

JOACIR GRACIOLLI CORDEIRO

**A UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS COMPUTACIONAIS NO DESENVOLVIMENTO E
ANÁLISE DO MODELO ANIMAL DE KINDLING HIPOCAMPAL**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-
Graduação em Clínica-Cirúrgica, do Setor de Ciências
da Saúde da Universidade Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. João Cândido Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Andreas Schulze Bonhage

Coordenador: Prof. Dr. Jorge E. Fouto Matias

CURITIBA

2007

Para Karina, minha sempre companheira, amiga e esposa; por ter se doado de
sobremaneira ao nosso crescimento.

Aos meus pais e irmão que fizeram de mim alguém... alguém cujo amor pela família é o
bem maior que possuí.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Cândido Araújo, neurocirurgião do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) e Universidade Federal do Paraná (UFPR), não somente por orientar a confecção desta obra, mas por ser farol e exemplo em toda minha formação neurocirúrgica.

Ao Prof. Dr. Jorge E. Fouto Matias, coordenador do Programa de Pós - Graduação em Cirurgia da UFPR, pelo apoio e pelas valiosas sugestões na realização deste trabalho.

Ao Dr. Alberto Capurro, pós-doutorando do *Freiburger Bernstein Center for Computational Neuroscience (FBCCN)*, por ter criado toda essência e com grande amizade e dedicação, ter trabalhado e orientado de perto o projeto

Ao Prof. Dr. Andreas Schulze-Bonhage, chefe do Departamento de Epilepsia da Universidade Clínica de *Freiburg*, por possibilitar o desenvolvimento deste projeto e co-orientar esta obra.

Ao Prof. Dr. Ad Aertsen, diretor-geral do *Bernstein Centers for Computational Neuroscience* da Alemanha (BCCN), pelo suporte e avaliação criteriosa que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr Ralph Maier, pós-doutorando do *Freiburger Bernstein Center for Computational Neuroscience (FBCCN)*, por ter auxiliado na análise estatística e programação computacional.

A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para a realização e divulgação deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
RESUMO	13
<i>ABSTRACT</i>.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 JUSTIFICATIVA.....	16
1.2 OBJETIVOS.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 ELETROFISIOLOGIA DAS DESCARGAS ICTAIS.....	18
2.2 O PAPEL DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL.....	19
2.3 EPILEPSIA TEMPORAL: MODELO ANIMAL.....	22
2.4 NEUROESTIMULAÇÃO NA ELT: ESTUDOS EM HUMANOS.....	27
2.5 A INFORMÁTICA NO MODELO DE KINDLING HIPOCAMPAL DORSAL.....	29
2.6 ANÁLISE CORRELACIONAL.....	29
3 MATERIAL E MÉTODO.....	31
3.1.1 Critérios de inclusão.....	31
3.1.2 Critérios de exclusão.....	31
3.2 PREPARAÇÃO DO ANIMAL.....	32
3.3 CAPTAÇÃO E PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	38
3.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL.....	40
3.5 CRONOGRAMA.....	44
3.6 AVALIAÇÃO DO PROCESSO.....	44

3.6.1 Avaliação comportamental.....	44
3.6.2 Avaliação eletroencefalográfica.....	44
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 DADOS REFERENTES À POPULAÇÃO.....	46
4.2 SUBDIVISÃO DO PROCESSO DE <i>KINDLING</i> EM FASES.....	46
4.3 ANÁLISE DA RESPOSTA COMPORTAMENTAL.....	47
4.4 Análise das WDS.....	49
4.5 ANÁLISE DA DURAÇÃO DAS 1AD.....	51
4.5.1 Análise das 1AD hipocampais pela frequência.....	52
4.5.2 Análise das 1AD hipocampais pela amplitude.....	56
4.5.3 Comparação entre a análise de amplitude e de frequência.....	60
4.6 ANÁLISE DA DURAÇÃO DAS AD.....	61
4.7 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E AMPLITUDE DAS AD.....	64
4.7.1 Observações gerais.....	64
4.7.2 Análise do conteúdo de frequência das 1AD.....	64
4.7.3 Análise do conteúdo de frequência das 1AD hipocampais.....	70
4.8 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE AS AD HIPOCAMP AIS.....	73
5 DISCUSSÃO	85
5.1 DISCUSSÃO DOS ACHADOS REPRODUZIDOS.....	85
5.1.1 Padrão comportamental.	85
5.1.2 Padrão eletroencefalográfico.....	86
5.2 DISCUSSÃO DOS NOVOS ACHADOS.....	87
5.2.1 Duração das 1AD.....	87

5.2.2 Descargas gama e correlação linear.....	88
5.2.3 Descargas de alta frequência e padrão comportamental.....	89
6 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGEM.....	100
ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGEM.....	101
ANEXO 3 – SUPORTE FINANCEIRO.....	103

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – IMAGEM DE RESSONÂNCIA EVIDENCIANDO A LOCALIZAÇÃO DOS ELETRODOS PARA ESTIMULAÇÃO TEMPORAL MESIAL.....	21
FIGURA 2 – DESENHO REPRESENTANDO A LOCALIZAÇÃO DO ELETRODO PARA ESTIMULAÇÃO SUBTALÂMICA.....	21
FIGURA 3 – PREPARADO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VISTA SAGITAL DO HIPOCAMPO DO RATO WISTAR.....	23
FIGURA 4 – TRAÇADO DE EEG COM UMA SESSÃO DE ESTÍMULO NO HIPOCAMPO DORSAL.....L.....	24
FIGURA 5 – SEGMENTO DO TRAÇADO DE EEG COM O PADRÃO DE DUAS WDS	25
FIGURA 6 – FOTOGRAFIA DA CÂMARA PARA A INDUÇÃO ANESTÉSICA COM ISOFLUORANO.....	32
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DOS LOCAIS ONDE FORAM REALIZADOS OS ORIFÍCIOS CRANIANOS PARA O IMPLANTE ESTEREOTÁXICO.....	33
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DOS ELETRODOS IMPLANTADOS NO HIPOCAMPO DORSAL DIREITO.....	35
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DOS ELETRODOS IMPLANTADOS NO HIPOCAMPO DORSAL ESQUERDO.....	36
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA EM CORTE SAGITAL DO CÉREBRO DOS LOCAIS DE IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS NO HEMISFÉRIO DIREITO.....	37
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA EM CORTE SAGITAL DO CÉREBRO DOS LOCAIS DE IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS NO HEMISFÉRIO ESQUERDO.....	38
FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO PARA O REGISTRO DO EEG.....	39
FIGURA 13 – FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE REGISTRO SIMULTÂNEO DO TRAÇADO DE EEG E PADRÃO COMPORTAMENTAL.	40
FIGURA 14 – FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO PARA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL.....	41

FIGURA 15 – REGISTRO DO PADRÃO COMPORTAMENTAL APÓS A ESTIMULAÇÃO CEREBRAL.....	42
FIGURA 16 – FOTOGRAFIA COM O CONTROLE HISTOLÓGICO DO POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS.....	43
FIGURA 17 – PADRÃO ELETROENCEFALOGRÁFICO CARACTERÍSTICO DO FINAL DAS AD.....	62
FIGURA 18 - ESPECTROGRAMA EXPLICATIVO COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA DE UM RATO NOS PRIMEIROS 60 SEGUNDOS DE UMA SESSÃO.....	66
FIGURA 19 – ESPECTROGRAMAS COM O CONTEÚDO MÉDIO DE FREQUÊNCIA NOS PRIMEIROS 10 SEGUNDOS APÓS O ESTÍMULO (1AD) NO GRUPO DE RATOS.....	67
FIGURA 20 – ESPECTROGRAMAS COM O CONTEÚDO MÉDIO DE FREQUÊNCIA DO GRUPO DE RATOS ENVOLVENDO OS PRIMEIROS SEGUNDOS DO COMPORTAMENTO CONVULSIVO GENERALIZADO.....	68
FIGURA 21 – TRAÇADO DE EEG EVIDENCIANDO OS TRANSIENTES DE ALTA FREQUÊNCIA (<i>RIPPLES</i>) EM AMBOS OS HIPOCAMPOS.....	69
FIGURA 22 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA NO HE DE UM RATO EM D1.....	71
FIGURA 23 - ESPECTROGRAMA EXPLICATIVO COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA DO HE E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HE E HD.....	74
FIGURA 24 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D1.....	75
FIGURA 25 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D2.....	76
FIGURA 26 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D3.....	77
FIGURA 27 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR	

ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D4.....78

FIGURA 28 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D5.....79

FIGURA 29 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D6.....80

FIGURA 30 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D7.....81

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

TABELA 1 – ESCALA COMPORTAMENTAL DE RACINE PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES CONVULSIVAS E ESCALA COMPORTAMENTAL DE PINEL E ROVNER.....	27
TABELA 2 – FASES ANALISADAS DO PROCESSO DE <i>KINDLING</i>	47
TABELA 3 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DO COMPONENTE GENERALIZADO DE CADA CRISE CONVULSIVA DAS FASES D5, D6 E D7.....	48
GRÁFICO 1 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS CRISES CONVULSIVAS GENERALIZADAS.....	48
GRÁFICO 2 – MÉDIA DO NÚMERO DE WDS APRESENTADO PELO GRUPO DE RATOS EM CADA FASE DO PROCESSO DE <i>KINDLING</i>	49
GRÁFICO 3 – NÚMERO DE WDS APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA SESSÃO DE <i>KINDLING</i>	50
GRÁFICO 4 – MÉDIA DO NÚMERO DE WDS APRESENTADAS PELO GRUPO DE RATOS EM CADA SESSÃO DE <i>KINDLING</i>	51
TABELA 4 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS 1AD HIPOCAMPAS APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA SESSÃO (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA).....	53
GRÁFICO 5 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HD (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA).....	54
GRÁFICO 6 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA).....	55
GRÁFICO 7 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HD E HE (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA).....	56
TABELA 5 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS 1AD HIPOCAMPAS APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA SESSÃO (ANÁLISE DE AMPLITUDE).	57
GRÁFICO 8 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HD (ANÁLISE DE AMPLITUDE)	58
GRÁFICO 9 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE (ANÁLISE DE AMPLITUDE)	59

GRÁFICO 10 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE E HD (ANÁLISE DE AMPLITUDE).....	60
GRÁFICO 11 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA E AMPLITUDE).....	61
GRÁFICO 12 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HD (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA E AMPLITUDE).....	61
TABELA 6 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA FASE.....	63
GRÁFICO 13 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS AD	63
TABELA 7 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS DG APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA FASE NO HD E HE.	72
GRÁFICO 14 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS DG NO HD E HE	73
TABELA 8 – COMPORTAMENTO APRESENTADO ANTES E DURANTE AS DG NO HD.....	82
TABELA 9 – COMPORTAMENTO APRESENTADO ANTES E DURANTE AS DG NO HE.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1AD	- pós-descarga(s) primária(s)
2AD	- pós-descarga(s) secundária(s)
AD	- pós-descarga(s)
DG	- descarga(s) gama
DP	- desvio padrão
EEC	- estimulação elétrica cerebral
EEG	- registro eletroencefalográfico de escalpe
EEGI	- registro eletroencefalográfico invasivo
EH	- esclerose hipocampal
ELT	- epilepsia do lobo temporal
EMT	- esclerose mesial temporal
HD	- hipocampo dorsal direito
HE	- hipocampo dorsal esquerdo
LT	- lobo temporal
p	- nível de significância
PPD	- potenciais paroxísticos de despolarização
WDS	- <i>wet dog shakes</i>

RESUMO

A epilepsia do lobo temporal (ELT) secundária à esclerose mesial temporal (EMT) é uma doença de significativa prevalência que causa progressiva incapacitação e refratariedade clínica. A ELT é fonte de constantes pesquisas com o intuito de se buscar formas alternativas ao tratamento cirúrgico convencional. O *kindling* hipocampal é um modelo animal da ELT de freqüente utilização na epileptologia. Almeja-se que através da utilização de múltiplos eletrodos intracerebrais associados ao emprego dos *softwares Spike2* e *Matlab* 6.5 obtenha-se uma análise eletrofisiológica mais detalhada, fornecendo, assim, substrato para a melhor compreensão da fenomenologia da ELT. Com este propósito, foram utilizados 12 ratos Wistar adultos jovens para a confecção do modelo de *kindling* hipocampal dorsal. Por meio de cirurgia estereotáxica foram implantados quatro eletrodos no hipocampo dorsal direito (HD), dois no hipocampo dorsal esquerdo (HE), um em cada neocórtex frontal e um referencial comum cerebelar. Foi aplicado um protocolo com um estímulo diário por cinco dias consecutivos e dois de intervalo no hipocampo dorsal direito até a obtenção de dez crises consecutivas grau cinco de RACINE. As manifestações eletroencefalográficas e comportamentais foram simultaneamente registradas pelo *software Spike2*. Este software foi acoplado ao *software Matlab* 6.5 para o processamento dos padrões de freqüência e correlação linear entre pares de canais. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo *U-Test* e *Wilcoxon signed ranks test* conforme a natureza dos dados. Encontrou-se uma relação inversa com o número das *wet dog shakes* (WDS) e o surgimento dos estágios convulsivos motores de RACINE. A duração das pós-descargas primárias (1AD) foi quantificada através da análise de freqüência e amplitude dos traçados e verificou-se que elas aumentaram no decorrer do processo em ambos os hipocampos e individualmente, as durações foram maiores no HE. O conteúdo de freqüência das 1AD também aumentou com o decorrer do processo e as mais altas freqüências se apresentaram após o início das crises convulsivas generalizadas. Foram observadas descargas de alta freqüência (*ripples*) em ambos os hipocampos durante as 1AD, bem como descargas na faixa ao redor de 80Hz ao fim da maioria das mesmas. Observou-se uma estreita relação temporal entre estas descargas e a perda da correlação linear entre os hipocampos. Os dados encontrados neste estudo apontam para um papel relevante do hipocampo contralateral e das altas freqüências para a gênese dos fenômenos ictais neste modelo. É, também, ressaltada a existência de um mecanismo endógeno de ação anticonvulsiva que contribui para o cessar as 1AD e cujo reflexo seja percebido na faixa de freqüência ao redor de 80Hz.

Palavras-chave: kindling hipocampal, epilepsia temporal, modelo animal

ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) due to mesial temporal sclerosis (MTS) is a frequent disease which causes progressive disability and clinical refractoriness. Extensive research to find better treatment options is underway in many centers. Dorsal hippocampal kindling (DHK) is a classic MTS animal model applied in the epileptology research. We aim to provide further information about TLE's physiopathology with the use of multiple intracerebral electrodes associated to the computational analysis (Spike2 and Matlab 6.5 softwares). For this purpose, 12 Wistar rats were used to produce a DHK model. Each rat received four electrodes in the right dorsal hippocampus (RDH), two in the left one, one in each frontal neocortex with a common reference above the cerebellum. A daily stimulation protocol was applied in series of five consecutive days and two days intervals in the RH. The process was continued until the rat presents seizures degree five on the Racine scale for ten consecutive sessions (i.e. fully kindled rats). The behavioral and electroencephalographic responses were simultaneously recorded by Spike2. Frequency and linear correlation analyses were made through Matlab 6.5. For the statistical analysis U-Test and Wilcoxon signed ranks test were applied. As result it was found an inverse relationship between the number of wet dog shakes presented in each session and the appearance of Racine's motor seizure stages. Moreover it was observed a significant increase in the 1AD duration through the amplitude and frequency analysis. Another relevant finding was the larger individual 1AD duration in the left hippocampus (LH) when compared to the RH. The 1AD frequency content progressively increased during the kindling process and the highest frequencies were only reached when the behavioral seizures appeared. During the 1AD, fast transients (ripples) were registered superposed to slower waves in both hippocampi. At the end of the 1AD, transients around the 80Hz frequency band were registered in most cases simultaneously to correlation losses between both hippocampi. The data from this experiment support a key role of the high frequency discharges and the contralateral hippocampus in the mesial temporal epileptogenesis. The hypothesis of an endogenous anticonvulsive system is reinforced and its action may be related to the 80Hz frequency transients.

Key-words: hippocampal kindling, temporal epilepsy, experimental model.

