cols., 2005). Dados que corroboram com os obtidos neste trabalho (Figura 17 e Figura 22B). Em outro estudo, Bragin e colaboradores estimularam a via a perforante de animais cronicamente epilépticos 1 vez por dia durante 15 dias. Com o mesmo protocolo utilizado para induzir o abrasamento (estimulação a 5 Hz , pulsos quadrados, duração de 0,2 ms e intensidade entre 50 - 200μA), os autores encontraram aumento do limiar para a indução da pós-descarga e diminuição da frequência das crises espontâneas. Os autores sugerem que a estimulação diária pode induzir mecanismos de plasticidade sináptica que mantém o estado interictal por um tempo mais prolongado (Bragin e cols., 2002a).

Na prática clínica, independente da estrutura estimulada e dos parâmetros da estimulação, há redução de aproximadamente 50% na frequência das crises após o protocolo de estimulação elétrica intracerebral (Hodaie e cols., 2002; Vonck e cols., 2002; Boon e cols., 2007; Vesper e cols., 2007; Anderson e cols., 2008; McLachlan e cols., 2010). Entretanto, além de não se conhecer os mecanismos de ação da estimulação, muitos desses trabalhos foram feitos de modo não controlado e/ou pouco documentados e as suas conclusões não sobrevivem a um estudo controlado.

Além do mecanismo de redução da excitabilidade, outro potencial mecanismo é proposto para reorganizar a rede neuronal epiléptica após a estimulação elétrica de baixa frequência. A condição epiléptica pode acontecer em decorrência de canalopatias (Lee e cols., 2009). Esses autores encontraram que os canais retificadores de K^+ encontram-se diminuídos na condição epiléptica e conforme sugerem Foffani e colaboradores, a diminuição da expressão desses canais promove desorganização no padrão fisiológico de disparo neuronal e as pOAF emergentes surgem (Foffani e cols., 2007). Baseado

nestes aspectos, os canais retificadores de K^+, principalmente as subunidades Kv3 exibem uma importante função na manutenção das propriedades de disparo rápido dos interneurônios (Storm, 1993). Desta forma, se a estimulação elétrica de baixa frequência for capaz de aumentar a expressão desses canais, pode haver uma reorganização no padrão de disparo neuronal com redução das pOAF e consequentemente, uma diminuição na frequência das crises espontâneas. Tal hipótese será tratada em experimentos futuros.

Interessantemente, a duração das crises aumentou (Figura 22D). Acredita-se que as crises epilépticas podem cessar mediante fatores como diminuição da quantidade de neurotransmissores excitatórios na fenda sináptica, aumento dos neurotransmissores inibitórios, pelo bloqueio da despolarização, dessensibilização dos receptores ou por alterações no pH do meio (Lado & Moshe, 2008). A depender da dinâmica da crise, às vezes um desses mecanismos é o suficiente para cessá-la. Uma vez que a estimulação foi hábil em aumentar o limiar para a ocorrência das crises, parece ter havido um mecanismo compensatório em relação ao seu término, onde mais eventos de defesa necessitaram ser ativados para interrompê-las.

Embora este trabalho tenha encontrado resultados positivos sob o protocolo de estimulação de baixa frequência, os mecanismos sugeridos acima são hipotéticos. Os dados mostram que o modo de ação da estimulação elétrica intracerebral *in vivo* é complexo e os efeitos vão além da simples ativação e inativação das estruturas alvo. Entretanto, estes resultados são animadores e experimentos futuros fornecerão informações a respeito dos mecanismos responsáveis pela modulação crises pela estimulação elétrica.

6. Conclusões

O presente trabalho mostra que estímulos elétricos aplicados a baixas frequências são capazes de reduzir a excitabilidade do GD. Essa redução de excitabilidade foi acompanhada de uma redução das oscilações de alta frequência patológicas, bem como da frequência de crises espontâneas. Apesar das limitaçãos que a baixa amostra coletada neste trabalho impõe às conclusões gerais, acreditamos que os resultados obtidos servem como "prova de princípio" de que a estimulação elétrica intracerebral pode ser utilizada no tratamento das epilepsias. Ainda, a preparação experimental desenvolvida nesse trabalho possibilitará a investigação dos mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos anti-ictogênicos da estimulação elétrica, como possivelmente a modulação de canais iônicos. Se confirmados, os benefícios terapêuticos decorrentes do uso da estimulação elétrica intracerebral serão significativos para os pacientes com epilepsias do lobo temporal de difícil controle. O maior proveito dessa tecnologia não se dará apenas pela redução dos custos e riscos associados à cirurgia de ressecção do foco epiléptico, mas principalmente, na recuperação da qualidade de vida de um indivíduo com epilepsia. Esse é objetivo último dos pesquisadores de ciência básica interessados em desenvolver novas terapias e tratamentos para essa síndrome neurológica.

7. Referências

Abraham WC & Bear MF (1996) Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. Trends in neurosciences 19:126-130.

Abraham WC, Mason-Parker SE & Logan B (1996) Low-frequency stimulation does not readily cause long term depression or depotentiation in the dentate gyrus of awake rats. Brain Research 722:217-221.

Aguiar CL, Bueno-Júnior LS, Ruggiero RN, Romcy-Pereira RN & Leite JP (2012) NMDA receptor blockade impairs the muscarinic conversion of sub-threshold transient depression into long-lasting LTD in the hippocampus e prefrontal cortex pathway in vivo: Correlation with gamma oscillations. Neuropharmacology:1-13.

Anderson WS, Kossoff EH, Bergey GK & Jallo GI (2008) Implantation of a responsive neurostimulator device in patients with refractory epilepsy. Neurosurgery Focus 25.

Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G & Tancredi V (2002) Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. Progress in Neurobiology 68:167-207.

Barany EH (1962) The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate (Cercopithecus ethiops). Investigative ophthalmology 1:712-727.

Bear MF & Abraham WC (1996) Long-Term Depression in Hippocampus. Annual Reviews Neuroscience 19:437-462.

Begley CE, Famulari M, Annegers JF, Lairson DR, Reynolds TF, Coan S, Dubinsky S, Newmark ME, Leibson C, So EL & Rocca WA (2000) The cost of epilepsy in the United States: an estimate from population-based clinical and survey data. Epilepsia 41:342-351.

Ben-Ari Y (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. Neuroscience 14:375-403.

Ben-Ari Y & Cossart R (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. Trends in neurosciences 23:580-587.

Ben-Ari Y, Tremblay E, Berger M & Nitecka L (1984) Kainic acid seizure syndrome and binding sites in developing rats. Brain research 316:284-288.

Benabid AL, Minotti L, Koudsie A, de Saint Martin A & Hirsch E (2002) Antiepileptic effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus (corpus luysi) in a case of medically intractable epilepsy caused by focal dysplasia: a 30-month follow-up: technical case report. Neurosurgery 50:1385-1391; discussion 1391-1382.

Berenyi A, Belluscio M, Mao D & Buzsaki G (2012) Closed-loop control of epilepsy by transcranial electrical stimulation. Science 337:735-737.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P & Scheffer IE (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia 51:676-685.

Bliss TV & Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. Physiological 232:331 -356.

Boon P, Vonck K, De Herdt V, Goethals M, Goossens L, Van Zandijcke M, De Smedt T, Dewaele F, Caemaert J & Van Roost D (2007) Deep brain stimulation in patients with refractory temporal lobe epilepsy. Epilepsia 48:1551-1560.

Bortel A, Levesque M, Biagini G, Gotman J & Avoli M (2010) Convulsive status epilepticus duration as determinant for epileptogenesis and interictal discharge generation in the rat limbic system. Neurobiology of disease 40:478-489.

Bragin A, Wilson CL & Engel J, Jr. (2002a) Increased afterdischarge threshold during kindling in epileptic rats. Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale 144:30-37.

Bragin A, Wilson CL & Engel J (2003) Spatial stability over time of brain areas generating fast ripples in the epileptic rat. Epilepsia 44:1233-1237.

Bragin A, Wilson CL & Engel J, Jr. (2007) Voltage depth profiles of high-frequency oscillations after kainic acid-induced status epilepticus. Epilepsia 48 Suppl 5:35-40.

Bragin A, Engel JJ & Staba RJ (2010) High-frequency oscillations in epileptic brain. Current opinion in neurology and neurosurgery 23:151-156.

Bragin A, Mody I, Wilson CL & Engel J, Jr. (2002b) Local generation of fast ripples in epileptic brain. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22:2012-2021.

Bragin A, Benassi SK, Kheiri F & Engel J, Jr. (2011) Further evidence that pathologic high-frequency oscillations are bursts of population spikes derived from recordings of identified cells in dentate gyrus. Epilepsia 52:45-52.