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia constitui uma das patologias cerebrais mais frequentes no mundo (ENGEL Jr., 1995, p. s23-s29) e acomete cerca de 1 a 2% da população (GRANIERI apud JACKSON, 1994, p. s2-s13). Em se analisando a distribuição topográfica, constata-se que sua apresentação é uniforme, sendo maior nos países em desenvolvimento. A incidência anual varia de 20 a 70 casos por 100 mil habitantes (SHORVON, 1992, p.3-13) e a prevalência é de aproximadamente 15 a 18 pessoas para cada mil (VOLCY GÓMEZ, 2004, p.663-667). Dados nacionais revelam que a prevalência da epilepsia na região metropolitana de São Paulo é de 11,9 por mil habitantes (MARINO Jr., CUKIERT E PINHO, 1986, p 243-254) e em Porto Alegre foram encontradas taxas de 16,5 e 20,3 por mil habitantes, respectivamente, para epilepsias ativas e inativas (FERNANDES et al, 1992, p.132).

Dentre os inúmeros tipos de epilepsia, destaca-se a epilepsia do lobo temporal (ELT), pois é a forma mais frequentemente encontrada em adultos. Ao redor de 50% dos pacientes adultos com epilepsia apresentam ELT (COMMISSION, 1989, p. 389-399). A causa mais comum da ELT é a esclerose mesial temporal (EMT), a qual pode também ser designada como esclerose hipocampal (EH) ou do corno de Amon. A EMT representa 60 a 70% dos casos de ELT (WATSON, 1992, p.1743-1750) e histologicamente é caracterizada por perda neuronal e gliose na região mesial do lobo temporal (LT), principalmente no hipocampo e também em estruturas como uncus e amígdala (FALCONER e TAYLOR, 1968, p.353-361).

A epilepsia do lobo temporal (ELT) apresenta alta taxa de refratariedade clínica. Com a terapia farmacológica, consegue-se o controle pleno dos eventos ictais (na ETM)

em cerca de 20% a 40% dos casos (COMMISSION, 1989, p. 389-399; SEMAH et al. 1998, p. 1256-1262; VOLCY GÓMEZ, 2004, p.663-667). Nos pacientes com indicação, a microcirurgia (ressecção das áreas epileptogênicas) representa uma alternativa terapêutica podendo controlar as crises epiléticas em 67 a 85% dos casos, restando uma substancial população de pacientes ainda refratária ao tratamento (MORRELL; WHISLER; BLECK, 1989, p. 231-239; VOLCY GÓMEZ, 2004, p.663-667). Outras modalidades terapêuticas têm sido pesquisadas a fim de se aumentar o arsenal terapêutico não-ablativo e minimizar o grau de invasão cirúrgica. Dentre elas destaca-se o tratamento da ELT por meio da estimulação elétrica cerebral (EEC). A EEC é fonte de constantes pesquisas, pois representa um método não-ablativo e minimamente invasivo se comparado à microcirurgia atual. Apresenta, entretanto, eficácia significativamente inferior à microcirurgia. Acredita-se que isto ocorra devido ao fato de não se ter, ainda, estabelecido parâmetros elétricos ideais de estimulação (BENABID et al., 2002, p. 1385-91; COOPER et al., 1977, p. 203-205; GEORGE; SALINSKY; KUZNIECKY et al., 1994, p. 637-643; LODDENKEMPER et al., 2001, p. 514-532; THEODORE; FISHER, 2004, p. 111-118).

1.1 JUSTIFICATIVA

Na busca do aprimoramento dos parâmetros para a EEC é primordial se compreender mais detalhadamente o processo da epileptogênese na EMT. Com este intuito empregou-se sistemas computacionais avançados (*Spike2* e *Matlab* 6.5) no estudo do modelo animal de *kindling* hipocampal dorsal buscando melhor detalhar os fenômenos que ocorrem no estabelecimento das crises epiléticas .

1.2 OBJETIVOS

- A) Estudar a utilização do sistema computacional *Spike2* na confecção e análise do modelo de *kindling* hipocampal dorsal em ratos Wistar.
- B) Estudar a utilização do sistema computacional *Matlab* 6.5 na análise do EEGI obtido através do modelo de *kindling* hipocampal dorsal em ratos Wistar.
- C) Fornecer substrato para que haja melhor compreensão da fenomenologia que leva à epilepsia no modelo de *kindling* hipocampal dorsal em ratos Wistar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ELETROFISIOLOGIA DAS DESCARGAS ICTAIS

A gênese e propagação das ondas epiléticas têm sido amplamente estudadas para a melhor compreensão dos fenômenos ictais (GOLOMB; AMITAI, 1997, p. 78; JERGER; SCHIFF, 1995, p. 876-879; KNOTT et al., 2000, p. 22; KNOTT et al., 1999, p. 538; KNOTT et al., 1999, p. 539; TRAUB; JEFFERYS, 1994, p. 281-285; TRAUB, 2001, p.153-170). A descarga ictal se inicia com os chamados potenciais paroxísticos de despolarização (PPD). Os PPD são respostas elétricas sincrônicas estereotipadas produzidas pelos neurônios de um foco epilético. Os PPD se dão por meio de despolarizações repentinas, com grande amplitude e duração prolongada. Eles culminam com os potenciais de ação e são seguidos por um período de hiperpolarização. Quando os PPD atingem o limiar convulsivógeno eles se espalham para extensas áreas cerebrais produzindo a crise convulsiva (ASCHENBRENNER-SCHEIBE et al., 2003, p. 2616-2626; DITTRICH et al., 2003, p. A8; LOTHMAN, 1993, p. 93-112; MAIWALD et al., 2004, p. 357-368; WINTERHALDER et al., 2003, p. 318-325).

Além dos PPD, há outros pontos importantes quanto à dinâmica da rede neuronal no fenômeno ictal. A sincronização e o recrutamento neuronais desempenham um papel chave na transição do estado interictal para o estado ictal. Ambos contribuem para a gênese e propagação das descargas epileptogênicas (ASCHENBRENNER-SCHEIBE et al., 2003, p. 2616-2626; DITTRICH et al., 2003, p. A8; MAIWALD et al., 2004, p. 357-368; WINTERHALDER et al., 2003, p. 318-325). Em contrapartida existem mecanismos que modulam o processo, a citar o acoplamento elétrico dos neurônios inibitórios na fase de

sincronização (BENNETT; ZUKIN, 2004, p. 495-511) e o papel de células gliais na modulação excitatória (DOUGLAS FIELDS; STEVENS-GRAHAM, 2002, p. 556-562).

Por meio do registro eletroencefalográfico de escalpe (EEG) ou pelo invasivo (EEGI) é possível mapear tanto o foco epileptogênico como suas vias de propagação (BOVEN; AERTSEN, 1990, p. 53-56, DIEMANN; GEWALTIG; AERTSEN, 1999, p. 529-533, GEWALTIG; DIEMANN; AERTSEN, 2001, p. 657-673; KNOTT et al., 2000, p. 22; MEHRING et al., 2003, p. 395-408). Podem-se, também, reconhecer as diferentes fases que compõem a gênese da descarga ictal (ASCHENBRENNER-SCHEIBE et al., 2003, p. 2616-2626; DITTRICH et al., 2003, p. A8; MAIWALD et al., 2004, p. 357-368; WINTERHALDER et al., 2003, p. 318-325). Logo o registro eletroencefalográfico pode ser utilizado, não somente para o reconhecimento de descargas ictais já instaladas, mas também para a detecção das fases que as antecedem. Estes dados sugerem haver a possibilidade de uma intervenção terapêutica antes da plena instalação dos fenômenos ictais.

2.2 O PAPEL DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL.

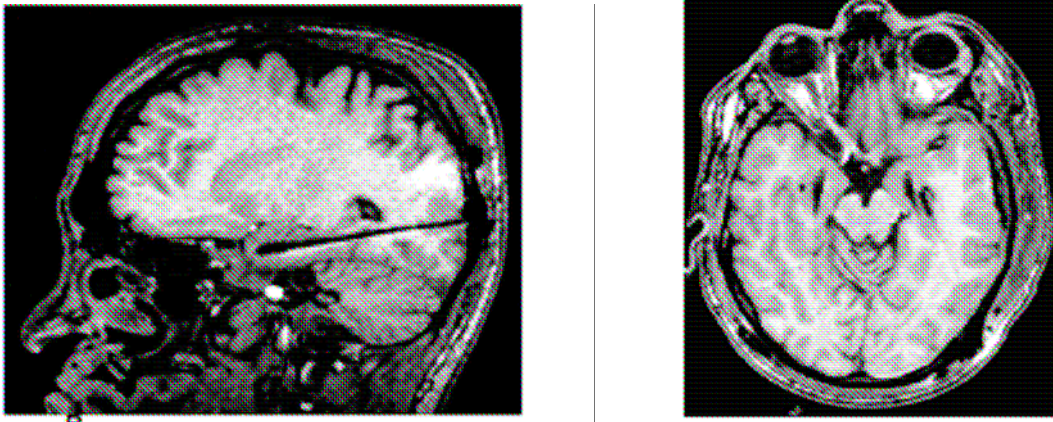
Técnicas envolvendo a estimulação elétrica cerebral (EEC) têm sido constantemente pesquisadas e sucessivos avanços têm sido obtidos. Não há, entretanto, consenso quanto ao seu uso e altos índices de eficácia não foram, até então, atingidos (BENABID et al., 2002, p. 1385-91; COOPER et al., 1977, p. 203-205; GEORGE; SALINSKY; KUZNIECKY et al., 1994, p. 637-643; LODDENKEMPER et al., 2001, p. 514-532; THEODORE; FISHER, 2004, p. 111-118).

O advento da EEC é embasado no desenvolvimento dos modelos de rede neural

capazes de simular a propagação de ondas epiléticas. Nestas redes a intervenção elétrica é inicialmente avaliada. Os testes são executados sistematicamente a fim de se encontrar parâmetros corretos de estimulação capazes de suprimir a atividade ictal induzida na rede. Os estímulos elétricos utilizados em modelos experimentais de rede neuronal consistem de pulsos de diferentes frequências, intensidades, polaridades e formas de onda, bem como de sinais não periódicos (BOVEN; AERTSEN, 1990, p. 53-56; DIESMANN; GEWALTIG; AERTSEN, 1999, p. 529-533; GEWALTIG; DIESMANN; AERTSEN, 2001, p. 657-673; KNOTT et al., 2000, p. 22; MEHRING et al., 2003, p. 395-408).

Após os testes em redes neurais, a intervenção com correntes elétricas é testada em modelos animais a fim de se modular os estímulos buscando o aperfeiçoamento dos parâmetros. Uma vez encontrados parâmetros mais ajustados, pôde-se iniciar a utilização da EEC em pacientes com epilepsia temporal mesial refratária e em outros tipos de epilepsia focal (BOON, P. et al., 2007, p. 1551-60, LODDENKEMPER et al., 2001, p. 514-532; THEODORE; FISHER, 2004, p. 111-118; VELASCO et al., 2000, p. 158-169; VELASCO et al., 2001, p. 223-227; VESPER, J. et al., 2007, p. 1984-1989; VONCK et al., 2002, p. 556-565; ZUMSTEG; LOZANO; WENNBERG, 2006, p. 1958-62) (Figuras 1 e 2).

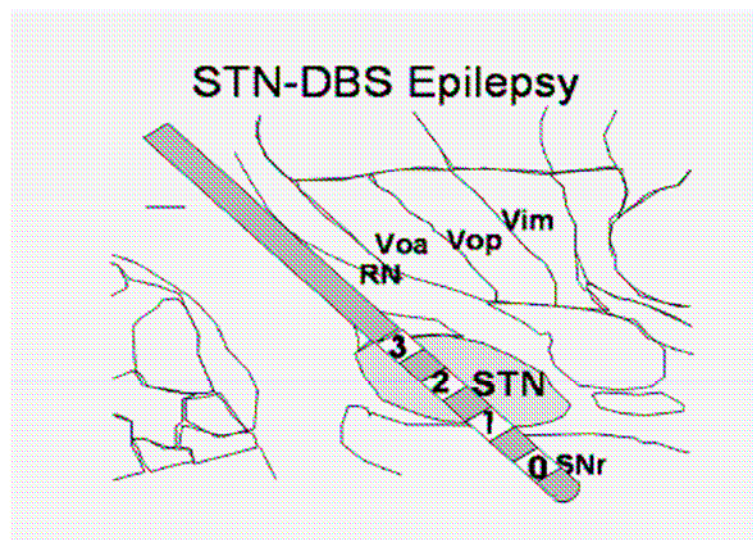
FIGURA 1 – IMAGEM DE RESSONÂNCIA EVIDENCIANDO A LOCALIZAÇÃO DOS ELETRODOS PARA ESTIMULAÇÃO TEMPORAL MESIAL



FONTE: BOON, P. et al., 2007, p. 1551-60 (Reproduzido com a autorização do autor – Anexo 1)

NOTA: Utilização de estimulação crônica através de eletrodo amigdaliano e outro hipocampal para o tratamento de ELT por EMT.

FIGURA 2 – DESENHO REPRESENTANDO A LOCALIZAÇÃO DO ELETRODO PARA ESTIMULAÇÃO SUBTALÂMICA



FONTE: VESPER, J. et al., 2007, p. 1984-1989 (dados do serviço – Uniklinik Freiburg)

NOTA: Neste caso foi utilizada a estimulação subtalâmica crônica com alta frequência para o tratamento de epilepsia mioclônica progressiva. Sendo STN = núcleo subtalâmico, SNr = substância nigra, Vim = núcleo talâmico ventral intermédio, Vop = núcleo talâmico ventral oral-posterior, Voa = núcleo talâmico ventral oral-anterior e RN = núcleo reticular do tálamo. Eletrodo com seus contatos numerados de 0 a 3.

2.3 EPILEPSIA TEMPORAL: MODELO ANIMAL.

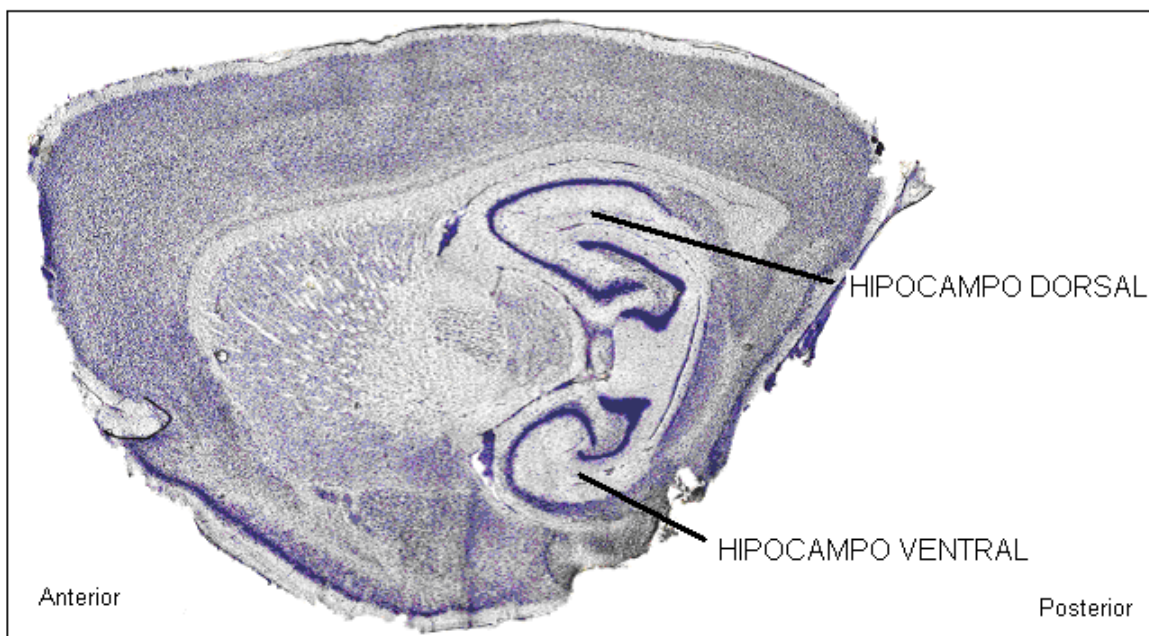
O fenômeno de *kindling* foi descrito em 1967 e desde então tem sido amplamente utilizado como modelo animal de epilepsia temporal crônica (GODDARD, 1967, p. 1020-1021). O fenômeno se instala progressivamente no animal à medida que os estímulos indutores de resposta ictal são repetidos. Os estímulos elétricos são os mais freqüentemente utilizados e são aplicados por meio de eletrodo intracerebral. A resposta habitual após a aplicação do estímulo é o desencadear de uma pós-descarga (AD) de baixa freqüência e com pouca reação comportamental relacionada. A complexidade dos eventos aumenta com o decorrer do processo, começam a aparecer as descargas de alta freqüência e intensas reações comportamentais de padrão convulsivo. É esta progressiva severidade tanto eletroencefalográfica, como comportamental, que define o fenômeno de *kindling* (GODDARD et al., 1969, p. 295-330; MCNAMARA, 1984, p. 72-76; RACINE; ROSE; BURNHAM, 1972, p.273-278). A progressão dos achados é percebida em diversas áreas cerebrais, sendo mais dramática nas estruturas do lobo temporal como o hipocampo, a amígdala e seus córtices adjacentes (perirrinal, entorrinal, piriforme e insular) (MCINTYRE, KELLY; DUFRESNE, 1999, p. 197-209).