Bragin A, Engel J, Jr., Wilson CL, Fried I & Buzsaki G (1999a) High-frequency oscillations in human brain. Hippocampus 9:137-142.

Bragin A, Engel J, Jr., Wilson CL, Fried I & Mathern GW (1999b) Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100--500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid--treated rats with chronic seizures. Epilepsia 40:127-137.

Bragin A, Wilson CL, Almajano J, Mody I & Engel J, Jr. (2004) High-frequency oscillations after status epilepticus: epileptogenesis and seizure genesis. Epilepsia 45:1017-1023.

Bragin A, Azizyan A, Almajano J, Wilson CL & Engel JJ (2005) Analysis of Chronic Seizure Onsets after Intrahippocampal Kainic Acid Injection in Freely Moving Rats. Epilepsia 46:1592–1598.

Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K & Buzsaki G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. J Neurosci 15:47-60.

Browne TR & Holmes GL (2001) Epilepsy. The New England journal of medicine 344:1145-1151.

Buckmaster PS & Dudek FE (1997) Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. J Comp Neurol 385:385-404.

Buzsaki G & Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. Science 304:1926-1929.

Buzsaki G & Silva FHL (2012) High frequency oscillations in the intact brain. Progress in Neurobiology.
Buzsáki G (2006) Rhythms of the Brain, 1 edition Edition. USA: Oxford University Press
Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C & Turski L (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. Epilepsia 32:778-782.
Chatillon CE, Zelmann R, Bortel A, Avoli M & Gotman J (2011) Contact size does not affect high frequency oscillation detection in intracerebral EEG recordings in a rat epilepsy model. Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology 122:1701-1705.
Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC & Zorumski CF (1987) The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. Neuroscience 23:953-968.
Cooper IS, Amin I & Gilman S (1973) The effect of chronic cerebellar stimulation upon epilepsy in man. Transactions of the American Neurological Association 98:192-196.
Cooper IS, Upton AR & Amin I (1982) Chronic cerebellar stimulation (CCS) and deep brain stimulation (DBS) in involuntary movement disorders. Applied neurophysiology 45:209-217.
Cota VR, Medeiros DC, Vilela MRSP, Doretto MC & Moraes MFD (2009) Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. Epilepsy & behavior : E&B 14:26-31.
Dantas FG, Yacubian EM, Jorge CL, Pedreira CC, Bueno JF & Valerio RM (1998) Clinical and EEG analysis of mesial and lateral temporal lobe seizures. Arq Neuropsiquiatr 56:341-349.
Druga R, Mares P & Kubova H (2010) Time course of neuronal damage in the hippocampus following lithium-pilocarpine status epilepticus in 12-day-old rats. Brain research 1355:174-179.
Druga R, Kubova H, Suchomelova L & Haugvicova R (2003) Lithium/pilocarpine status epilepticus-induced neuropathology of piriform cortex and adjoining structures in rats is age-dependent. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca 52:251-264.
Dudek SM & Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89:4363-4367.
Ekstrand JJ, Pouliot W, Scheerlinck P & Dudek FE (2011) Lithium pilocarpine-induced status epilepticus in postnatal day 20 rats results in greater neuronal injury in ventral versus dorsal hippocampus. Neuroscience 192:699-707.
Engel J, Jr. (1993) Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. Current opinion in neurology and neurosurgery 6:240-249.
Engel J, Jr. (2001) Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry 7:340-352.

Errington ML, Bliss TV, Richter-Levin G, Yenk K, Doyere V & Laroche S (1995) Stimulation at 1-5 Hz does not produce long-term depression or depotentiation in the hippocampus of the adult rat in vivo. Journal of neurophysiology 74:1793-1799.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P & Engel J, Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia 46:470-472.

Fodstad H & Hariz M (2007) Electricity in the treatment of nervous system disease. Acta neurochirurgica Supplement 97:11-19.

Foffani G, Uzcategui YG, Gal B & Menendez de la Prida L (2007) Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. Neuron 55:930-941.

Freitas RM, Oliveira AA, Sousa FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB & Fontelesa MMF (2007) Pathophysiology of Status Epilepticus Induced by Pilocarpine. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry 7:11-15.

French ED, Aldinio C & Schwarcz R (1982) Intrahippocampal kainic acid, seizures and local neuronal degeneration: relationships assessed in unanesthetized rats. Neuroscience 7:2525-2536.

Friedman LK, Pellegrini-Giampietro DE, Sperber EF, Bennett MV, Moshe SL & Zukin RS (1994) Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 14:2697-2707.

Fung TK, Peloquin P, Wu K & Leung LS (2011) Differential Long-Term Depression in CA3 but not in Dentate Gyrus following Low-Frequency Stimulation of the Perforant Path. Synapse 65:677-686.

Furtado MA, Braga GK, Oliveira JAC, Vecchio FD & Garcia-Cairasco N (2002) Behavioral, Morphologic, and Electroencephalographic Evaluation of Seizures Induced by Intrahippocampal Microinjection of Pilocarpine. Epilepsia 43:37-39.

Furtado MA, Castro OW, Del Vecchio F, de Oliveira JA & Garcia-Cairasco N (2011) Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. Epilepsy & behavior : E&B 20:257-266.

Gao XG, Liu Y & Liu XZ (2007) Treatment of late lithium-pilocarpine-induced status epilepticus with diazepam. Epilepsy research 74:126-130.

Garcia-Cairasco N, Rossetti F, Oliveira JA & Furtado Mde A (2004) Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). Epilepsy & behavior : E&B 5:455-463.

Glien M, Brandt C, Potschka H, Voigt H, Ebert U & Loscher W (2001) Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. Epilepsy research 46:111-119.

Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E & Silva FHL (2001) Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and

somatostatin-immunoreactive neurons. European Journal of Neuroscience 13:657-669.
Hamani C, Andrade D, Hodaie M, Wennberg RA & Lozano A (2009) Deep Brain Stimulation for the treatment of Epilepsy. International Journal of Neural Systems 19:213-226.
Hamani C, Hodaie M, Chiang J, del Campo M, Andrade DM, Sherman D, Mirski M, Mello LE & Lozano AM (2008) Deep brain stimulation of the anterior nucleus of the thalamus: effects of electrical stimulation on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. Epilepsy research 78:117-123.
Hara K & Harris RA (2002) The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. Anesthesia and analgesia 94:313-318.
Hellier JL & Dudek FE (1999) Spontaneous motor seizures of rats with kainate-induced epilepsy: effect of time of day and activity state. Epilepsy research 35:47-57.
Hodaie M, Wennberg RA, Dostrovsky JO & Lozano AM (2002) Chronic anterior thalamus stimulation for intractable epilepsy. Epilepsia 43:603-608.
Honchar MP, Olney JW & Sherman WR (1983) Systemic Cholinergic Agents Induce Seizures and Brain Damage in Lithium-Treated Rats.323-325.
Ibarz JM, Foffani G, Cid E, Inostroza M & Menendez de la Prida L (2010) Emergent dynamics of fast ripples in the epileptic hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30:16249-16261.
Ito M (1989) Long-term depression. Annu Rev Neurosci 12:85-102.
Jacobs J, LeVan P, Chander R, Hall J, Dubeau F & Gotman J (2008) Interictal high-frequency oscillations (80–500 Hz) are an indicator of seizure onset areas independent of spikes in the human epileptic brain. Epilepsia 49:1893-1907.
Jefferys GJR, de la Prida LM, Wendling F, Bragin A, Avoli M, Timofeev I & Silva FHL (2012) Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation. Progress in Neurobiology.
Jensen AL & Durand DM (2007) Suppression of axonal conduction by sinusoidal stimulation in rat hippocampus in vitro. Journal of neural engineering 4:1-16.
Jirsch JD, Urrestarazu E, LeVan P, Olivier A, Dubeau F & Gotman J (2006) High-frequency oscillations during human focal seizures. Brain 129:1593-1608.
Jiruska P, Powell AD, Chang WC & Jefferys JG (2010a) Electrographic high-frequency activity and epilepsy. Epilepsy research 89:60-65.
Jiruska P, Finnerty GT, Powell AD, Lofti N, Cmejla R & Jefferys JG (2010b) Epileptic high-frequency network activity in a model of non-lesional temporal lobe epilepsy. Brain : a journal of neurology 133:1380-1390.
Kern DS & Kumar R (2007) Deep Brain Stimulation. The Neurologist 13:237-252.
Kringelbach ML, Jenkinson N, Owen SLF & Aziz TZ (2007) Translational principles of deep brain stimulation. Nature Neuroscience:623-635.
Lado FA & Moshe SL (2008) How do seizures stop? Epilepsia 49:1651-1664.
Lason W, Turchan J, Przewlocki R, Machelska H, Labuz D & Przewlocka B (1997) Effects of pilocarpine and kainate-induced seizures on N-methyl-D-aspartate receptor gene expression in the rat hippocampus. Neuroscience 78:997-1004.