Apesar de o estímulo ser geralmente aplicado em um local bem definido, o *kindling* não constitui um modelo de epilepsia focal parcial. À medida que as sessões de estimulação são repetidas ocorre progressivo recrutamento neuronal o que leva ao surgimento de crises parciais complexas (alteração da consciência) com generalização secundária (MCINTYRE, 1970, p. 747-753; MCINTYRE, 1979 p. 855-859). Nas fases mais avançadas do processo, as crises epiléticas surgem espontaneamente, ou seja, sem mais a necessidade da aplicação de estímulos desencadeantes (PINEL; MUCHA;

PHILIPS, 1975, p. 127-129; WADA; OSAWA, 1976, p. 273-286).

O fenômeno de *kindling* quando induzido no hipocampo, tanto ventral como dorsal (Figura 3), apresenta um perfil de crises epiléticas bastante semelhante ao elicitado no *kindling* amigdaliano. O padrão de AD, entretanto, é peculiar ao hipocampo. A sessão de *kindling* hipocampal se inicia com o estímulo elétrico, o qual é sucedido por um período de pós-descarga primária (1AD), um período relativamente silencioso e um período de pós-descarga secundária (2AD) (Figura 4). Este padrão eletroencefalográfico é característico da estimulação hipocampal, nunca sendo visto na estimulação do córtex perirrinal e excepcionalmente na amigdaliana (BURNHAM, 1975, p.417-428; GRACE; CORCORAN, 1990, p. 249-256; LEUNG, 1987, p.173-187; RACINE; ROSE; BURNHAM, 1977, p.273-278).

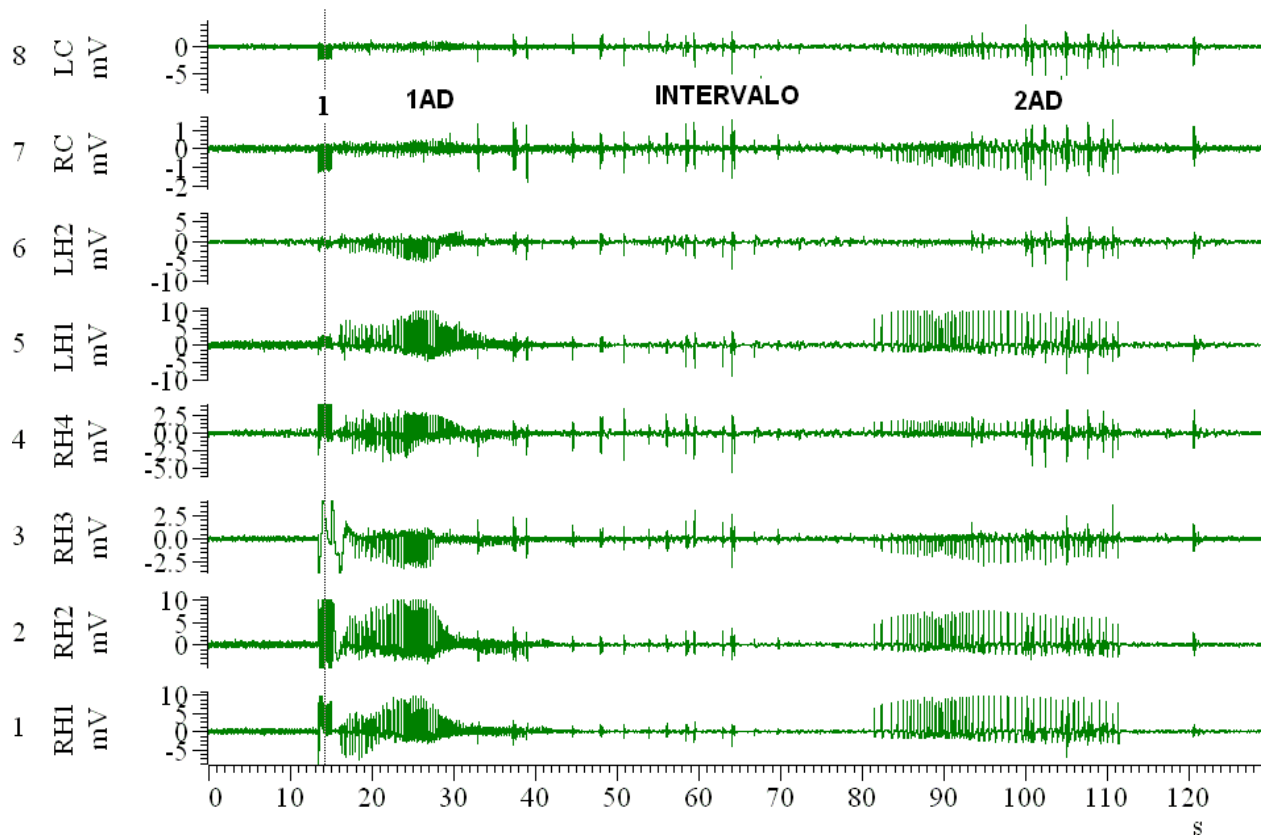
FIGURA 3 – PREPARADO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VISTA SAGITAL DO HIPOCAMPO DO RATO WISTAR



FONTE: Reproduzido e adaptado de PAXINOS; WATSON, 2007 (com permissão Anexo 2).

NOTA: Corte sagital do cérebro de rato Wistar 4,20 mm lateral à linha média.

FIGURA 4 – TRAÇADO DE EEGI COM UMA SESSÃO DE ESTÍMULO NO HIPOCAMPO DORSAL.



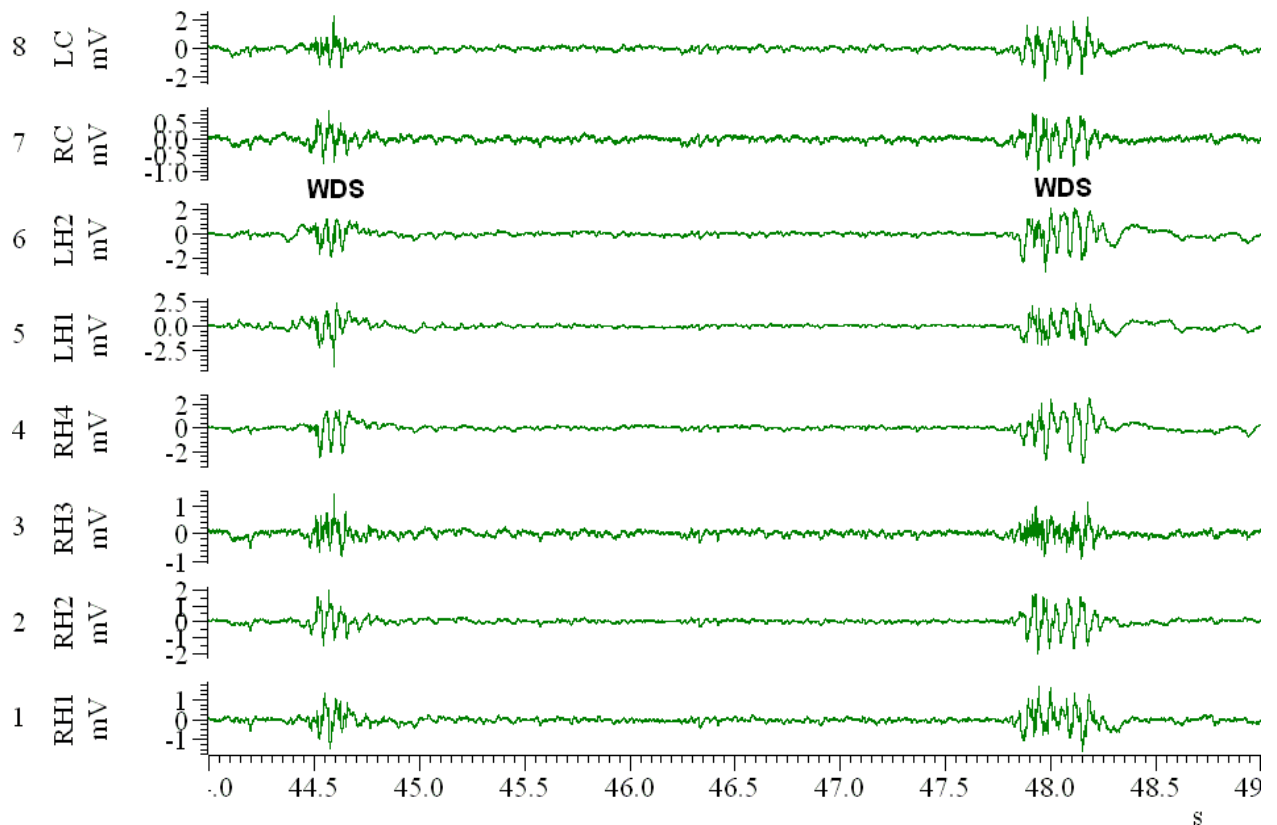
FONTE: Dados do estudo

NOTA: Neste segmento de EEGI é visualizado o padrão típico de uma sessão de *kindling* hipocampal. O cursor com o número 1 foi colocado para sinalizar o local do estímulo, 1AD é referente à pós-descarga primária. Durante o intervalo são visualizadas inúmeras WDS e então este é sucedido pela pós-descarga secundária (2AD). Os canais RH1 a RH4 são referentes ao hipocampo direito, LH1 e LH2 referentes ao hipocampo esquerdo, RC referente ao neocórtex frontal direito e LC referente ao neocórtex frontal esquerdo.

Entremeados na 1AD, intervalo ou 2AD, podem aparecer alguns eventos ictais de breve duração com fenômeno comportamental estereotipado associado. Estes eventos são nomeados *wet dog shakes* (WDS) e seu aparecimento precoce é algo bastante freqüente no *kindling* hipocampal. As WDS podem ocorrer repetidamente em cada sessão e em geral elas precedem o aparecimento das crises epiléticas

motoras, sendo inclusive descrito na literatura uma correlação inversa entre o número de WDS por sessão e o surgimento das crises epilépticas generalizadas (Figura 5).

FIGURA 5 – SEGMENTO DO TRAÇADO DE EEGI DE UMA SESSÃO DE *KINDLING* COM O PADRÃO DE DUAS WDS.



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Neste segmento de EEGI são visualizadas duas WDS, devido à sua curta duração e maior amplitude (aos 44,5 e 48 segundos do traçado). Os canais RH1 a RH4 são referentes ao hipocampo direito, LH1 e LH2 referentes ao hipocampo esquerdo, RC referente ao neocórtex frontal direito e LC referente ao neocórtex frontal esquerdo.

O traçado de EEGI pode ser analisado segundo inúmeras variáveis como morfologia, amplitude e frequência das ondas. Já o padrão comportamental (crises epiléticas) pode ser analisado utilizando-se a escala de Racine a escala de Pinel e Rovner, sendo que esta complementa aquela (Tabela 1). A escala de Racine apresenta cinco estágios. O primeiro é atribuído às crises oro-alimentares. No segundo estágio o animal apresenta movimentos repetidos de flexo-extensão da cabeça (*head nodding*). No terceiro estágio é visualizado clônus em um ou ambos os membros anteriores (*forelimb clonus*). O quarto estágio é marcado pela extensão dorsal do animal (*rearing*) e o quinto por perda do equilíbrio e queda. A escala de Pinel e Rovner acrescenta mais três estágios à classificação de Racine, sendo o sexto quando o animal apresenta quedas repetidas. O sétimo estágio é aplicado quando o animal apresenta violentos pulos ou corridas em círculo e o oitavo quando o animal apresenta violentos pulos ou corridas em círculo acrescidas de período de tónus (PINEL; ROVNER, 1978, p.190-202; RACINE, 1972, p. 281-294).

TABELA 1 – ESCALA COMPORTAMENTAL DE RACINE PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS E ESCALA COMPORTAMENTAL DE PINEL E ROVNER

<u>Escala Comportamental de Racine</u>	
Estágio	Comportamento
1	movimentos oro-alimentares
2	flexo-extensão repetida da cabeça (<i>head nodding</i>)
3	clônus de membro anterior
4	extensão dorsal (<i>rearing</i>)
5	perda do equilíbrio e queda
<u>Escala Comportamental de Pinel e Rovner</u>	
Estágio	Comportamento
6	quedas repetidas
7	pulos e corridas em círculo violentos
8	estágio sete acrescido de período de tônus

FONTE: PINEL; ROVNER, 1978, p.190-202; RACINE, 1972, p. 281-294.

NOTA: Escala comportamental de Pinel e Rovner agrega três estágios posteriores ao grau cinco de Racine.

2.4 NEUROESTIMULAÇÃO NA ELT: ESTUDOS EM HUMANOS.

Técnicas envolvendo a neuroestimulação elétrica para a supressão de crises epiléticas têm sido pesquisadas durante os últimos 30 anos. A aquisição do controle pleno, entretanto, raramente foi atingida. Isto pode ser devido à estimulação realizada em áreas não tão precisamente delimitadas ou à estimulação em um momento diferente do início da atividade ictal (BENABID et al., 2002, p. 1385-91; COOPER et al., 1977, p. 203-205; GEORGE; SALINSKY; KUZNIECKY et al., 1994, p. 637-643; LODDENKEMPER et al., 2001, p. 514-532; THEODORE; FISHER, 2004, p. 111-118).

Estímulos elétricos podem conduzir à supressão das descargas ictais em modelos experimentais. São necessários, entretanto, mais estudos a fim de se encontrar melhores

parâmetros elétricos tanto para a inibição da atividade ictal quanto para o controle das fases que a precedem (sincronização e recrutamento) (LESSER et al., 1999, p. 2073-2081; MOTAMEDI et al., 2002, p. 836-846; VELASCO et al., 2000, p. 158-169; VONCK et al., 2002, p. 556-565). A epilepsia temporal refratária pode ser controlada pela utilização da estimulação elétrica contínua dos focos epilépticos hipocampais ou amigdalianos (VELASCO et al., 2000, p. 158-169; VELASCO et al., 2001, p. 223-227; VONCK et al., 2002, p. 556-565). Para tal fim, é necessário o implante de dispositivos cerebrais que gerem e transmitam uma corrente elétrica ininterrupta. Estes dispositivos são controlados por programas computacionais especialmente desenvolvidos (CHAPIN; MOXON, 2000; LITT; ECHAUZ, 2002, p. 22-30). Além da forma de estimulação (contínua ou intermitente), também é relevante a topografia onde o estímulo é empregado. Estímulos elétricos confinados ao foco epiléptico e suas adjacências, podem ser mais eficazes se comparados à estimulação de extensas áreas cerebrais (VELASCO et al., 2000, p. 158-169; VELASCO et al., 2001, p. 223-227; VONCK et al., 2002, p. 556-565).

A EEC pode se tornar uma opção inovadora e menos invasiva (se comparada ao tratamento microcirúrgico convencional) para o tratamento dos pacientes portadores de EMT refratários à medicação. Para os casos sem indicação cirúrgica (ou a ela refratários) são necessários mais estudos para se definir se a EEC poderá constituir um método eficaz de tratamento (LESSER et al., 1999, p. 2073-2081; MOTAMEDI et al., 2002, p. 836-846; THEODORE; FISHER, 2004, p. 111-118; VELASCO et al., 2000, p. 158-169; VELASCO et al., 2001, p. 223-227; VONCK et al., 2002, p. 556-565).

2.5 A INFORMÁTICA NO MODELO DE *KINDLING* HIPOCAMPAL DORSAL

Os avanços dos sistemas computacionais podem trazer benefícios no campo da epileptologia. O *software Spike2* quinta versão congrega um sistema de alta capacidade de captura e análise de dados, sequenciamento de estímulos e controle experimental dos impulsos cerebrais. Este *software* permite não somente a sincronia do registro eletroencefalográfico ao padrão comportamental como também permite a associação de outros *softwares* a fim de se realizar diferentes tipos de análise (*Science Products GmbH, Hofheim, Alemanha*). Dentre eles destaca-se o *Matlab* que é um *software* interativo de alto desempenho voltado para o cálculo numérico, o qual integra análise numérica, cálculo com matrizes, processamento de sinais e construção de gráficos (*The MathWorks, Natick, Estados Unidos da América*). Com a utilização conjunta destes dois *softwares* é possível se obter espectrogramas de frequência, voltagem e correlação entre os diferentes canais do EEGI.

2.6 ANÁLISE CORRELACIONAL

Correlação ou coeficiente de correlação indica a força e o sinal de uma relação linear entre duas variáveis. Quando a relação é linearmente crescente, a correlação é 1, quando decrescente, a correlação é -1. Entre estes extremos estão os valores intermediários e que quanto mais próximos de -1 ou 1, mais forte a correlação entre as duas variáveis. Logo, se os valores são independentes, a correlação é zero (ANSCOMBE, 1973, p.17–21; GAYEN, 1951, p.219–247). A análise correlacional pode

ser aplicada na epileptologia a fim de se determinar o grau de semelhança morfológica das ondas pertencentes ao traçado de diferentes canais do EEGI. Aplicando-se os princípios do coeficiente de correlação, quando a semelhança morfológica tende ao máximo, diz-se que a correlação é 1 no caso de ambos os traçados com mesma polaridade (positivo ou negativo). Nos casos de semelhança morfológica tendendo ao máximo, porém com polaridades opostas (um traçado com ondas positivas e outro com ondas negativas) atribui-se -1. Quando a semelhança morfológica é mínima atribui-se o valor zero. O valor desta análise está na obtenção de dados referentes ao grau de sincronia neuronal de diferentes topografias cerebrais. Uma vez que se mapeie a sincronia neuronal, pode-se saber o grau e o momento de envolvimento das estruturas cerebrais durante as diferentes fases do processo ictal e assim melhor planejar a topografia e o momento de aplicação das medidas terapêuticas (LOPES DA SILVA, 2005, p. 1207-1214).

3 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 12 ratos Wistar com 250 a 350 gramas no momento do implante dos eletrodos e de ambos os sexos. Os animais foram obtidos através da Universidade Clínica de *Freiburg* e seu emprego foi aprovado pelo comitê de ética e estatuto experimental para modelos animais da mesma. Os ratos foram alojados individualmente durante todo o experimento em recipientes plásticos transparentes, sob um ciclo diário alternando 12 horas com luz (diurno) e 12 sem luz (noturno). Todos os experimentos foram realizados em mesmo horário e durante o ciclo diurno. O aporte de ração e água foi *ad libitum*. Optou-se por este número a fim de se validar os resultados obtidos considerando as possíveis diferenças individuais e levando-se em conta que habitualmente existe uma parcela de animais que não completa o processo.

3.1.1 Critérios de inclusão

Os critérios para inclusão no estudo foram:

- a) Ratos Wistar adultos jovens não-gestantes.
- b) Peso entre 250 e 350 gramas no momento do implante.
- c) Resposta eletroencefalográfica adequada após o primeiro estímulo, ou seja, pós-descarga primária, intervalo, pós-descarga secundária e WDS.

3.1.2 Critérios de exclusão

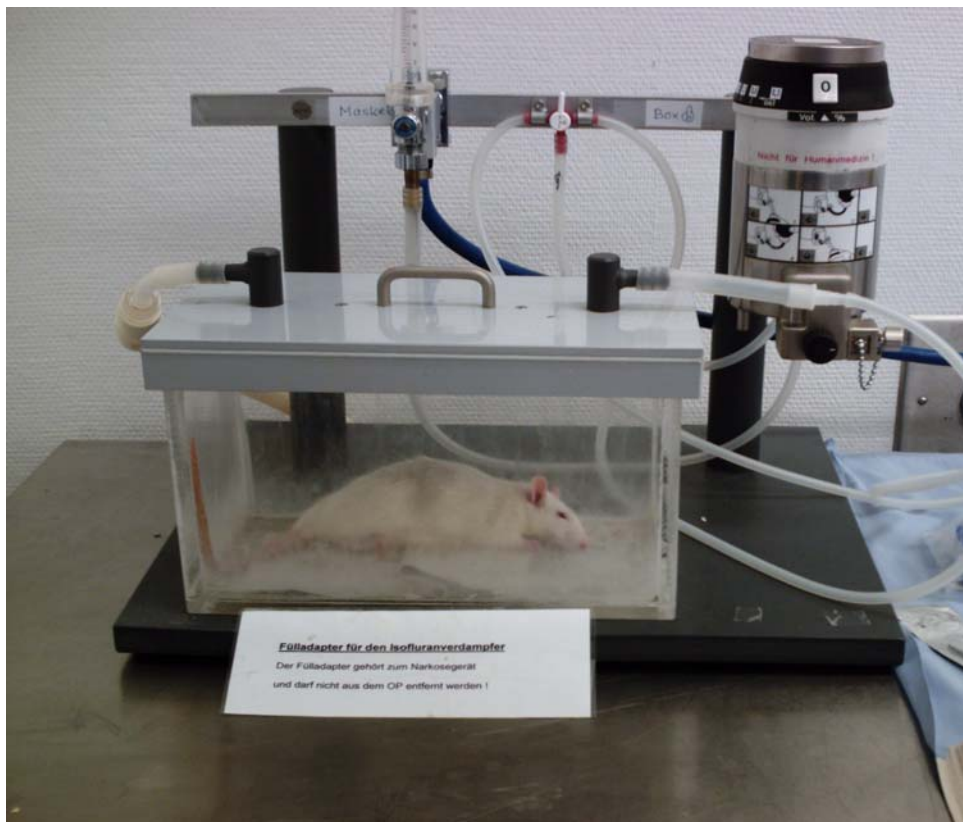
Foram excluídos três ratos os quais apresentaram problemas técnicos com os

eletrodos e não conseguiram completar o processo de *kindling*. Desta forma, restaram nove ratos a serem estudados.

3.2 PREPARACAO DO ANIMAL

Cada rato foi colocado em uma câmara anestésica com isofluorano a 2% e oxigênio e após a indução, pesado. Em seguida foram administrados (por via intraperitoneal) quetamina 10% à dose de 0,001ml por grama de peso e xilosina 2% à dose de 0,0001 ml por grama de peso. (Figura 6)

FIGURA 6 – FOTOGRAFIA DA CÂMARA PARA A INDUÇÃO ANESTÉSICA COM ISOFLUORANO.

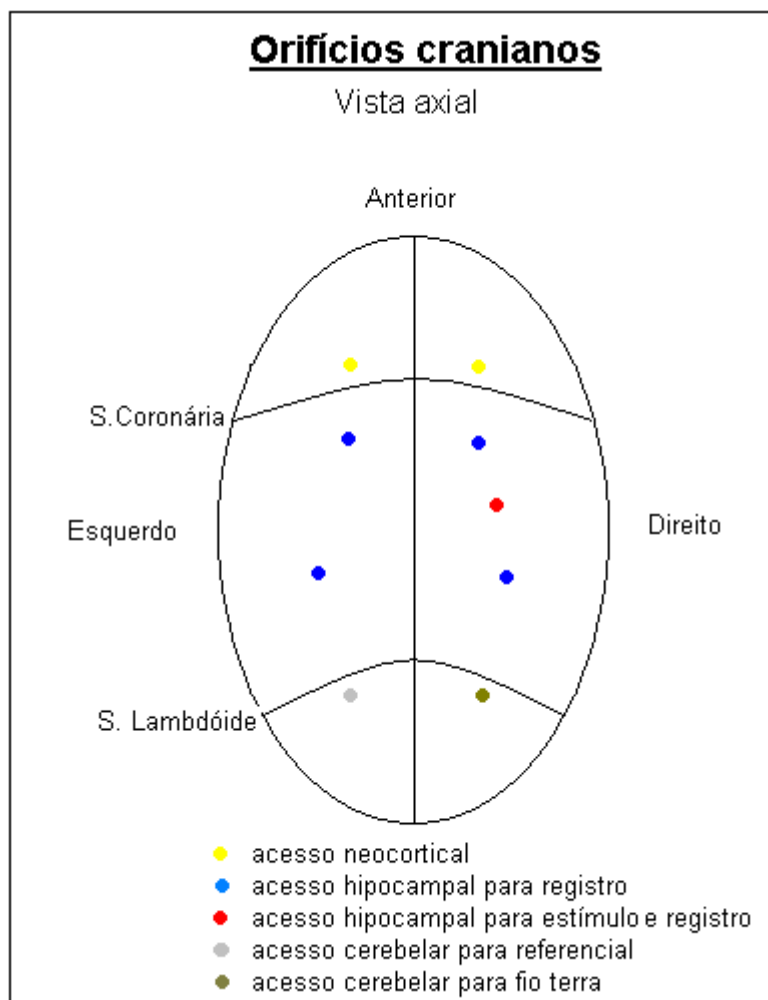


FONTE: Dados do estudo

Após o procedimento anestésico foi realizada a tricotomia da cabeça e a colocação

do rato no aparelho de estereotaxia modelo 930 próprio para ratos (da empresa David Kopf Instruments, Tujunga, Estados Unidos da América). Após a anti-sepsia com solução alcoólica, foi feita uma incisão longitudinal mediana fronto-occipital para a exposição do crânio. Após o afastamento do pericrânio procedeu-se com a identificação do bregma (utilizando-se magnificação óptica por microscópio cirúrgico). Baseado nas coordenadas estereotáticas para a formação hipocampal dorsal (PAXINOS; WATSON, 2007), foram realizados os orifícios cranianos (figura 7).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DOS LOCAIS ONDE FORAM REALIZADOS OS ORIFÍCIOS CRANIANOS PARA O IMPLANTE ESTEREOTÁTICO DOS ELETRODOS.

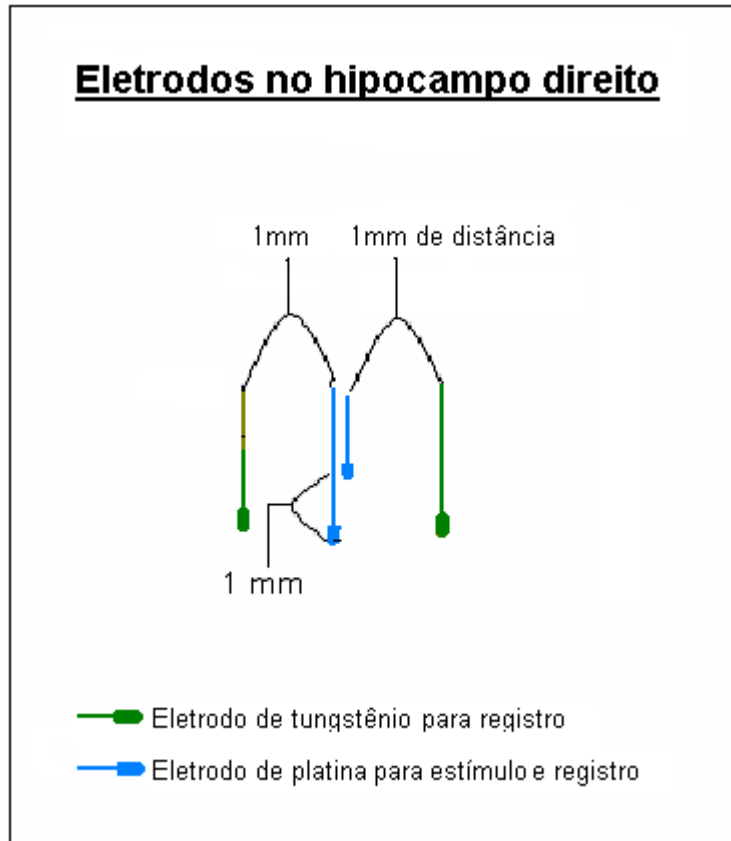


FONTE: Dados do estudo

NOTA: Nos acessos neocorticais e para registros foram implantados eletrodos simples de tungstênio. No acesso para estímulo foram implantados dois eletrodos unidos de platina.

Foram implantados dois eletrodos de platina encapados e unidos por torção (com 125 μm de diâmetro cada e impedância de $413 \pm 220 \text{ k}\Omega$ a 10 Hz) no hipocampo dorsal direito (Y=-3,6; X=-2,4 e Z= -3,5). Foi também aplicado um eletrodo de tungstênio encapado (com 60 μm de diâmetro e impedância de $1220 \pm 544 \text{ k}\Omega$ a 10 Hz) em ambas as regiões hipocampais dorsais anteriores (Y= -2,6; X= -1,5 /+1,5 e Z= -3,2) e posteriores (Y= -4,6; X= -3,5 /+3,5 e Z= -3,4). Além dos eletrodos hipocampais foram implantados mais dois eletrodos neocorticais (frontal direito, frontal esquerdo) 1mm à frente da sutura coronária e o eletrodo referencial sobre o cerebelo à esquerda 1mm posterior à sutura lambdóide. (Figuras 8 a 11) Em seguida foi implantado um parafuso com fio para a terra sobre o cerebelo à direita 1mm posterior à sutura lambdóide. Em seguida realizou-se a fixação do implante ao crânio (cimento odontológico e seis parafusos) com união dos eletrodos ao conector para sistema de múltiplos canais.

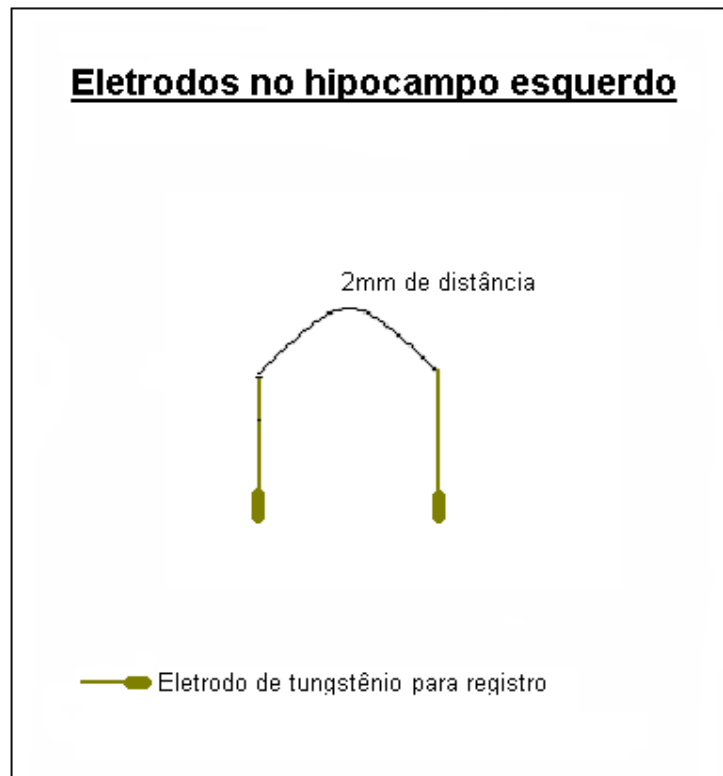
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DOS ELETRODOS IMPLANTADOS NO HIPOCAMPO DORSAL DIREITO



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Os eletrodos de tungstênio foram utilizados para registros. Os eletrodos de platina foram utilizados para estimulação e registro.