Lee SM, Kim JE, Sohn JH, Choi HC, Lee JS, Kim SH, Kim MJ, Choi IG & Kang TC (2009) Down-regulation of delayed rectifier K+ channels in the hippocampus of seizure sensitive gerbils. Brain research bulletin 80:433-442.

Levesque M, Bortel A, Gotman J & Avoli M (2011) High-frequency (80-500 Hz) oscillations and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. Neurobiology of disease 42:231-241.

Loscher W (2002) Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. Trends Pharmacol Sci 23:113-118.

Lothman EW & Collins RC (1981) Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. Brain research 218:299-318.

Luttjohann A, Fabene PF & van Luijtelaar G (2009) A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. Physiology & behavior 98:579-586.

Malenka RC (1994) Synaptic plasticity. Mucking up movements. Nature 372:218-219.

Malenka RC & Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron 44:5-21.

Manahan-Vaughan D (1998) Priming of group 2 metabotropic glutamate receptors facilitates induction of long-term depression in the dentate gyrus of freely moving rats. Neuropharmacology 37:1459-1464.

Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Quinn B, Peacock WJ & Babb TL (1994) Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. Brain Res Dev Brain Res 78:70-80.

Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM & Kuhlman PA (1996) The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. Epilepsy research 26:151-161.

McCormick DA & Contreras D (2001) On the cellular and network bases of epileptic seizures. Annual review of physiology 63:815-846.

McLachlan RS, Pigott S, Tellez-Zenteno JF, Wiebe S & Parrent A (2010) Bilateral hippocampal stimulation for intractable temporal lobe epilepsy: impact on seizures and memory. Epilepsia 51:304-307.

McNamara JO (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 14:3413-3425.

Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL & Finch DM (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. Epilepsia 34:985-995.

MicIntyre CC, Grill WM, Sherman DL & Thakor NV (2004) Cellular effects of deep brain stimulation: Model-Based analysys. Journal of Neurophysiology 91:1457-1469.

Mockett B, Coussens C & Abraham WC (2002) NMDA receptor-mediated metaplasticity during the induction of long-term depression by low-frequency stimulation. The European journal of neuroscience 15:1819-1826.

Nair DR, Burgess R, McIntyre CC & Luders H (2008) Chronic subdural electrodes in the management of epilepsy. Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology 119:11-28.

O'Brien TJ, Kilpatrick C, Murrie V, Vogrin S, Morris K & Cook MJ (1996) Temporal lobe epilepsy caused by mesial temporal sclerosis and temporal neocortical lesions. A clinical and electroencephalographic study of 46 pathologically proven cases. Brain 119 (Pt 6):2133-2141.

Ozen LJ & Teskey GC (2009) One hertz stimulation to the corpus callosum quenches seizure development and attenuates motor map expansion. Neuroscience 160:567-575.

Paxinos G & Watson C (1997) The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Elsevier.

Pitkanen A, Kharatishvili I, Karhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, Nairismagi J, Grohn O & Nissinen J (2007) Epileptogenesis in experimental models. Epilepsia 48 Suppl 2:13-20.

Popovici T, Represa A, Crepel V, Barbin G, Beaudoin M & Ben-Ari Y (1990) Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos-like proteins in rat brain. Brain research 536:183-194.

Poschel B, Wroblewska B, Heinemann U & Manahan-Vaughan D (2005) The metabotropic glutamate receptor mGluR3 is critically required for hippocampal long-term depression and modulates long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. Cereb Cortex 15:1414-1423.

Queiroz CM, Gorter JA, Lopes da Silva FH & Wadman WJ (2009) Dynamics of evoked local field potentials in the hippocampus of epileptic rats with spontaneous seizures. Journal of neurophysiology 101:1588-1597.

Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalography and clinical neurophysiology 32:281-294.

Raol YH & Brooks-Kayal AR (2012) Experimental models of seizures and epilepsies. Progress in molecular biology and translational science 105:57-82.

Ratzliff AH, Santhakumar V, Howard A & Soltesz I (2002) Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis? Trends in neurosciences 25:140-144.

Rigoulot MA, Leroy C, Koning E, Ferrandon A & Nehlig A (2003) Prolonged low-dose caffeine exposure protects against hippocampal damage but not against the occurrence of epilepsy in the lithium-pilocarpine model in the rat. Epilepsia 44:529-535.

Riklan M, Kabat C & Cooper IS (1976) Psychological effects of short term cerebellar stimulation in epilepsy. The Journal of nervous and mental disease 162:282-290.

Rolston JD, Desai SA, Laxpati NG & Gross RE (2011) Electrical stimulation for epilepsy: experimental approaches. Neurosurgery clinics of North America 22:425-442, v.

Rolston JD, Laxpati NG, Gutekunst CA, Potter SM & Gross RE (2010) Spontaneous and evoked high-frequency oscillations in the tetanus toxin model of epilepsy. Epilepsia:1-8.

Scharfman HE (2002) Epilepsy as an example of neural plasticity. The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry 8:154-173.

Schulze-Bonhage A, Metternich B, Biethahn S, Zentner J & Wagner K (2009) [Quality of life following extratemporal epilepsy surgery]. Der Nervenarzt 80:445-451.

Schwalb JM & Hamani C (2008) The history and future of deep brain stimulation. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 5:3-13.

Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L & Cavalheiro EA (2009) The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? Anais da Academia Brasileira de Ciencias 81:345-365.

Sharma AV, Wolansky T & Dickson CT (2010) A comparison of sleeplike slow oscillations in the hippocampus under ketamine and urethane anesthesia. Journal of neurophysiology 104:932-939.

Skarpaas TL & Morrell MJ (2009) Intracranial Stimulation Therapy for Epilepsy. Neurotherapeutics 6:238–243.

Sloviter RS (1991) Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. Hippocampus 1:41-66.

Sloviter RS (1992) Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. Neuroscience Letters 137:91-96.

Sloviter RS (2005) The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. C R Biol 328:143-153.

Sloviter RS & Bumanglag AV (2012) Defining “epileptogenesis” and identifying “antiepileptogenic targets” in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. Neuropharmacology 1-13.

Staba RJ, Wilson CL, Bragin A, Jhung D, Fried I & Engel J, Jr. (2004) High-frequency oscillations recorded in human medial temporal lobe during sleep. Annals of neurology 56:108-115.

Storm JF (1993) Functional diversity of K^+ currents in hippocampal pyramidal neurons. Seminars in The Neurosciences 5:79-92.

Stringer JL & Sowell KL (1994) Kainic acid, bicuculline, pentylenetetrazol and pilocarpine elicit maximal dentate activation in the anesthetized rat. Epilepsy research 18:11-21.

Tauck DL & Nadler JV (1985) Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 5:1016-1022.

Trommer BL, Liu YB & Pasternak JF (1996) Long-term depression at the medial perforant path-granule cell synapse in developing rat dentate gyrus. Brain Res Dev Brain Res 96:97-108.

Turski L, Cavalheiro EA, Sieklucka-Dziuba M, Ikonomidou-Turski C, Czuczwar SJ & Turski WA (1986) Seizures produced by pilocarpine: neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain. Brain research 398:37-48.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z & Turski L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behavioural brain research 9:315-335.

Urrestarazu E, Chander R, Dubeau F & Gotman J (2007) Interictal high-frequency oscillations (100 - 500 Hz) in the intracerebral EEG of epileptic patients. Brain:1-13.

Van Buren JM, Wood JH, Oakley J & Hambrecht F (1978) Preliminary evaluation of cerebellar stimulation by double-blind stimulation and biological criteria in the treatment of epilepsy. Journal of neurosurgery 48:407-416.

van Strien NM, Cappaert NL & Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. Nature reviews Neuroscience 10:272-282.

Velasco F, Velasco AL, Velasco M, Jimenez F, Carrillo-Ruiz JD & Castro G (2007) Deep brain stimulation for treatment of the epilepsies: the centromedian thalamic target. Acta neurochirurgica Supplement 97:337-342.

Velasco M, Velasco F, Velasco AL, Lujan M & Vazquez del Mercado J (1989) Epileptiform EEG activities of the centromedian thalamic nuclei in patients with intractable partial motor, complex partial, and generalized seizures. Epilepsia 30:295-306.