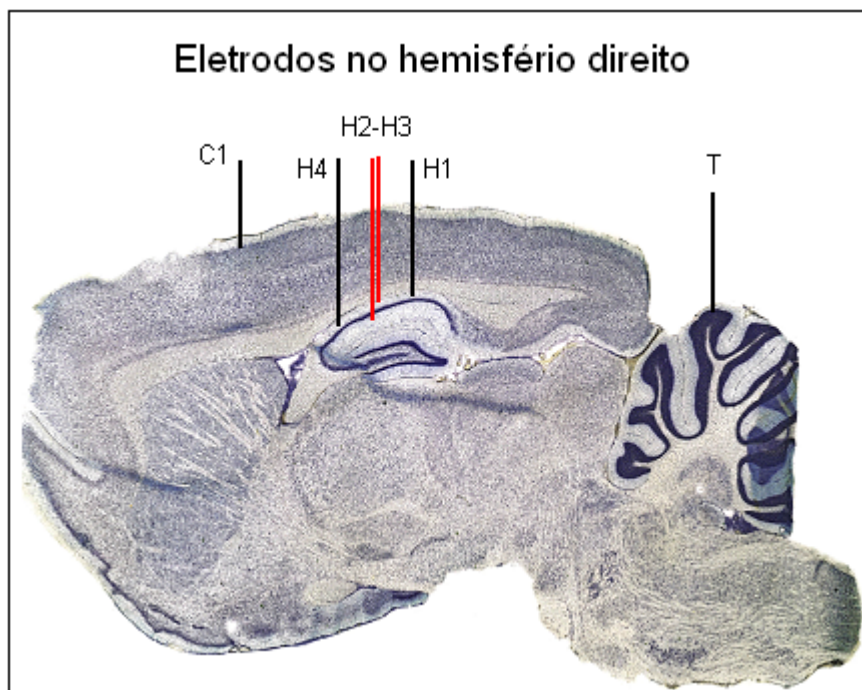
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DOS ELETRODOS IMPLANTADOS NO HIPOCAMPO DORSAL ESQUERDO



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Os eletrodos de tungstênio foram utilizados para registros.

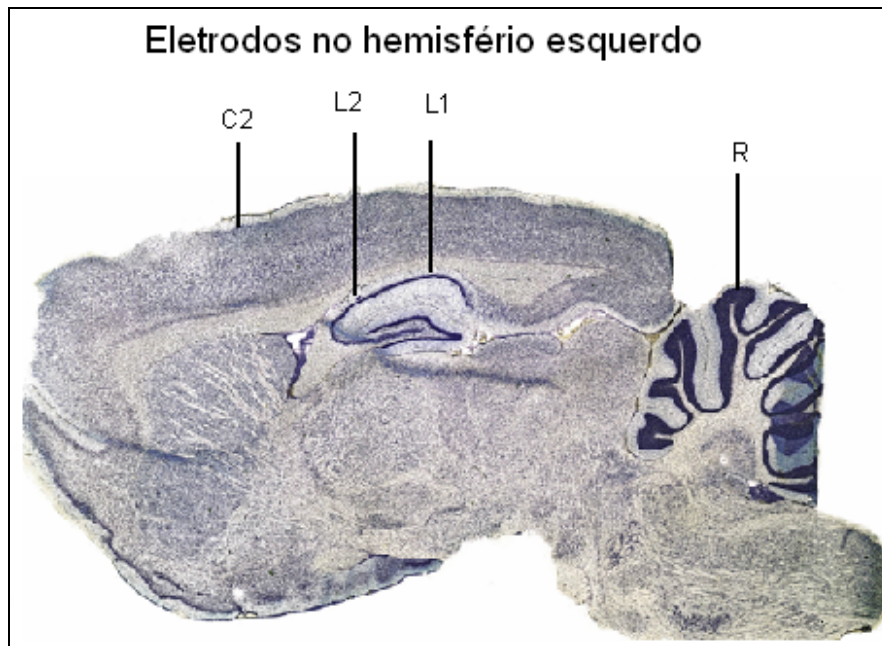
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA EM CORTE SAGITAL DO CÉREBRO DOS LOCAIS DE IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS NO HEMISFÉRIO DIREITO.



FONTE: Reproduzido e adaptado (com autorização – Anexo 2) de PAXINOS; WATSON, 2007.

NOTA: Vista sagital do cérebro do rato Wistar a 2,40 mm lateral à linha média, sendo C1 o eletrodo implantado no neocórtex frontal direito, T fio terra, H1 eletrodo monopolar de tungstênio na região hipocampal dorsal mais posterior, H2-H3 eletrodo bipolar de platina na região hipocampal dorsal intermediária e H4 eletrodo monopolar de tungstênio na região hipocampal dorsal mais anterior.

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA EM CORTE SAGITAL DO CÉREBRO DOS LOCAIS DE IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS NO HEMISFÉRIO ESQUERDO.



FONTE: Reproduzido e adaptado (com autorização – Anexo 2) de PAXINOS; WATSON, 2007.

NOTA: Vista sagital do cérebro do rato Wistar a 2,40 mm lateral à linha média, sendo C2 o eletrodo implantado no neocórtex frontal esquerdo, R eletrodo monopolar referencial de tungstênio, L1 eletrodo monopolar de tungstênio na região hipocampal dorsal mais posterior e L2 eletrodo monopolar de tungstênio na região hipocampal dorsal mais anterior.

3.3 CAPTAÇÃO E PROCESSAMENTO DOS DADOS

O conector implantado na cabeça do rato foi conectado ao pré-amplificador MPA8I (da empresa *Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemanha*). Este, por sua vez, foi ligado ao amplificador de sinal PGA32 (da empresa *Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemanha*) com ampla banda de frequência e ganho programável. O PGA32 foi acoplado

a um conversor analógico-digital CED Power1401 (da empresa *Cambridge Electronic Design, Cambridge, Inglaterra*). Este conversor foi conectado (via *USB*) a um computador com processador de 3 GHz e 1GB de memória RAM. Foi utilizado o *software Spike2* quinta versão para receber os impulsos cerebrais transmitidos pelo conversor analógico-digital e exibi-los para a análise simultânea (Figura 12).

FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO PARA O REGISTRO DO EEGI



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Conversor analógico-digital CED Power1401 (da empresa *Cambridge Electronic Design, Cambridge, Inglaterra*).

As manifestações comportamentais foram simultaneamente registradas por meio de uma câmera de vídeo digital *Panasonic NV-MX300* (da empresa *Matsushita Electric Industrial, Osaka, Japão*) com placa para computador *IEEE 1394A Firewire TR-1394W* (da empresa *Tekram, Ratingen, Alemanha*). O *software Spike2* quinta versão (da *Science Products GmbH, Hofheim, Alemanha*) foi utilizado para a sincronização do traçado de EEGI (de oito canais) com o registro de vídeo em tempo real no monitor do computador. (Figura 13)

FIGURA 13 – FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE REGISTRO SIMULTÂNEO DO TRAÇADO DE EEGI E PADRÃO COMPORTAMENTAL.



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Registro de EEGI de uma sessão de *kindling* dorsal com frequência de amostragem de 10,4kHz, filtro para 1Hz a 5kHz e amplificação de 500 vezes acoplado ao registro simultâneo do padrão comportamental a 30 imagens por segundo

3.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL

Com o intervalo de uma semana após a cirurgia de implante, foi iniciado o processo de *kindling* no hipocampo dorsal direito dos animais. Foi aplicada uma descarga elétrica diária (cinco dias consecutivos separados por dois dias de intervalo) de 1,6 segundos de

duração composta por pulsos bifásicos retangulares com 0.4 ms de duração, ± 0.5 mA de amplitude e 60 Hz de frequência. Para a aplicação desta descarga foi utilizado o estimulador STG2008 com oito saídas independentes da empresa *Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemanha* (Figura 14). Após a descarga foram observadas a resposta neurofisiológica - através de EEGI - e a resposta comportamental - câmera de vídeo (Figura 15).

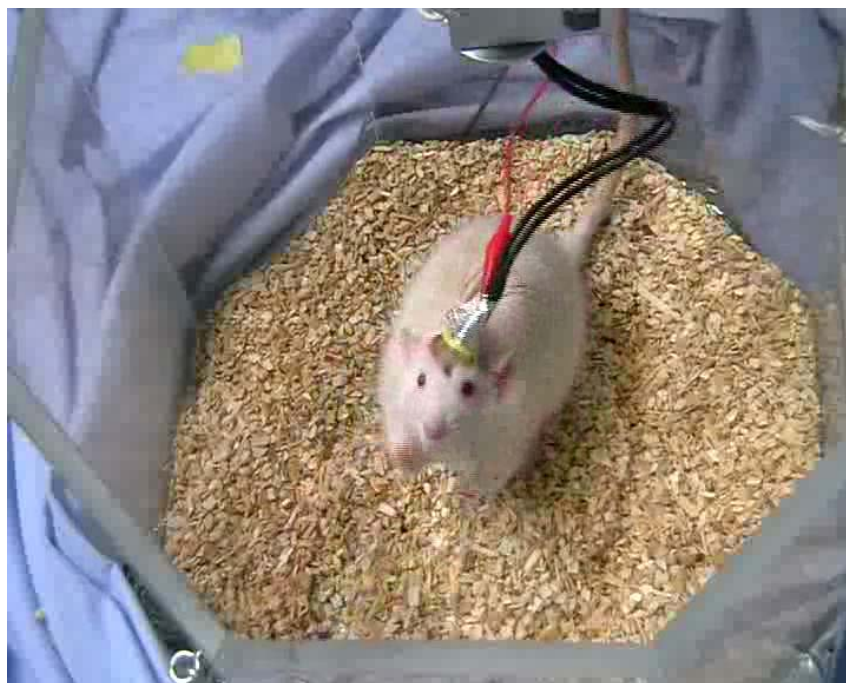
FIGURA 14 – FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO PARA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Estimulador STG2008 com oito saídas independentes da empresa *Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemanha*

FIGURA 15 – REGISTRO DO PADRÃO COMPORTAMENTAL APÓS A ESTIMULAÇÃO CEREBRAL.

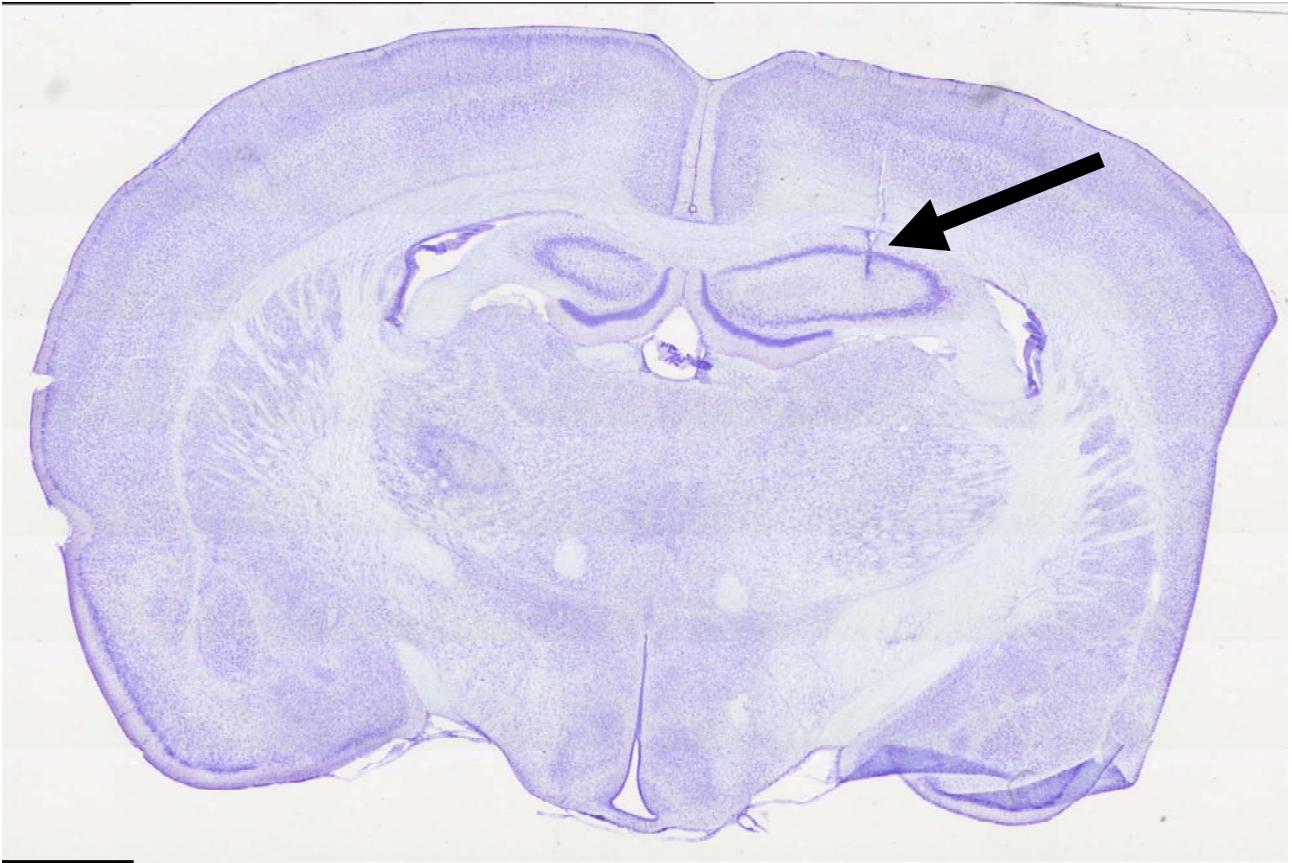


FONTE: Dados do estudo

NOTA: Registro do padrão comportamental por câmera digital (a 30 imagens por segundo). Animal apresentando clônus no membro anterior direito o que configura uma crise grau três de Racine.

As sessões foram repetidas individualmente até cada animal apresentar dez crises consecutivas com estágio mínimo cinco na escala comportamental de Racine. Uma semana após completar o processo, foi realizada a perfusão intracardíaca e o sacrifício sob narcose profunda (coquetel de quetamina 10% e xilosina 2% intraperitoneais) para estudo histológico com verificação da posição dos eletrodos implantados (Figura 16).

FIGURA 16 – FOTOGRAFIA COM O CONTROLE HISTOLÓGICO DO POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS.



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Corte coronal (50 micrômetros de espessura corado com hematoxilina-eosina) do cérebro de um rato pertencente ao experimento. A seta preta aponta para o sinal intraparenquimatoso criado pelo posicionamento prévio do eletrodo no hipocampo dorsal direito.

3.5 CRONOGRAMA

E = Implante dos eletrodos nos ratos Wistar (N=12)

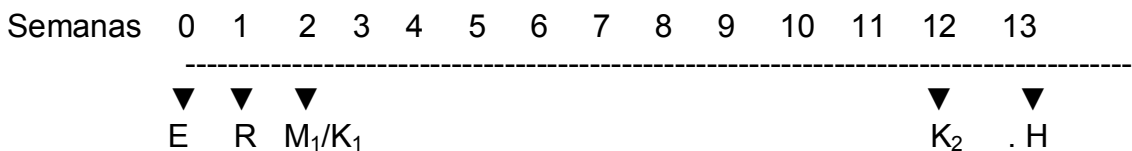
R = Recuperação pós-operatória

M = Início da monitorização do comportamento e do EEGI

K1 = Início do processo de *kindling* hipocampal

K2 = Fim do processo de *kindling* hipocampal

H = Estudo histológico



3.6 AVALIAÇÃO DO PROCESSO

3.6.1 Avaliação comportamental

O padrão de resposta comportamental promovida pela estimulação cerebral foi classificado conforme a escala de Racine e escala de Pinel e Rovner.

3.6.2 Avaliação eletroencefalográfica

O traçado de EEGI foi filtrado para as frequências de 1 Hz a 5 kHz e gravado a uma taxa de amostragem de 10.4 kHz e amplificação de 500 vezes. Simultaneamente foi filmado e registrado o padrão comportamental (30 imagens por segundo). Em seguida, o

segmento de EEGI referente a cada sessão de *kindling* foi analisado a fim de se determinar o número total de WDS, duração da 1AD e duração total de cada sessão, espectro de frequência e correlação linear entre diferentes pares de eletrodos (em intervalos não sobrepostos de 0,1 segundo).

Para a determinação dos três primeiros itens foram utilizados os critérios de amplitude e morfologia, os quais foram analisados diretamente no *software Spike2*. O padrão de frequência e correlação linear foi obtido através do *software Matlab 6.5*.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos através dos testes realizados foram apresentados como médias \pm um desvio padrão. Devido ao número de animais analisados (N=9) e ao padrão de distribuição dos dados obtidos (não normal) foram utilizados dois testes não-paramétricos. O *Mann-Whitney-U-test (U-Test)* foi utilizado para a comparação dos dados referentes a cada fase do processo de *kindling* entre si e o *Wilcoxon signed-rank test* (por ser um teste pareado) foi empregado para análise dos dados dependentes entre si. O nível de significância em ambos os testes foi de 5%. As análises foram realizadas com o *software JMP (SAS Software Corporation, Cambridge, Inglaterra)*.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS REFERENTES À POPULAÇÃO

Foram avaliados nove ratos Wistar adultos jovens (de ambos os sexos), com peso médio de 321,66 gramas, com desvio padrão (DP) de 28,83 e idade entre quatro e cinco meses no momento do implante dos eletrodos cerebrais.

5.2 SUBDIVISÃO DO PROCESSO DE *KINDLING* EM FASES.

Para fim de estudo detalhado do processo de *kindling*, o mesmo foi subdividido em sete fases (Tabela 2). Para compor D1 foi utilizada a primeira sessão de *kindling* de cada rato. O número de sessões necessárias até o surgimento da primeira crise convulsiva generalizada (de cada rato) foi dividido em quatro partes iguais, sendo que a sessão referente a cada quarto foi nomeada com D2 (para o primeiro quarto), D3 (segundo quarto), D4 (terceiro quarto) e D5 (quarto quarto), ressaltando que D5 é a sessão referente à primeira crise generalizada apresentada. D6 foi atribuído à sessão referente à quinta crise convulsiva generalizada apresentada e D7 foi atribuído à fase referente ao final do processo de *kindling*, ou seja, a sessão referente à décima crise generalizada consecutiva de grau mínimo cinco de Racine.

TABELA 2 – FASES ANALISADAS DO PROCESSO DE *KINDLING*.

D1	primeira sessão
D2	sessão referente ao primeiro quarto
D3	sessão referente ao segundo quarto
D4	sessão referente ao terceiro quarto
D5	sessão com a primeira crise convulsiva generalizada
D6	sessão com a quinta crise convulsiva generalizada
D7	sessão com a décima crise com grau mínimo 5 de Racine consecutiva (rato fully kindled)

FONTE: Dados do estudo

5.3 ANÁLISE DA RESPOSTA COMPORTAMENTAL

O padrão de comportamento após o estímulo elétrico durante cada sessão foi individualmente analisado conforme a escala de Racine e escala de Pinel e Rovner. Durante o processo de *kindling* hipocampal, cada rato apresentou a primeira crise convulsiva generalizada após uma média de 22,55 sessões, com DP de 9,18 e oito ratos chegaram ao fim do processo de *kindling* após uma média de 42,38 sessões, com DP de 8,80. Para se analisar a duração do componente comportamental generalizado de cada crise convulsiva (comportamento graus três, quatro ou cinco de Racine), utilizou-se as crises pertencentes às fases D5, D6 e D7. Em se procedendo com a análise estatística entre os valores individuais de cada fase encontrou-se uma diferença significativa entre D5 e D7 com intervalo de confiança de 95% pelo *U-Test*, sendo que em D7 a duração foi maior (Tabela 3). Esta diferença também foi observada ao se analisar as médias dos valores de cada fase (Gráfico 1).

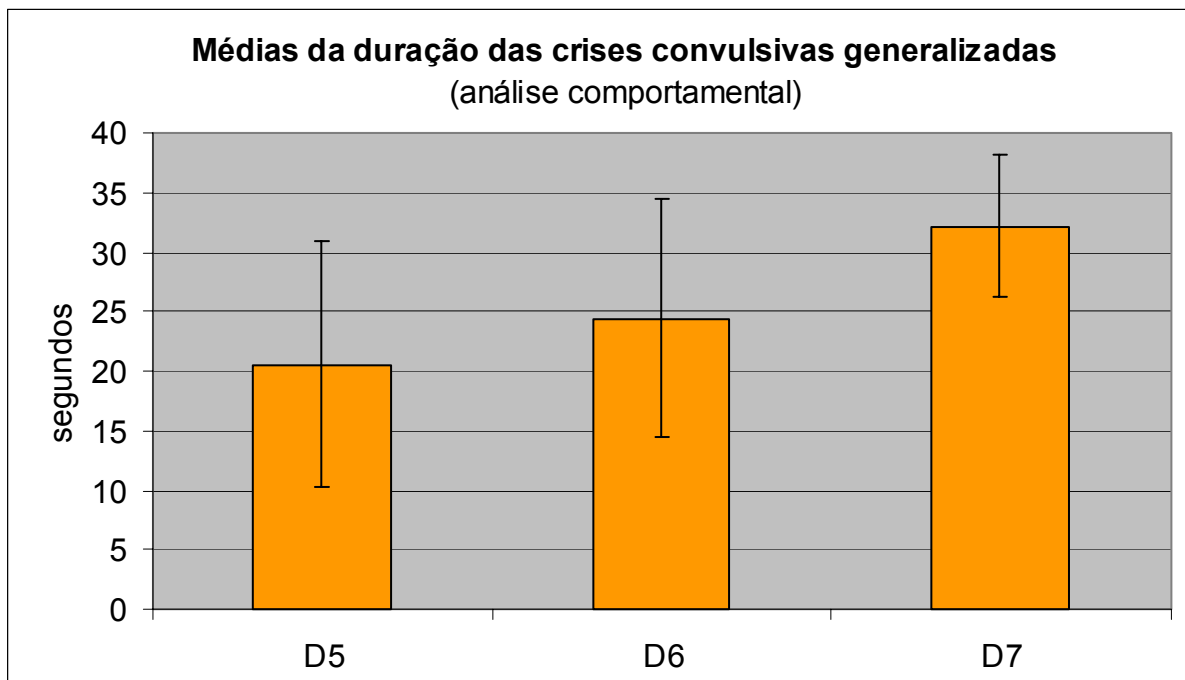
TABELA 3 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DO COMPONENTE GENERALIZADO DE CADA CRISE CONVULSIVA DAS FASES D5, D6 E D7

Fases	Rato 40	Rato 41	Rato 42	Rato 43	Rato 46	Rato 47	Rato 48	Rato 49	Rato 50	Média	DP
D5	25,8	30	25	32	6,4	11,7	14,15	8,8	31,4	20,5833	10,26554
D6	29,3	31,8	38,43	33,19	14,65	9,09	14	26,5	23,04	24,4444	9,979576
D7	36	37,2	34,9	28,9		18,9	28,32	34,07	37,19	32,1644	5,928638

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Dados expressos em segundos

GRÁFICO 1 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS GENERALIZADAS



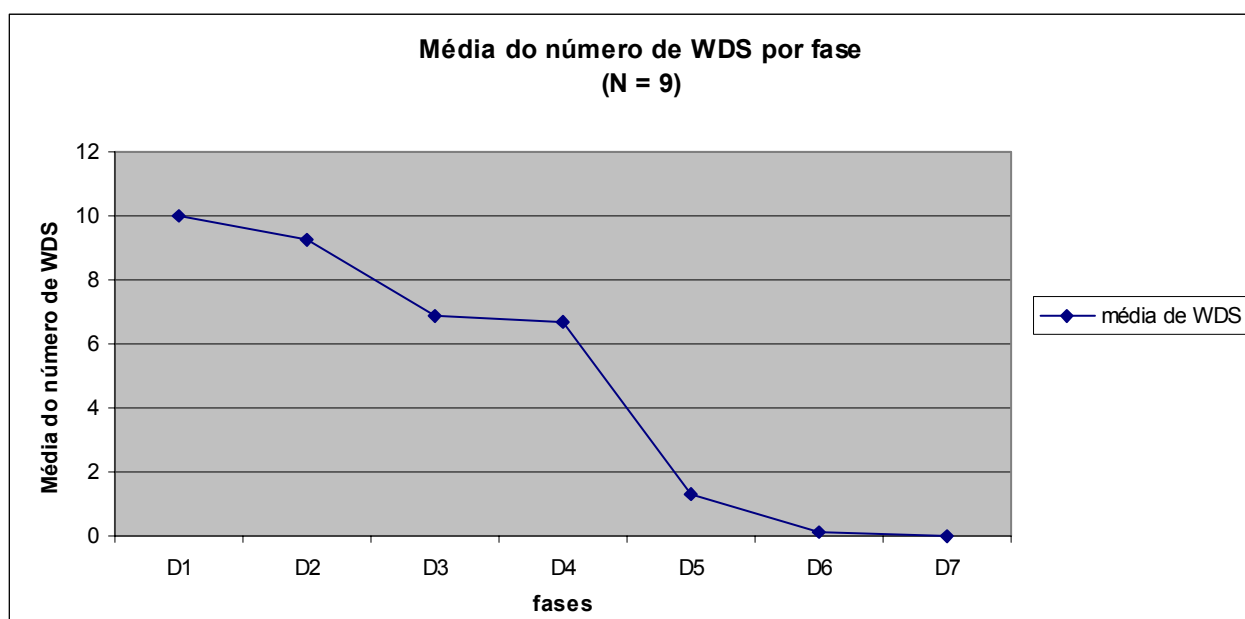
FONTE: Dados do estudo

NOTA: Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo.

5.4 Análise das WDS

O número de WDS apresentadas em cada sessão foi quantificado e verificou-se que a ocorrência das mesmas diminui no decorrer do processo de *kindling*. À medida que os estágios motores de Racine começaram a se apresentar as WDS tenderam a cair, logo, notou-se uma inversa relação entre a ocorrência das WDS e os estágios motores de Racine. Esta relação inversa foi, também, constatada ao se analisar as médias do número de WDS apresentadas em cada fase do processo (Gráfico 2). Notou-se uma queda estatisticamente significativa das mesmas após a ocorrência da primeira crise convulsiva generalizada (D5), com intervalo de confiança de 99% ao *U-Test*.

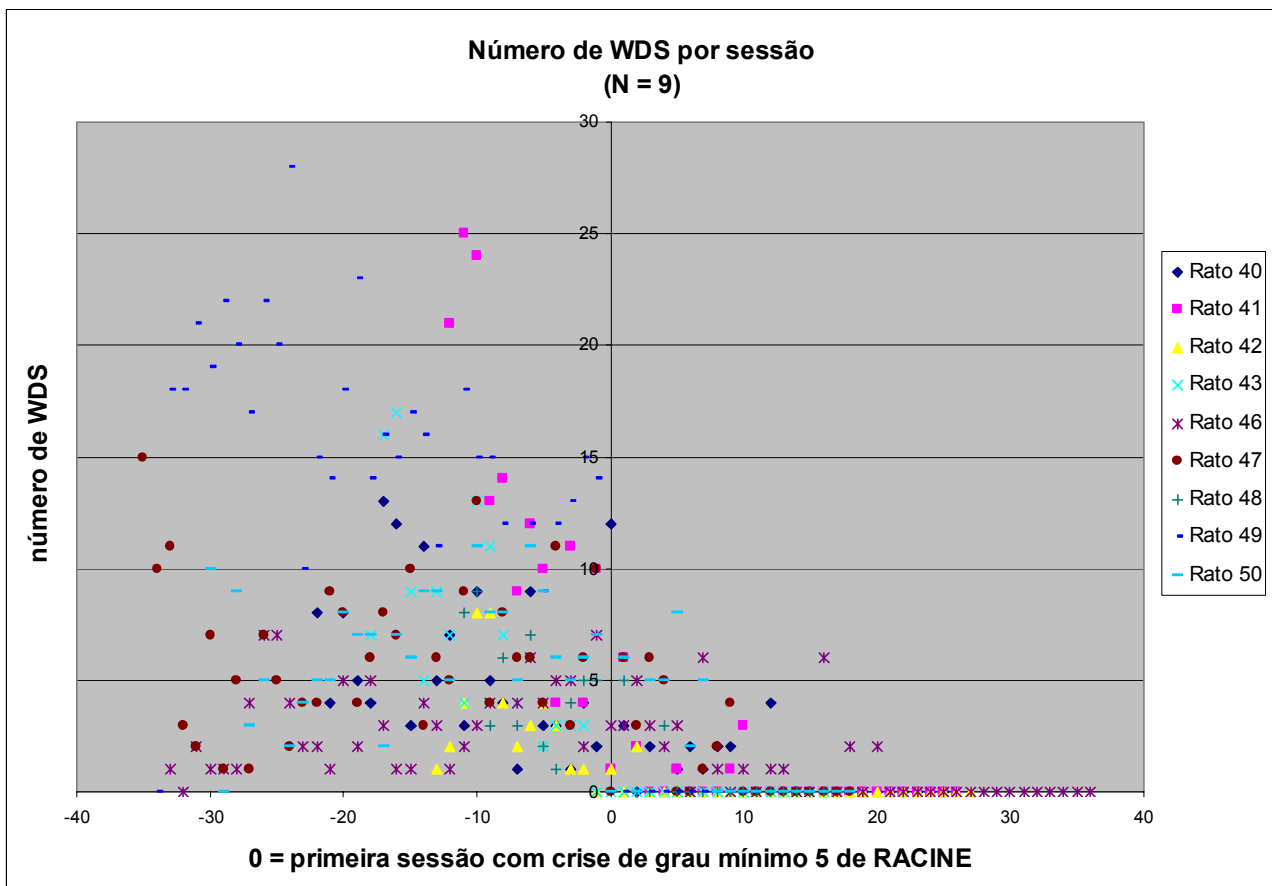
GRÁFICO 2 – MÉDIA DO NÚMERO DE WDS APRESENTADO PELO GRUPO DE RATOS EM CADA FASE DO PROCESSO DE *KINDLING*.



FONTE: Dados do estudo

A tendência individual de queda observada após a primeira crise convulsiva generalizada foi mais claramente demonstrada ao se normalizar os dados pela sessão referente à primeira crise convulsiva de grau mínimo de cinco de Racine. O gráfico de número 3 expressa o número de WDS de cada rato em cada sessão e este dado é complementado com a análise das médias do número de WDS do grupo de ratos em cada sessão (Gráfico 4).

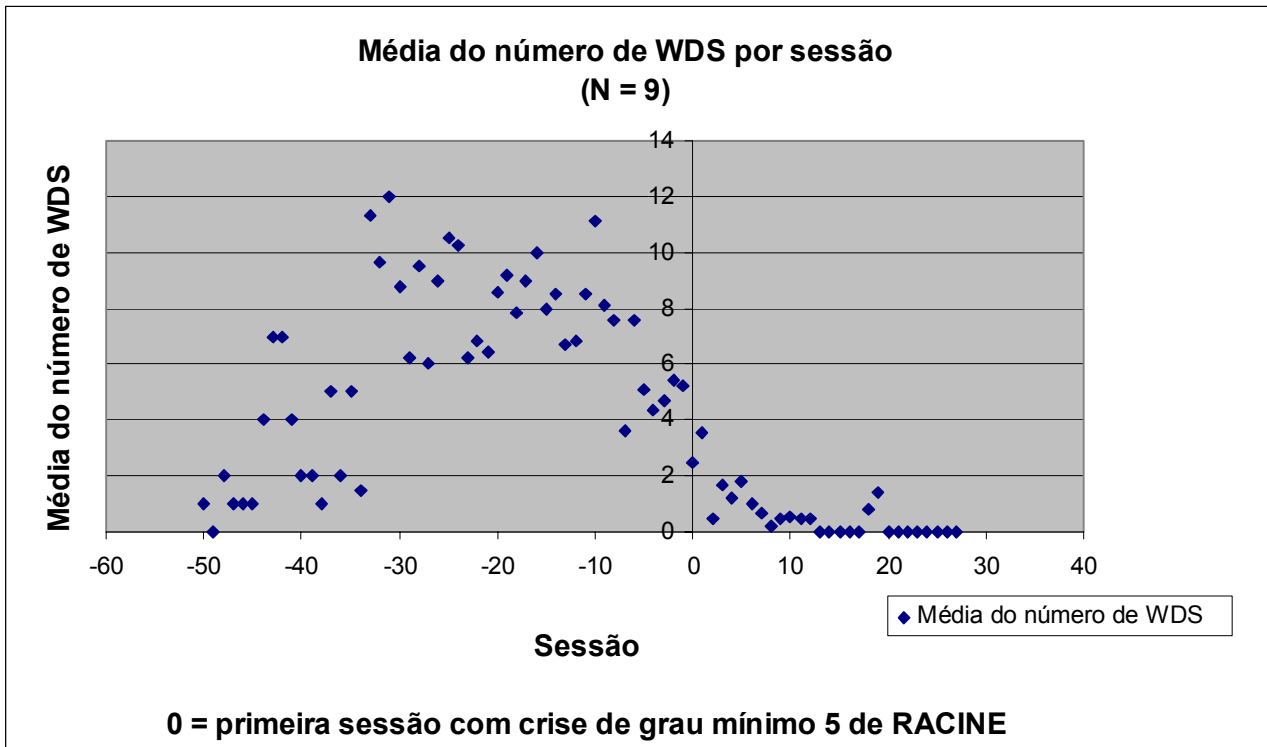
GRÁFICO 3 – NÚMERO DE WDS APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA SESSÃO DE KINDLING.