Velasco M, Velasco F, Velasco AL, Brito F, Jimenez F, Marquez I & Rojas B (1997) Electrocortical and behavioral responses produced by acute electrical stimulation of the human centromedian thalamic nucleus. Electroencephalography and clinical neurophysiology 102:461-471.

Velasco M, Velasco F, Velasco AL, Boleaga B, Jimenez F, Brito F & Marquez I (2000) Subacute electrical stimulation of the hippocampus blocks intractable temporal lobe seizures and paroxysmal EEG activities. Epilepsia 41:158-169.

Vesper J, Haak S, Ostertag C & Nikkhah G (2007) Subthalamic nucleus deep brain stimulation in elderly patients--analysis of outcome and complications. BMC neurology 7:7.

Vonck K, Boon P, Achten E, De Reuck J & Caemaert J (2002) Long-term amygdalohippocampal stimulation for refractory temporal lobe epilepsy. Annals of neurology 52:556-565.

Vonck K, Boon P, Goossens L, Dedeurwaerdere S, Claeys P, Gossiaux F, Van Hese P, Smedt TD, Raedt R, Achten E, Deblaere K, Thieleman A, Vandemaele P, Thiery E, Vingerhoets G, Miatton M, Caemaert J, Van Roost D, Baert E, Michielsen G, Dewaele F, Van Laere K, Thadani V, Robertson D & Williamson P (2003) Neurostimulation for refractory epilepsy. Acta neurol belg 103:213-217.

WHO (2004) Epilepsy world map - DALY. World Health Organization.

Worrell GA, Parish L, Cranstoun SD, Jonas R, Baltuch G & Litt B (2004) High-frequency oscillations and seizure generation in neocortical epilepsy. Brain 127:1496-1506.

Worrell GA, Gardner AB, Stead SM, Hu S, Goerss S, Cascino GJ, Meyer FB, Marsh R & Litt B (2008) High-frequency oscillations in human temporal lobe: simultaneous microwire and clinical macroelectrode recordings. Brain 131:928 -937.

Wu DC, Xu ZH, Wang S, Fang Q, Hu DQ, Li Q, Sun HL, Zhang SH & Chen Z (2008) Time-dependent effect of low-frequency stimulation on amygdaloid-kindling seizures in rats. Neurobiology of disease 31:74-79.

Wyckhuys T, Raedt R, Vonck K, Wadman W & Boon P (2009) Comparison of hippocampal Deep Brain Stimulation with high (130 Hz) and low frequency (5 Hz) on afterdischarges in kindled rats. Epilepsy research 88:239-246.

Wyckhuys T, De Smedt T, Claeys P, Raedt R, Waterschoot L, Vonck K, Van den Broecke C, Mabilde C, Leybaert L, Wadman W & Boon P (2007) High frequency deep brain stimulation in the hippocampus modifies seizure characteristics in kindled rats. Epilepsia 48:1543-1550.

Yeckel MF & Berger TW (1998) Spatial distribution of potentiated synapses in hippocampus: dependence on cellular mechanisms and network properties. Journal Neuroscience 18:438-450.

Ying Z, Babb TL, Comair YG, Bushey M & Touhalisky K (1998) Increased densities of AMPA GluR1 subunit proteins and presynaptic mossy fiber sprouting in the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. Brain Res 798:239-246.

Zahn RK, Tolner EA, Derst C, Gruber C, Veh RW & Heinemann U (2008) Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats. Neurobiology of disease 29:186-200.

Zhang SH, Sun HL, Fang Q, Zhong K, Wu DC, Wang S & Chen Z (2009) Low-frequency stimulation of the hippocampal CA3 subfield is anti-epileptogenic and anti-ictogenic in rat amygdaloid kindling model of epilepsy. Neuroscience letters 455:51-55.

Zijlmans M, Jacobs J, Kahn YU, Zelmann R, Dubeau F & Gotman J (2011) Ictal and interictal high frequency oscillations in patients with focal epilepsy. Clinical Neurophysiology 122:664-671.

ANEXO A

Estimulação cerebral elétrica de baixa frequência em animais anestesiados e não epilépticos [2]

Com o objetivo de avaliar os efeitos da estimulação elétrica intracerebral de baixa frequência na plasticidade sináptica e a sua influência sobre o potencial de campo, experimentos pilotos foram realizados em animais anestesiados e não epilépticos. Primeiro para familiarização com os procedimentos técnicos e segundo, pela dificuldade em se obter animais cronicamente epilépticos.

A estimulação cerebral elétrica da via perforante com registro na região do giro denteado do hipocampo dorsal foi realizada para modular as oscilações hipocampais em animais anestesiados e não epilépticos com dois diferentes fármacos: a cetamina/xilazina e o uretano.

Para isso, os animais (N = 8) foram anestesiados por via sistêmica com um mistura de cetamina 10% e xilazina 2% (Agener União) na dose de 100 e 20 mg/kg respectivamente ou uretano (SIGMA) na dosagem de 1,5 g/kg e foram colocados em um aparelho estereotáxico.

Pares de eletrodos feitos de aço inoxidável (100 µm de diâmetro; California Fire Wire Company) para estimulação foram posicionados na via perforante (a partir do bregma, em mm, AP: 7,2; ML: 4,5; DV: 2) e foram utilizados para fornecer pulsos monofásicos quadrados (200 µs de duração) em diferentes frequências. Potenciais de campo espontâneos e evocados foram registrados a partir do GD do hipocampo dorsal (a partir do bregma, em mm, AP: 3,2; ML: 2; DV: 2,8) de acordo com o atlas de estereotaxia (Paxinos & Watson, 1997) utilizando uma matriz contendo um feixe de 4 eletrodos feitos de microfilamentos de tungstênio cobertos por teflon (50 µm, 1.0–1.2 MOhm @ 1KHz; California Fire Wire Company) em diferentes níveis (250 µm entre os níveis). Parafusos de referência foram colocados no crânio, acima do córtex frontal. A Figura 24 exibe algumas características da preparação experimental.

---

[2] O resumo desse trabalho foi enviado para a XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) e foi apresentado no formato de banner.

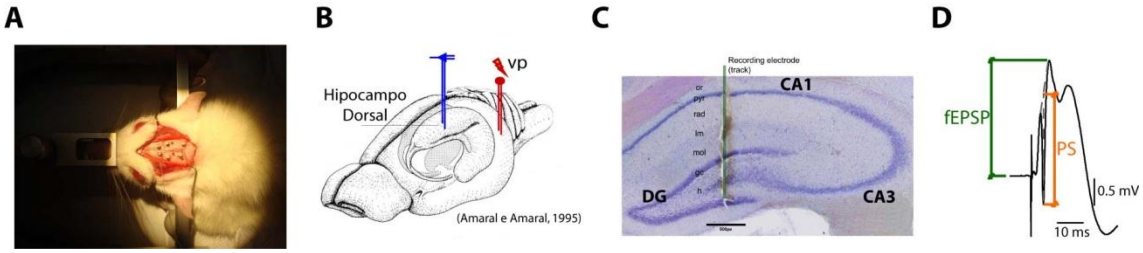

Figura 24 - Ilustração esquemática exibindo algumas características básicas da preparação experimental. **(A)** Imagem do animal no aparelho estereotáxico. **(B)** Ilustração que exibe a localização dos eletrodos implantados no hipocampo dorsal (registro, azul) e na via perforante (estimulação, vermelho). **(C)** Fotografia de um corte coronal de hipocampo corado com a técnica de Cresil Violeta, exibindo a marca do eletrodo de registro e a marcação das principais estruturas do hipocampo dorsal. **(D)** Ilustração gráfica do algoritmo utilizado para calcular a amplitude do fEPSP e do PS.

Os perfis eletrofisiológicos dos potenciais evocados foram utilizados para melhor posicionar os eletrodos de registro e de estimulação no encéfalo (Queiroz e cols., 2009). Para cada animal, a intensidade de estimulação mínima capaz de evocar uma resposta (limiar) e a intensidade de estimulação máxima onde a resposta saturada foi determinada e as intensidades foram selecionadas usando esses dois valores como 0 e 100%, respectivamente.

Para estudar a plasticidade sináptica dependente da atividade, nosso desenho experimental foi composto por três momentos:

Pré-Estimulação: Pulsos pareados (70ms) foram aplicados a 80% da resposta máxima por 20 minutos (um pulso a cada 10 segundos).

Estimulação de Baixa Frequência: 900 pulsos simples foram aplicados a 80% da resposta máxima por 15 minutos (EBF, 1 Hz).

Pós-Estimulação: Pulsos pareados (70ms) foram aplicados a 80% da resposta máxima por 45 minutos.

Os registros eletrofisiológicos, a análise do potencial evocado, a perfusão e a análise histológica foram previamente descritos no corpo da presente dissertação no tópico 3.5. As amplitudes do fEPS e do PS foram normalizadas para a situação Pré-Estimulação.

Os animais foram distribuídos em dois grupos: cetamina/xilazina (N=4) e uretano (N=4), entretanto a localização dos eletrodos só foi confirmada em 6 animais (3 em cada grupo) e apenas estes fizeram parte de nossa análise.

A análise da curva-estímulo resposta para os parâmetros fEPSP e PS (Figura 25), mostra que não houve diferença entre o limiar de excitabilidade e a intensidade de estimulação máxima entre os grupos.

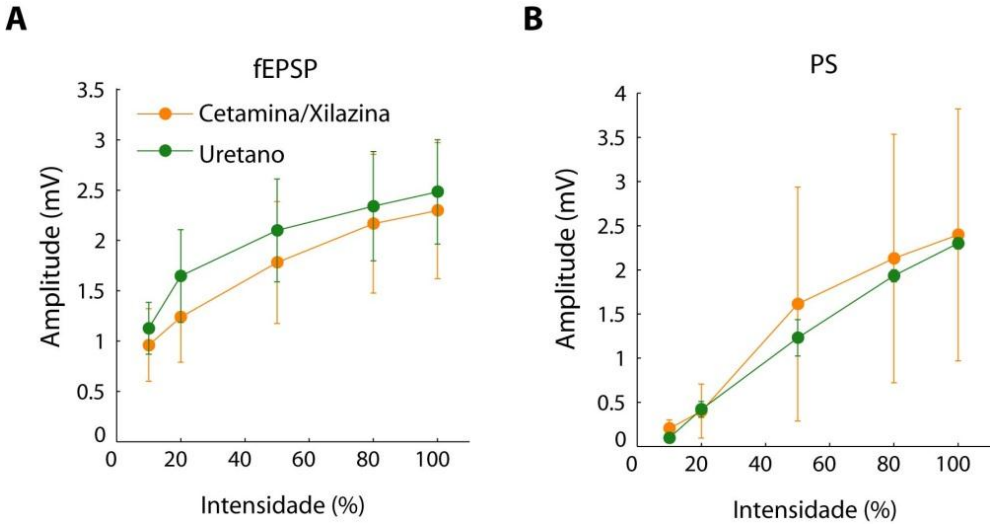

Figura 25 - Curvas de estímulo-resposta que relatam a amplitude do fEPSP (A) e PS (B) Observa-se que não houve diferença entre os grupos. Todos os dados são expressos como media ± erro padrão.

Depois de padronizar a intensidade de estimulação a 80% para os grupos, o protocolo de EBF foi aplicado. A Figura 26 expõe os resultados. Durante os 15 minutos do protocolo, a EBF ocasionou uma redução na amplitude do fEPSP para os animais anestesiados com cetamina/xilazina (1 *vs.* 0,82 ± 0,05; "pré" e "durante" estimulação respectivamente; $p<0,05$; teste t). Após o protocolo de EBF, os animais desse grupo apresentaram plasticidade sináptica de curta duração (0,82 ± 0,05 *vs.* 1,19 ± 0,12; "durante" e "pós" estimulação respectivamente; $p<0,05$; teste t). Em relação à amplitude PS, a EBF ocasionou diminuição em ambos os grupos (cetamina/xilazina: 1 *vs.* 0,42 ± 0,12 e uretano: 1 *vs.* 0,61 ± 0,14; "pré" e "durante" estimulação respectivamente; $p<0,05$; teste t). Após o término da EBF, os animais anestesiados com cetamina/xilazina apresentaram tendência para potenciação de curta duração: 0,42 ± 0,12 *vs.* 1,67 ± 0,44 "durante" e "pós" estimulação respectivamente).

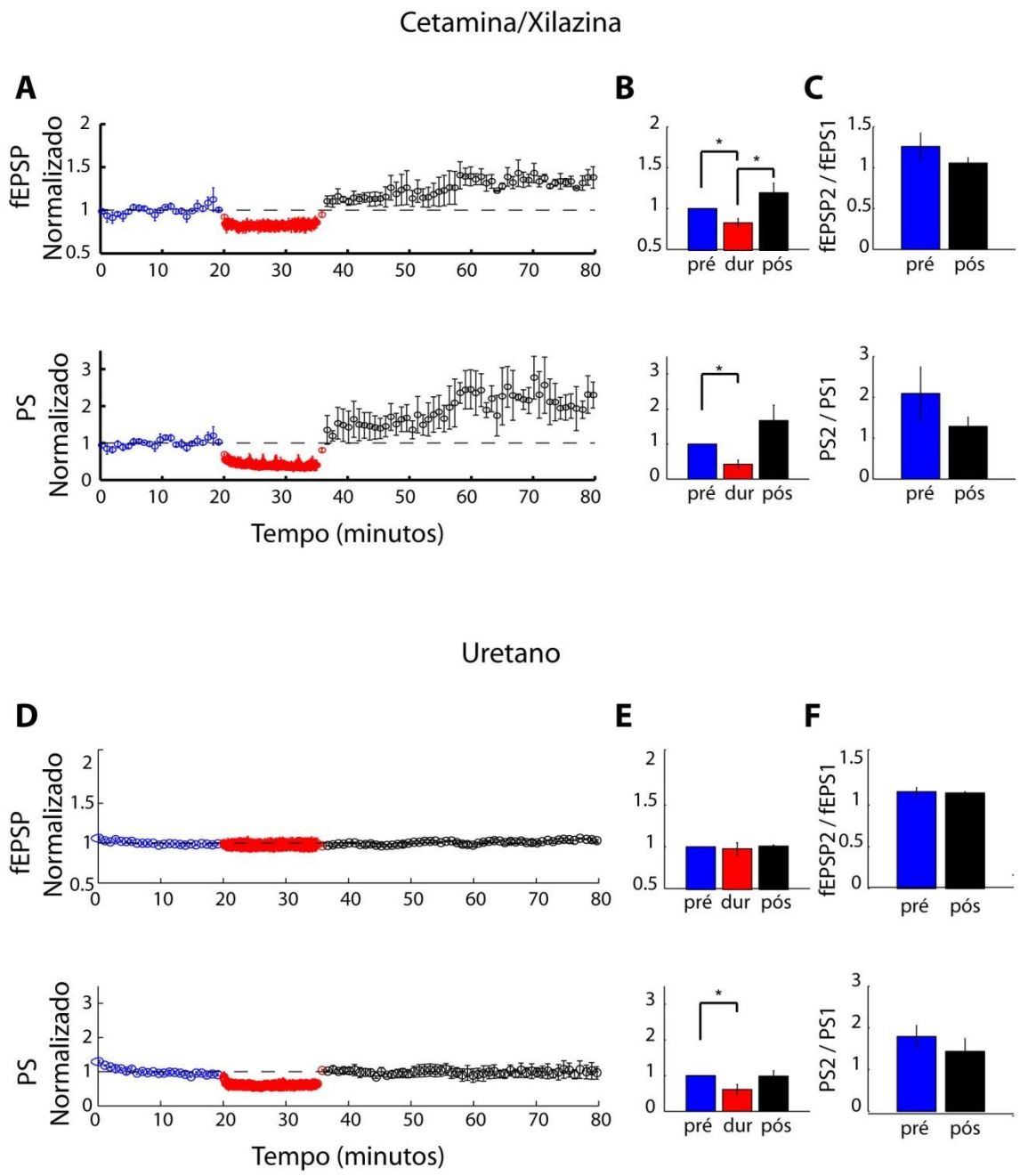

Figura 26 - Efeitos do protocolo de estimulação de baixa frequência (900 pulsos, 1 Hz). **(A, D)** Amplitudes fEPS e PS (média de cinco pontos), antes (azul), durante (vermelho), depois (preto) do protocolo de estimulação. A excitabilidade foi reduzida (fEPS e PS) durante a estimulação de 1Hz **(B,E)**. **(C,F)** A estimulação de 1 Hz atenuou a facilitação do pulso pareado (IPI = 70ms) em ambos os grupos. Desde animais anestesiados com uretano não apresentam plasticidade sináptica, as modificações na razão do PS2/PS1 não são inteiramente explicadas por um aumento na amplitude do PS. * Teste t de Student $p<0.05$.