FONTE: Dados do estudo

NOTA. Gráfico normalizado pela primeira sessão contendo crise convulsiva com grau mínimo de cinco (na escala de Racine).

GRÁFICO 4 – MÉDIA DO NÚMERO DE WDS APRESENTADAS PELO GRUPO DE RATOS EM CADA SESSÃO DE *KINDLING*.



FONTE: Dados do estudo

NOTA. Gráfico normalizado pela primeira sessão contendo crise convulsiva com grau mínimo de cinco (na escala de Racine).

5.5 ANÁLISE DA DURAÇÃO DAS 1AD

Durante as 1AD a frequência e a amplitude das ondas do traçado de EEGI aumentam em relação ao traçado prévio ao estímulo, logo se utilizou destes dois parâmetros para se determinar a duração das 1AD nos hipocampus direito e esquerdo. Quando a frequência do traçado após o estímulo ultrapassou a frequência do traçado

basal (traçado prévio ao estímulo) foi marcado o início da 1AD e no momento em que a frequência retornou ao nível do traçado basal (ou menos), foi marcado o final da 1AD. O mesmo foi realizado através da análise da amplitude.

5.5.1 Análise duração das 1AD hipocampais pela frequência

A análise da duração das 1AD hipocampais foi realizada nos traçados referentes ao eletrodo do hipocampo dorsal direito posterior e hipocampo dorsal esquerdo posterior (Tabela 4). Como resultado da análise através da frequência, encontrou-se um aumento estatisticamente significativo (ao *U-Test*) da duração das 1AD no HD após a ocorrência da primeira crise convulsiva. D1 foi diferente de D5, D6 e D7 com intervalo de confiança de 95%, 99% e 95% respectivamente. D2 foi diferente de D6 e D7 com intervalo de confiança de 95% e 99% respectivamente. D3 foi diferente de D5 e D6 com intervalo de confiança de 95%. Foi, também, encontrada diferença significativa nas 1AD do HE entre D1 e D7, com intervalo de confiança de 95%. Estes dados são comparáveis à análise das médias da duração das 1AD de cada fase de ambos os hipocampos (Gráficos 5 e 6).

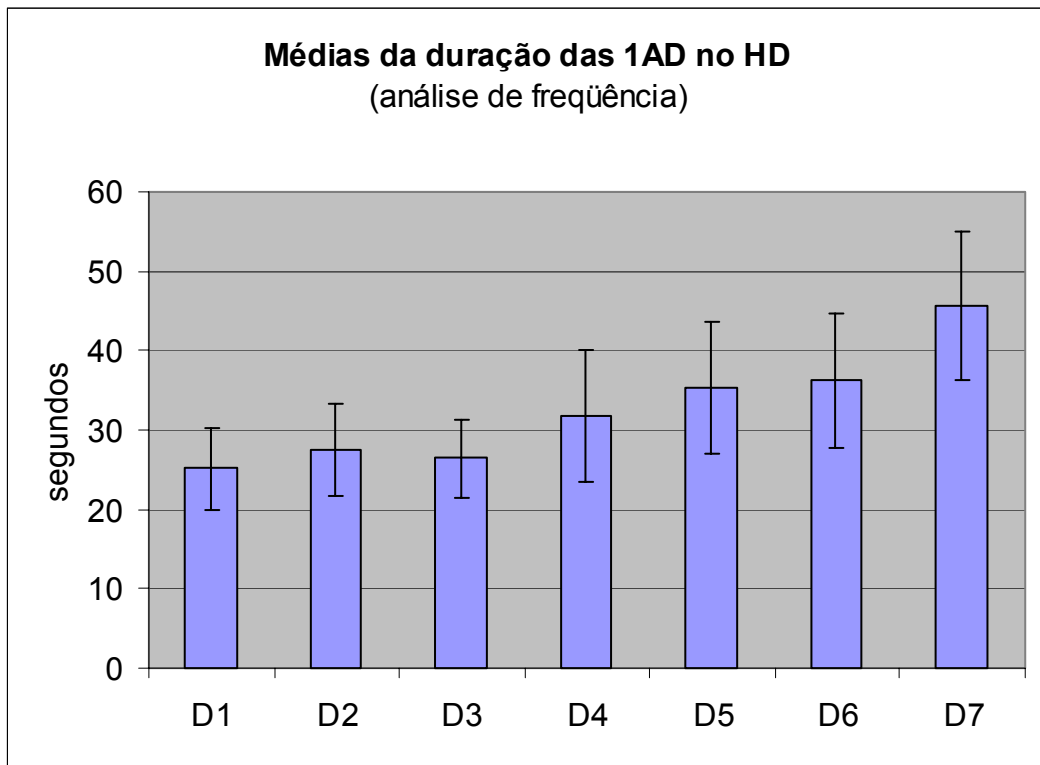
TABELA 4 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS 1AD HIPOCAMPAIS APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA SESSÃO (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA).

HD 1AD	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Rato 40	24,58	26,97	28,24	30,91	26,06	31,71	52,87
Rato 41	26,4	29,57	30,86	27,39	43,88	47,66	63,72
Rato 42	31,49	19,92	20,03	24,83	36,36	47,18	39,23
Rato 43	22,45	26,23	21,89	31,89	42,94	31,67	39,72
Rato 46	18,74	22,79	23,02	51,5	46,31	33,1	
Rato 47	17,12	21,14	21	22,35	23,39	27,43	35,71
Rato 48	30,96	30,08	30,87	34,72	34,25	42,93	42,1
Rato 49	24,71	36,15	29,29	30,66	26,68	40,05	50,51
Rato 50	30,19	34,84	32,66	30,76	37,34	24,58	40,77
Média	25,18222	27,52111	26,42889	31,66778	35,24556	36,25667	45,57875
DP	5,17547	5,718602	4,902699	8,34395	8,374793	8,472063	9,364325
HE 1AD	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Rato 40	26,15	30,1	31,09	30,91	30,29	31,91	52,87
Rato 41	28,76	37,73	41,67	33,98	50,07	48,93	65,1
Rato 42	38,47	37,72	35,56	35,35	41,08	48,24	39,23
Rato 43	22,45	28,4	25,92	33,37	43,23	32,36	39,72
Rato 46	18,74	56,91	60,48	59,27	59,29	56,4	
Rato 47	21,34	24,09	22,96	23,14	22,8	27,63	35,43
Rato 48	45,21	43,25	36,57	40,03	53,52	59,1	58,02
Rato 49	40,54	48,93	51,99	50,61	57,94	46,74	57,79
Rato 50	47,29	47,12	44,55	42,17	37,43	30,58	40,87
Média	32,10556	39,36111	38,97667	38,75889	43,96111	42,43222	48,62875
DP	10,88787	10,71987	12,12813	10,85967	12,47627	11,93299	11,10677

FONTE: Dados do estudo

NOTA. Sendo HD = hipocampo direito e HE = hipocampo esquerdo. Dados referentes aos registros obtidos através dos eletrodos hipocampais dorsais posteriores e apresentados em segundos.

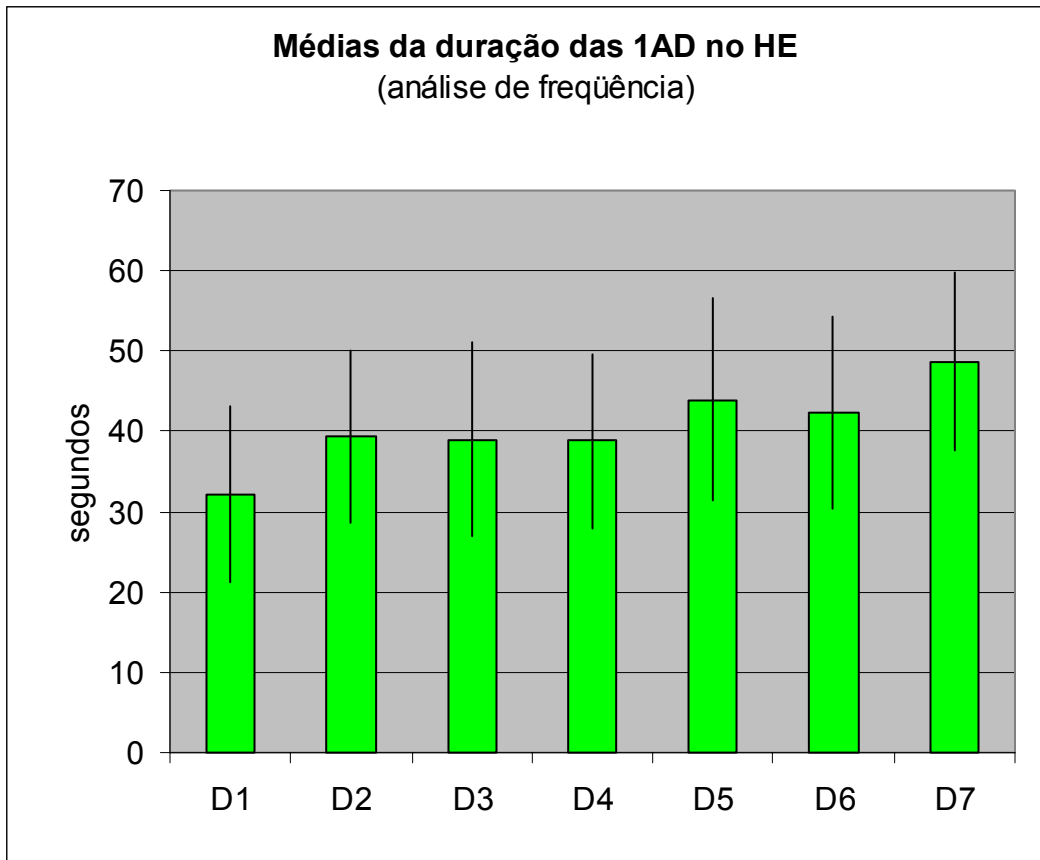
GRÁFICO 5 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HD (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA)



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo.

GRÁFICO 6 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA)

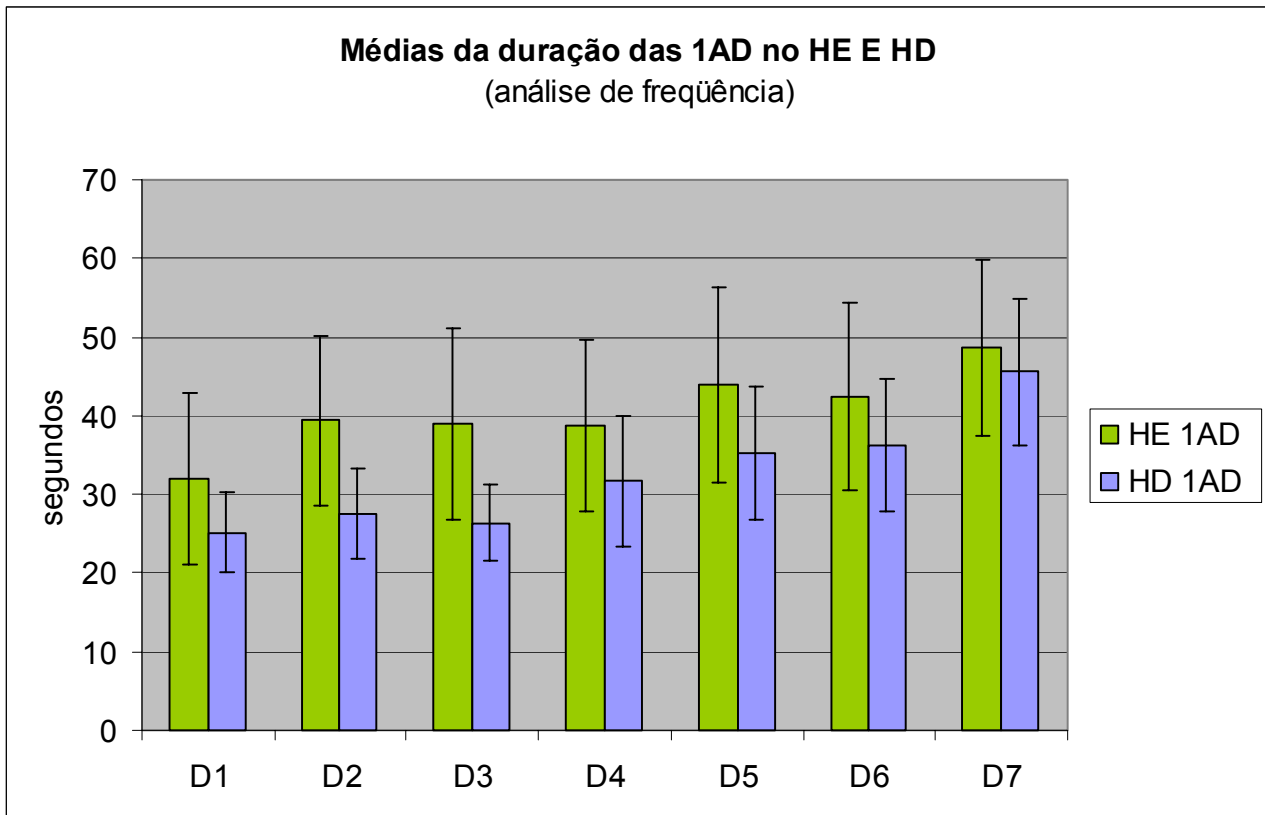


FONTE: Dados do estudo

NOTA: Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo.

Os valores individuais das 1AD do HD e HE foram comparados entre si em cada fase e encontrou-se diferença significativa ao *Wilcoxon signed ranks test* nas fases D1 a D6 com $p= 0,018; 0,008; 0,008; 0,012; 0,021$ e $0,008$, respectivamente, sendo a duração das 1AD maior no HE nas referidas fases. Em D7 esta tendência foi, também, verificada, porém sem significância estatística. A comparação das médias da duração das 1AD também evidenciou maior duração no HE (Gráfico 7).

GRÁFICO 7 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE E HD (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA)



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo.

5.5.2 Análise da duração das 1AD hipocampais pela amplitude

Os mesmos traçados utilizados na análise de frequência foram utilizados para a análise de amplitude (Tabela 5). As durações em D1, D2, D3 e D4 foram individualmente diferentes e menores que D6 e D7 com intervalo de confiança de 95% para D6 e 99% para D7 ao *U-Test*. Como resultado, encontrou-se um aumento estatisticamente significativo da duração das 1AD no HD após a ocorrência da quinta crise convulsiva, ou

seja, D6.

No HE observou-se que D1 foi diferente de D5, D6 e D7 com intervalo de confiança de 95%, 95% e 99% respectivamente. D2, D3 e D4 foram diferentes de D7 com intervalo de confiança de 99%. Como resultado, encontrou-se um aumento estatisticamente significativo da duração das 1AD no HE com a conclusão do processo de *kindling*, ou seja, D7. Os achados provenientes da análise dos valores individuais de cada fase foram, também, observados quando analisadas as médias de cada fase de cada hipocampo (Gráficos 8 e 9).