A análise da atividade modulatória da razão do segundo pulso pelo primeiro (Figura 26C-F), expõe que o grupo anestesiado com cetamina/xilazina apresentou tendência para redução da facilitação do pulso pareado no parâmetro fEPSP, 1,26 ±0,17 *vs.* 1,06 ± 0,07; "pré" e "pós" estimulação

respectivamente. O parâmetro PS apresentou resultados semelhantes para ambos os grupos, cetamina/xilazina: 2,10 ± 0,65 *vs*. 1,29 ± 0,23 e uretano: 1,61 ± 0,35 *vs*. 1,24 ± 0,3; "pré" e "pós" estimulação respectivamente.

Depois de mensurar a influência da EBF no potencial de campo evocado, buscamos avaliar a influência da EBF sobre o potencial de campo espontâneo.

A análise linear no domínio da frequência antes e depois da EBF, expõe que a aplicação do pulso pareado (70ms) a 0,1Hz induz atenuação de oscilações rápidas (>20Hz) em ambos os grupos. Dados mostrados apenas para cetamina/xilazina (Figura 27).

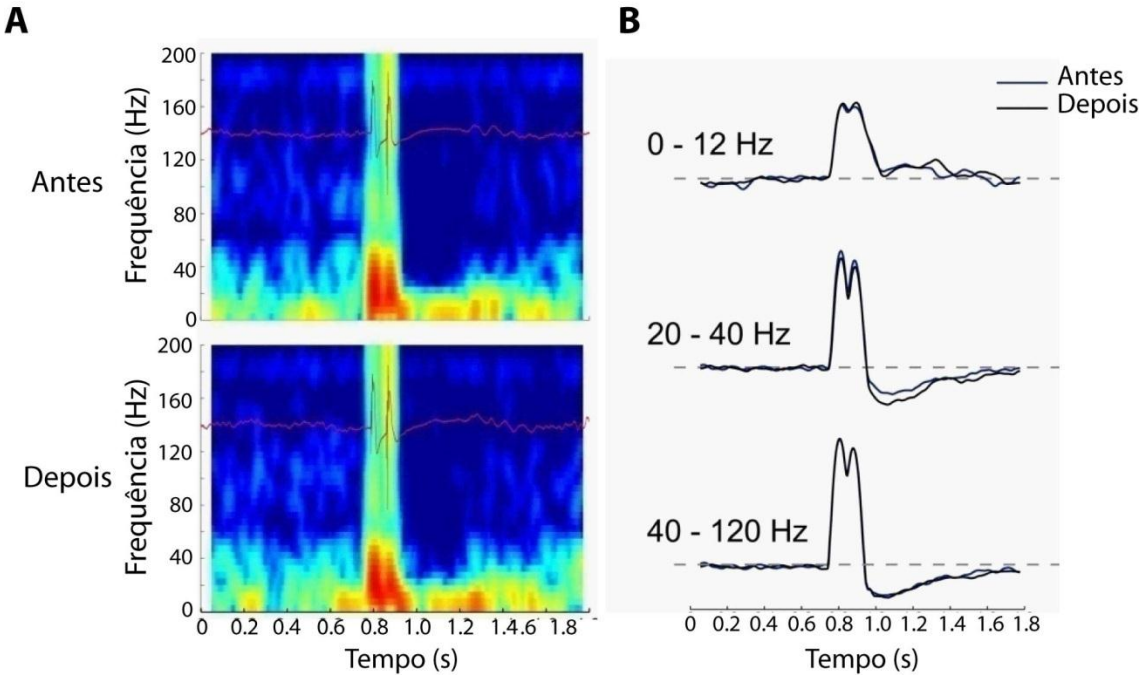

Figura 27 - Espectrogramas do potencial de campo espontâneo e evocado. **(A)** Potencial de campo representativo (vermelho) e espectrogramas nos animais anestesiados com cetamina/xilazina. Podemos observar diminuição da potência de 40-120 Hz.

Feito isso, buscamos avaliar a existência de correlação entre os parâmetros do potencial evocado com as oscilações espontâneas. Encontramos correlação positiva entre a redução da potência nas bandas de frequência de 20-40 Hz e 40-120 Hz com a amplitude do PS precedente apenas para os animais anestesiados com cetamina/xilazina (Figura 28).

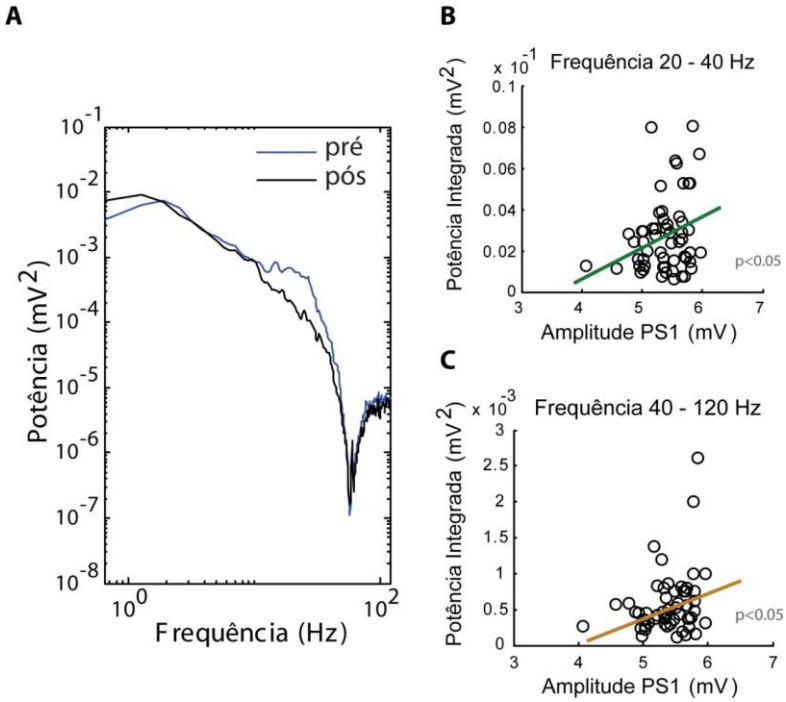

Figura 28 - Espectro da Densidade de Potência (PSD – do inglês Power Density Spectrum) de oscilações espontâneas. As oscilações espontâneas são modificadas pela estimulação de 1Hz em ratos anestesiados com cetamina. **(A)** Exemplo representativo de um PSD antes (azul) e depois (preto) da estimulação de 1Hz. Observe a redução das bandas de frequência acima de 20 Hz. Depois da estimulação de 1Hz, a potência de 20 - 40Hz. **(B)** e a potência de 40-120Hz **(C)** foram correlacionadas com a amplitude do PS precedente. * Teste t de Student $p<0.05$.

Assim, os resultados sugerem que a EBF induz uma plasticidade sináptica leve que é dependente do anestésico utilizado. Interessantemente, potenciação de curta duração foi observada apenas em animais anestesiados com cetamina/xilazina e o protocolo foi capaz de atenuar a potência de oscilações rápidas (>20Hz) no hipocampo. A redução na potência foi significantemente correlacionada com a amplitude do PS precedente.

É sabido pela literatura que protocolos de EBF (geralmente 1-5 Hz/ 10 – 15 minutos) induzem depressão sináptica de longa duração (LTD, do inglês, Long-term Depression) (Malenka, 1994; Abraham & Bear, 1996). Tal mecanismo requer ativação de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), dos receptores metabotrópicos do glutamato e dos íons Ca^{2+} (Dudek & Bear, 1992; Malenka & Bear, 2004). A depressão sináptica é saturável, reversível, específica para o local estimulado, dependente dos parâmetros da estimulação e diminui com o aumento da idade do animal (Dudek & Bear, 1992; Malenka & Bear, 2004). As circuitarias hipocampais são bastante exploradas para estudar os mecanismos

da LTD. Entretanto, neste trabalho, a EBF (900 pulsos a 1 Hz) não foi capaz de ocasionar depressão sináptica de longa duração na região do GD em animais anestesiados. Resultados semelhantes foram encontrados por Errington e colaboradores. Neste experimento, animais em livre curso e anestesiados com uretano receberam a estimulação de baixa frequência 1-5 Hz (900 pulsos, 20-50 μs, 60-140 μA) na via perforante ou via comissural com os eletrodos de registro posicionados na região do giro denteado ou em CA1. Os autores não encontraram depressão sináptica em ratos adultos. Apenas os animais jovens anestesiados (10 - 11 dias pós-parto) apresentaram depressão sináptica na região de CA1 que permaneceu por 30 minutos após o fim da estimulação de 2 Hz. Embora os autores não expliquem tais achados, eles sugerem que fatores como a idade do animal e as diferenças regionais dentro da circuitaria hipocampal são fatores chaves para a indução da depressão sináptica (Errington e cols., 1995). Em outro experimento, 600 pulsos a 1 – 5 Hz, também entregues na região da via perforante não foram capaz de ocasionar LTD no giro denteado de animais anestesiados com uretano (Fung e cols., 2011). Abraham e colaboradores testaram diferentes quantidades de pulsos entregues da região da via perforante em animais em livre curso e encontraram que a estimulação de baixa frequência (1 Hz – 100 ou 900 pulsos e 3 Hz - 900 pulsos) também não foi capaz de elucidar LTD no giro denteado (Abraham e cols., 1996). Segundo Mocket e colaboradores, há uma relação não linear entre o número de pulsos a 1Hz e a depressão sináptica. Há pouca depressão após 600 ou 900 pulsos e uma significante depressão após 1200 pulsos (Mockett e cols., 2002). Além de tais fatores, Yeckel e colaboradores ratificam que os mecanismos celulares que subsidiam a plasticidade sináptica são dependentes da estrutura alvo, onde diferentes estruturas podem modificar as respostas obtidas após os regimes de estimulação (Yeckel & Berger, 1998). Diante do exposto, os resultados desses trabalhos favorecem os obtidos neste trabalho, onde fatores como o anestésico utilizado, idade dos animais, regime da estimulação e o posicionamento dos eletrodos podem ter interferido com o processo de plasticidade sináptica.

A cetamina é um anestésico dissociativo geral que possui ação de curta duração com poucos efeitos adversos. É um antagonista não competitivo dos receptores NMDA e pode inibir vários canais sensíveis à voltagem, incluindo os

canais de sódio, cálcio e o potássio. Já o uretano é um anestésico que possui ação de longa duração e promove aumento da condutância do potássio e deprime a neurotransmissão glutamatérgica. Entretanto, é carcinogênico (Hara & Harris, 2002). Estudos prévios mostram que animais anestesiados com cetamina apresentam oscilações hipocampais com picos na frequência de 1.66Hz e entre 30 – 80 Hz (Sharma e cols., 2010) e produzem diminuição da potência nas frequências entre 3-7 Hz, 8 – 12 Hz. Os animais anestesiados com uretano apresentam oscilações com picos na frequência de 1 Hz (Sharma e cols., 2010). Entretanto, não há estudos que mostrem a influência de estimulações de baixa frequência sobre as oscilações espontâneas em animais anestesiados.

Neste trabalho, a estimulação de baixa frequência mostrou-se eficaz em reduzir a potências das oscilações rápidas (>20 Hz) no hipocampo apenas nos animais anestesiados com cetamina/xilazina. A redução na potência foi significantemente correlacionada com a amplitude do PS precedente. Fatores como a reorganização da dinâmica espectral podem estar envolvidos em tal efeito, entretanto, análises mais acuradas necessitam ser feitas para comprovar tal hipótese.

ANEXO B

Considerações sobre modelos experimentais em epilepsia

Por motivos éticos, a pesquisa em epileptologia é, em sua maior parte, realizada com modelos animais. Existem modelos *in vitro* e *in vivo* que mimetizam os diferentes tipos de crises epilépticas, síndromes e/ou aspectos específicos da doença, visando compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese, na manutenção e na propagação das crises epilépticas, bem como para desenvolver e testar potenciais novos tratamentos para a epilepsia (Raol & Brooks-Kayal, 2012). Existem modelos de crises (modelos agudos) e modelos de epilepsia (modelos crônicos). Neste caso, os modelos devem necessariamente apresentar crises espontâneas e recorrentes.

No grupo dos modelos crônicos, destacam-se os modelos que reproduzem a epilepsia do lobo temporal. Esses modelos induzem uma condição inicial de estado epiléptico (SE) que é definido como crises epilépticas suficientemente prolongadas ou repetidas em intervalos curtos, que é seguido por um período latente, sem crises, com subsequente desenvolvimento de crises espontâneas e recorrentes. Esse modelo pode ser reproduzido por estímulos elétricos (modelo do abrasamento) ou pela administração de agentes convulsivantes, como a pilocarpina (agonista colinérgico muscarínico) e o ácido caínico (agonista glutamatérgico). Neste trabalho, utilizamos modelos químicos. Abaixo, uma apresentação detalhado desses modelos.

Pilocarpina

A pilocarpina é o principal alcalóide obtido das folhas das plantas sul-americanas do gênero *Pilocarpus sp.*, a qual possui propriedades colinérgicas com ação predominantemente muscarínica, específica para os receptores do subtipo M1 (Barany, 1962). O modelo da pilocarpina foi proposto em 1983 por Ésper Cavalheiro, da Escola Paulista de Medicina, e colaboradores (Turski e cols., 1983).

Esses autores observaram que quando administrada sistemicamente, pilocarpina na dose de 400 mg/kg era capaz de desencadear hipotonia e automatismos orofaciais, seguidas por crises motoras límbicas: clonia das patas anteriores, elevação postural e queda. Esses efeitos aparecem após 15 - 20 minutos da administração da droga. Aproximadamente 45 minutos depois, os animais apresentam um estado de crises contínuas auto-sustentadas, o SE. Caso o SE permaneça por pelo menos 90 min, os animais apresentam crises espontâneas e recorrentes (Turski e cols., 1983).

O principal mecanismo de ação da pilocarpina inclui ativação dos receptores muscarínicos do subtipo M1, que são receptores metabotrópicos. Além desta via, ocorre ativação secundária do sistema glutamatérgico por meio dos receptores do tipo NMDA (Freitas e cols., 2007). Essa ativação ocasiona excitotoxicidade no hipocampo e em demais estruturas, o que resulta em levando a perda de neurônios piramidais na região de CA1, CA3 (Lason e cols., 1997; Furtado e cols., 2011) e de interneurônios na região do hilo do GD (Gorter e cols., 2001; Furtado e cols., 2011), ativação de mecanismos de reorganização sináptica, sinaptogêneses, neurogênese e mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais e em circuitos inibitórios (Freitas e cols., 2007). Todas estas alterações neuropatológicas são compatíveis com a esclerose mesial hipocampal, encontrada em pacientes com epilepsia.

Em decorrência da coativação parassimpática periférica após a administração da pilocarpina, é necessário o pré-tratamento com um antagonista colinérgico muscarínico. O pré-tratamento de escolha é a administração da metil escopolamina, que não atravessa a barreira hematoencefálica e por isso atenua a ativação periférica da pilocarpina. Sem esse pré-tratamento, os animais podem apresentar piloereção, salivação, tremor e diarréia (Turski e cols., 1983).

A pilocarpina pode ser administrada por via sistêmica em dose única de 320 - 400mg/kg (Turski e cols., 1983; Turski e cols., 1986; Garcia-Cairasco e cols., 2004), em baixas doses com associação com o lítio (Glien e cols., 2001) ou intra-hipocampalmente (2,4 mg/1µl), por exemplo (Furtado e cols., 2002; Furtado e cols., 2011).

Além de ser administrada isoladamente, a pilocarpina pode ser associada com outros fármacos. O modelo da pilocarpina associado com o cloreto de lítio é o exemplo mais utilizado. O cloreto de lítio exerce ação modulatória sobre a atividade colinérgica e quando associado com a pilocarpina em doses baixas e não tóxicas, diminui o limiar das convulsões. O cloreto de lítio (3mEq - 127mg/kg) é administrado 24 horas antes da pilocarpina (30-40mg/kg) (Honchar e cols., 1983; Clifford e cols., 1987; Rigoulot e cols., 2003; Druga e cols., 2010).

A permanência do SE por algumas horas é suficiente para ocasionar o aparecimento de crises espontâneas e recorrentes (Cavalheiro e cols., 1991) A duração do SE pode ser controlada pela administração de benzodiazepínicos, como o diazepam (5-10mg/kg) (Glien e cols., 2001), barbitúricos (Scharfman, 2002) e da cetamina (50mg/kg) (Chatillon e cols., 2011; Levesque e cols., 2011).

A latência para o desenvolvimento e o percentual de animais que desenvolvem crises espontâneas e recorrentes depende de vários fatores (i) da genética, (ii) da idade do animal, (iii) do tempo de manutenção do SE e (iv) das drogas utilizadas para abortá-lo (Glien e cols., 2001). A frequência e o padrão das crises espontâneas é variável (Scorza e cols., 2009). As crises são classificadas de acordo com a Escala de Racine (Racine, 1972), uma das ferramentas mais frequentemente utilizadas para avaliar a intensidade das crises em modelos experimentais de epilepsia (Pitkanen e cols., 2007; Luttjohann e cols., 2009). Esta escala categoriza 5 estágios de severidade e é baseada no repertório comportamental durante a crise: estágio 1, automatismos orofaciais; estágio 2, clonia cabeça; estágio 3, clonia patas anteriores; estagio 4, elevação; estágio 5, elevação com posterior queda (Racine, 1972).

Acido Caínico

O ácido caínico é um ácido isolado da alga vermelha *Digenea*, encontrada em águas tropicais e subtropicais (Ben-Ari e cols., 1984). É um agonista glutamatérgico com potentes propriedades excitotóxicas e convulsivantes.

Uma vez administrado, o acido caínico liga-se aos canais ionotrópicos do glutamato do subtipo AMPA (Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propiônico) e cainato (Ben-Ari & Cossart, 2000). Após sua administração, ocorrem mudanças na expressão gênica dos receptores glutamatérgicos do tipo Glu2, Glu3 e GABA nas camadas piramidais e granulares do hipocampo, (Friedman e cols., 1994) extensiva neurodegeneração na região do hilar do GD e de CA3, (Sloviter, 1992; Ben-Ari & Cossart, 2000) e parcialmente na região de CA1, (French e cols., 1982) destruição neuronal em estruturas extrahipocampais (Friedman e cols., 1994) bem como preservação das células granulares do GD (Sloviter, 1992). A alta afinidade dos receptores na região de CA3 com o convulsivante pode ser responsável pela deflagração das descargas paroxísticas encontradas no modelo. Receptores com propriedades cinéticas similares na amígdala e no córtex piriforme exibem importante função no modelo (Ben-Ari e cols., 1984).

O ácido caínico pode ser administrado por via sistêmica, (Ben-Ari e cols., 1984; Popovici e cols., 1990; Sloviter & Bumanglag, 2012) em áreas especificas do encéfalo como o hipocampo, por exemplo (French e cols., 1982) ou por via intravenosa (Lothman & Collins, 1981). O tratamento pode ser efetuado sistemicamente com doses altas (8 - 15mg/kg) (Sloviter, 1992) ou com repetidas baixas doses (2,5 - 5mg/kg/h atingindo a dose máxima de 50mg/kg) (Hellier & Dudek, 1999) e na dosagem de 0,2 - 0,8μg/0,2μl por via intra-hipocampal (Bragin e cols., 1999b; Bragin e cols., 2002b; Bragin e cols., 2003; Ibarz e cols., 2010).

Na dosagem de 8 mg/kg, o agente induz crises motoras límbicas que atingem o estágio V da Escala de Racine cerca de 60-120 minutos após a sua administração (Popovici e cols., 1990; Friedman e cols., 1994). Na dose de 15mg/kg a mortalidade é cerca de 10% (Friedman e cols., 1994), mas pode variar até 20%, mesmo com doses mais baixas (5mg/kg) (Zahn e cols., 2008).

Sob o registro eletroencefalográfico, a atividade epileptiforme inicia-se cerca de 5-60 minutos depois da administração da droga e consiste de disparos contínuos que aumentam gradualmente em amplitude e frequência que culminam para o padrão de crises epilépticas (Stringer & Sowell, 1994) O padrão

eletrográfico inicia-se no hipocampo, e posteriormente propaga-se para a amígdala e para outras estruturas (Ben-Ari, 1985).

A duração do SE pode ser controlada pela administração de benzodiazepínicos, como o diazepam (5-10mg/kg). As crises espontâneas e recorrentes aparecem cerca de 14 - 35 dias depois da administração do ácido (Lothman & Collins, 1981; Sloviter, 1992) e a sua frequência aumenta em função do tempo (Hellier & Dudek, 1999).

ANEXO C

CEUA-AASDAP: Parecer - protocolo #07/2010

Marcelo Carvalho <marcelo@natalneuro.org.br> Tue, Jun 8, 2010 at 9:03 AM
To: Claudio Queiroz <clausqueiroz@gmail.com>
Cc: Arboes <arboes@natalneuro.org.br>

Prof. Claudio,

A comissão considerou que os esclarecimentos feitos no seu protocolo de pesquisa estão de acordo com o solicitado. Portanto, ele está Aprovado.

Protocolo 07/2010
Título: Interferindo com oscilações de alta frequência (80-500Hz) no hipocampo epiléptico: consequências para as crises espontâneas.
Parecer: Aprovado

Por favor, entregue-nos a cópia impressa da versão final assinada. Você poderá entregar à Valéria, como Responsável Técnica pelos Biotérios, o cronograma de uso dos animais, que possibilitará o planejamento de reprodução dos animais e a garantia da disponibilidade dos mesmos quando você necessitar.

Atenciosamente,

Marcelo

Em 7 de junho de 2010 18:41, Claudio Queiroz <clausqueiroz@gmail.com> escreveu:

> Prezado Marcelo,
>
> Envio em anexo o formulário CEUA-AASDAP revisado, conforme solicitação do Comitê. Para sua ciência, gostaria de esclarecer rapidamente os dois pontos de questionamento:
>
> **Item (5.a1)**: A comissão entendeu corretamente o número de animais que será utilizado no trabalho (N=65). Esse número, já mencionado ao final do segundo parágrafo do item 3, foi ressaltado com negrito nesse ítem e incluído no item 5, sob o subtítulo "Indução de estado de mal epiléptico (SE)".
>
> **Item (5.a2)**: A palavra ictogênese significa geração de crise e tem sua origem no termo *icere* do latim (= crise). O presente projeto tem como objetivo principal reduzir a frequência de crises em um modelo experimental de epilepsia utilizando protocolos de estimulação elétrica. Teoricamente, essa redução pode ser decorrente (1) de um efeito agudo da estimulação elétrica sobre as crises ou (2) de uma modificação da condição epiléptica. Nesse segundo caso, diz-se que o efeito é anti-epileptogênico, pois foi capaz de modificar a condição patológica. Para separarmos um efeito do outro, utilizaremos um biomarcador da condição epiléptica, as oscilações de alta frequência ("fast ripples"). As alterações no texto foram feitas em azul, para facilitar o trabalho do revisor.
>
> Espero que as explicações sejam suficientes e me encontro a disposição para os eventuais esclarecimentos que ainda se fizerem necessários. Tomei a liberdade de encaminhar essa mensagem para a Valéria Arboes, com o objetivo dar maior agilidade e transparência ao processo. Gostaria ainda de registrar o meu agradecimento ao trabalho realizado por essa comissão.
>
> Um cordial abraço,
>
> Claudio Queiroz
>
> 2010/6/7 Marcelo Carvalho <marcelo@natalneuro.org.br>
>
>> Prezado Prof. Claudio,
>>
>> A CEUA-AASDAP discutiu em assembléia, no dia 04/06/2010, a necessidade de esclarecimentos sobre seu protocolo de pesquisa. Como resultado dessa discussão, venho em nome da CEUA informá-lo que o protocolo está "pendente" até que os esclarecimentos descritos a seguir sejam feitos:

Protocolo 07/2010
Título: Interferindo com oscilações de alta frequência (80-500Hz) no hipocampo epiléptico: consequências para as crises espontâneas.

a) Item 5: Métodos
a.1) A comissão entende que 60 animais serão submetidos a injeção de pilocarpina e 5 animais serão submetidos a injeção de solução salina. Favor confirmar e inserir a informação no formulário.
a.2) No início da página 3, favor esclarecer a frase "Utilizaremos a freqüência de crises espontâneas como parâmetro anti-ictogênico e a ocorrência dos 'fast ripples' como parâmetro antiepileptogênico".

Após feitas as alterações solicitadas, favor enviar o formulário revisado por email e entregar uma cópia impressa a mim. Estando em conformidade, o protocolo poderá ser aprovado pela vice-presidente da comissão sem necessidade de assembléia.

Em caso de dúvidas por favor entrar em contato.
Atenciosamente,
Marcelo

--
AASDAP / IINN-ELS
phone: +55 (84) 4008-0566
e-mail: marcelo@natalneuro.org.br
www.natalneuro.org.br

ANEXO D

Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º **039/2011**

Professor/Pesquisador: *CLAUDIO MARCOS TEIXEIRA DE QUEIROZ*

Natal (RN), 21 de março de 2012.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto "INTERFERINDO COM OSCILAÇÕES DE ALTA FREQUÊNCIA (80-500 HZ) NO HIPOCAMPO EPILÉPTICO: CONSEQUÊNCIAS PARA AS CRISES ESPONTÂNEAS", **protocolo nº 039/2011**, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **JULHO DE 2014** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

Elaine C. Gavioli
Coordenadora da CEUA

UFRN – Campus Universitário – Centro de Biociências
Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal/RN
Telefone: (84) 3215-3419 ramal 210
e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br