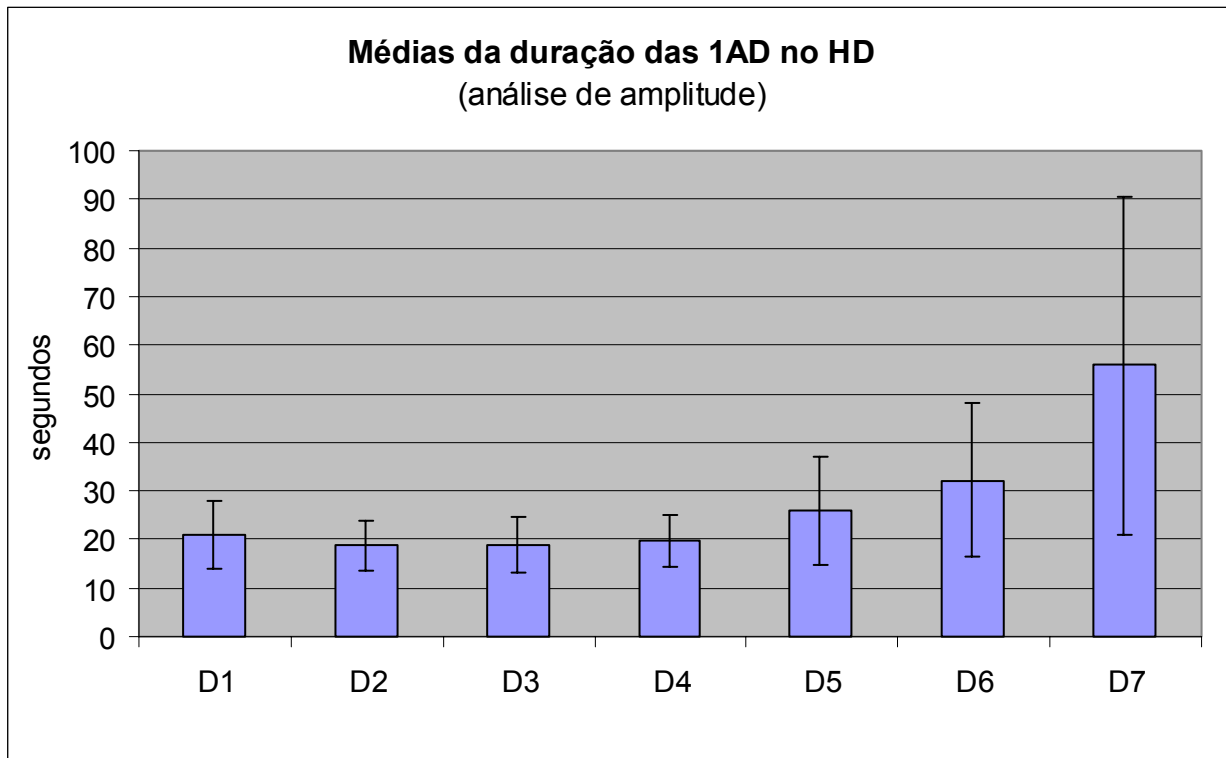
TABELA 5 – RELAÇÃO DO TEMPO DE DURAÇÃO DAS 1AD HIPOCAMPAS APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA SESSÃO (ANÁLISE DE AMPLITUDE).

HD 1AD	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Rato 40	19,55	16,6	18	21,61	16,28	26,31	39,82
Rato 41	19,03	21,43	23,95	22,12	38,11	41,33	109,57
Rato 42	25,29	16,22	14,15	16,31	16,85	15,62	104,14
Rato 43	14,21	15,24	13,12	11,59	43,05	69,96	71,85
Rato 46	19,22	19,65	19,01	22,34	22,56	24,91	
Rato 47	10,97	10,78	10,92	13,19	12,74	22,14	24,26
Rato 48	23,76	17,15	23,55	28,52	18,8	34,38	24,06
Rato 49	21,09	25,24	19,36	23,83	25,98	30,69	32,22
Rato 50	35,46	26,29	28,37	19,23	37,48	25,14	40,72
Média	20,95333333	18,73333333	18,9366667	19,86	25,76111111	32,2755556	55,83
DP	6,9906956	4,95461906	5,67316931	5,37306012	11,1036812	15,9292789	34,9009746
HE 1AD	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Rato 40	17,55	17,6	19	21,61	21,28	25,31	39,82
Rato 41	20,03	24,43	29,95	27,12	48,11	45,33	109,57
Rato 42	26,29	34,22	23,15	25,31	39,85	40,62	100,14
Rato 43	16,21	20,24	19,12	14,59	19,05	33,96	71,85
Rato 46	28,22	56,65	59,01	58,34	50,56	54,91	
Rato 47	11,97	12,78	13,92	17,19	20,74	27,14	116,26
Rato 48	36,76	32,15	22,55	39,52	41,8	43,38	33,06
Rato 49	30,09	43,24	35,36	40,83	36,98	45,69	41,22
Rato 50	37,46	29,29	42,37	30,23	37,48	26,14	40,72
Média	24,95333333	30,0666667	29,38111111	30,5266667	35,0944444	38,0533333	69,08
DP	9,07412943	13,6243624	14,2313373	13,7426262	11,9359081	10,4316418	34,9935631

FONTE: Dados do estudo

NOTA. Sendo HD = hipocampo direito e HE = hipocampo esquerdo. Dados referentes aos registros obtidos através dos eletrodos hipocampais dorsais posteriores e apresentados em segundos.

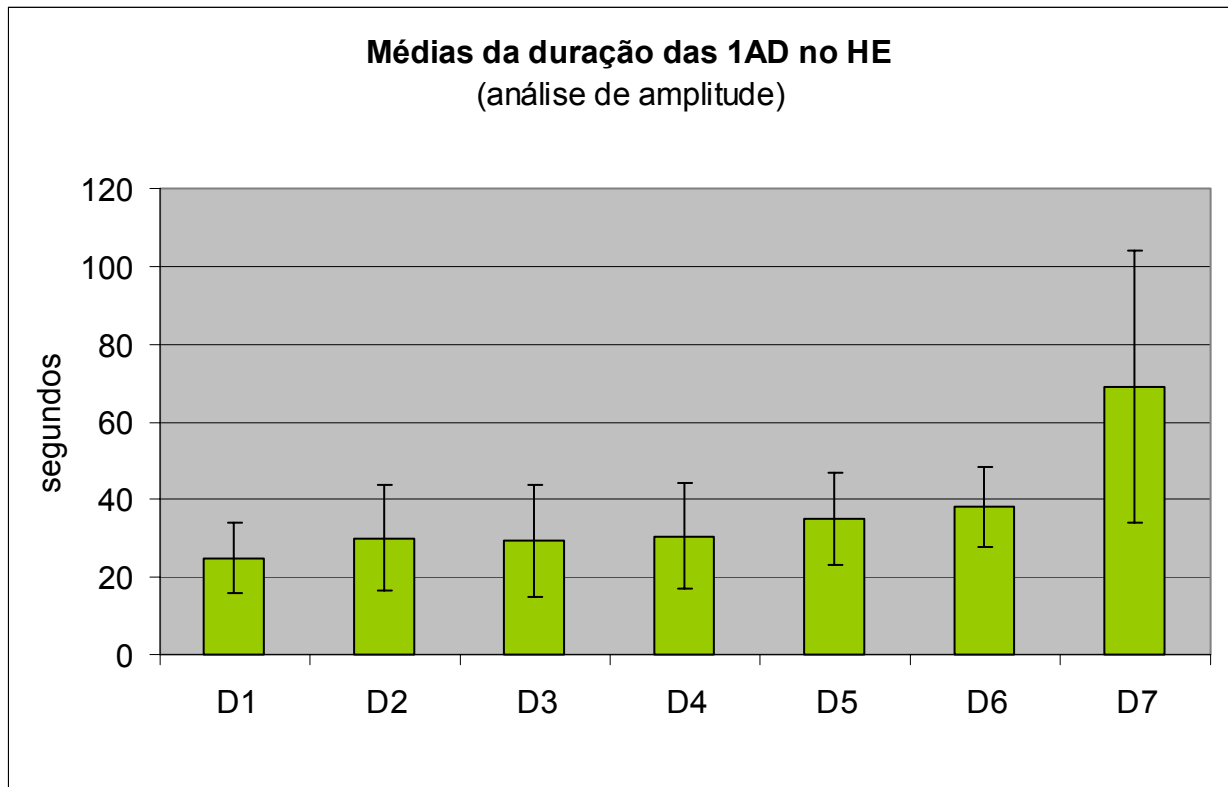
GRÁFICO 8 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HD (ANÁLISE DE AMPLITUDE)



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo.

GRÁFICO 9 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE (ANÁLISE DE AMPLITUDE)

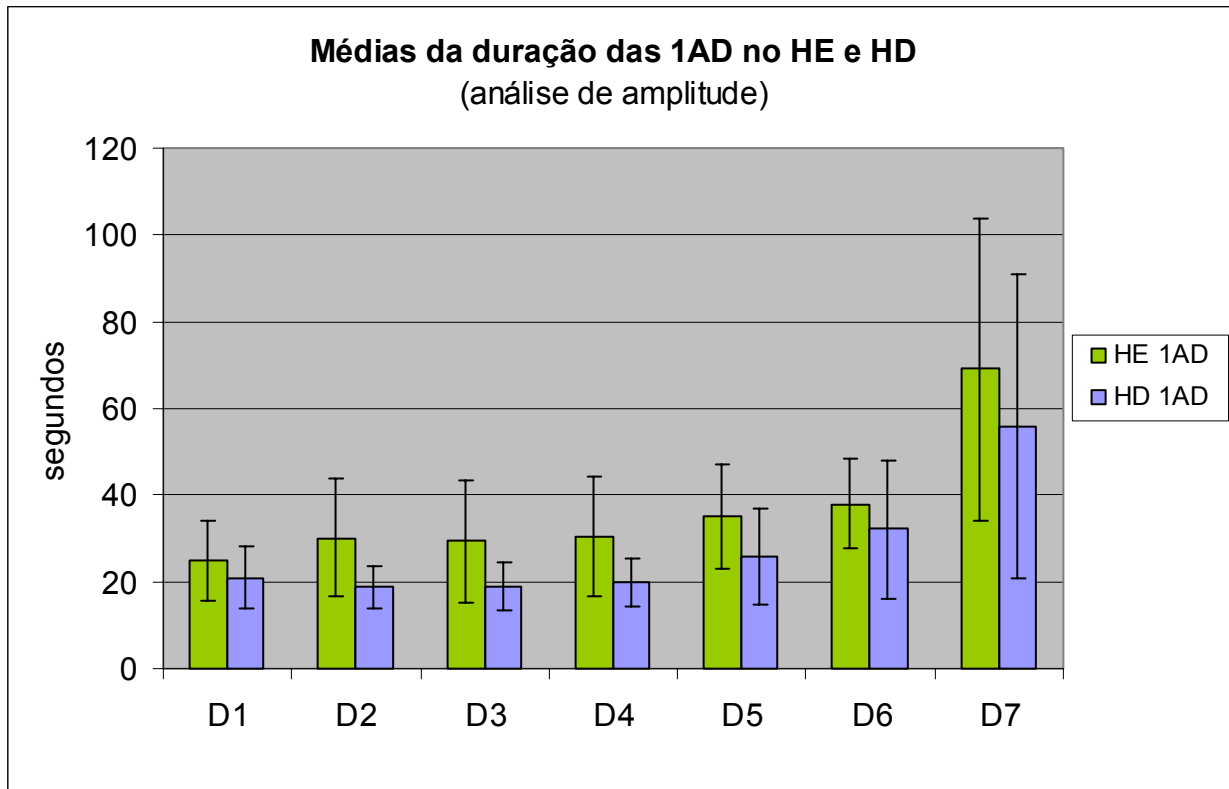


FONTE: Dados do estudo

NOTA: Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo.

Os valores individuais das 1AD do HD e HE foram comparados entre si (em cada fase) e encontrou-se diferença significativa ao *Wilcoxon signed ranks test* nas fases D1 a D4 com nível de significância (p) igual a 0,037; 0,008; 0,013 e 0,012, respectivamente, sendo a duração das 1AD maior no HE nas referidas fases. As demais fases também demonstraram esta tendência, porém sem significância estatística. A comparação das médias da duração das 1AD também evidenciou maior duração no HE (Gráfico 10).

GRÁFICO 10 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE E HD (ANÁLISE DE AMPLITUDE)



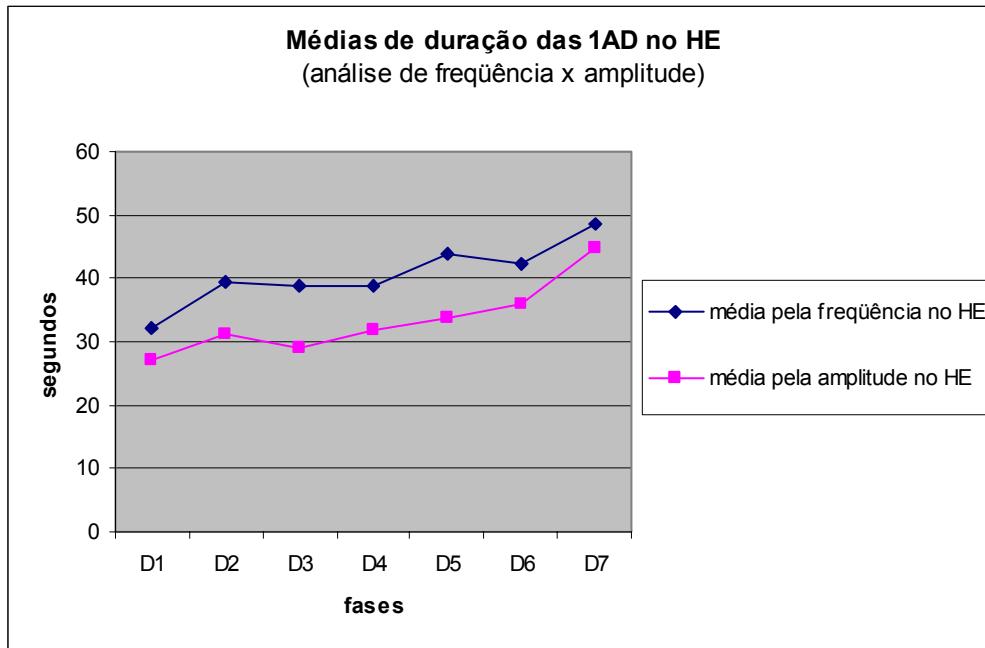
FONTE: Dados do estudo

NOTA: Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo.

5.5.3 Comparação entre as análises de amplitude e frequência.

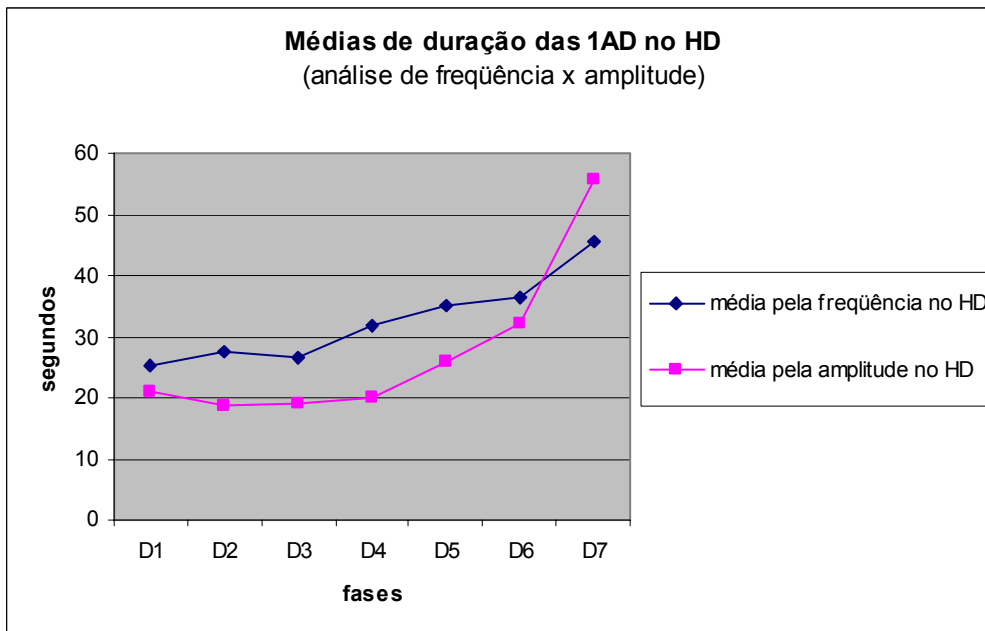
Ao se comparar a duração das 1AD do HE provenientes de cada fase do processo, observou-se não haver diferença significativa (*U-test*) entre ambas as análises (Gráfico11). No HD foi encontrada diferença significativa nas durações das 1AD entre as fases D2, D3 e D4, com intervalo de confiança de 99%, 95% e 99% respectivamente ao *U-Test*. (Gráfico 12).

GRÁFICO 11 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HE (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA E AMPLITUDE)



FONTE: Dados do estudo

GRÁFICO 12 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS 1AD NO HD (ANÁLISE DE FREQUÊNCIA E AMPLITUDE)

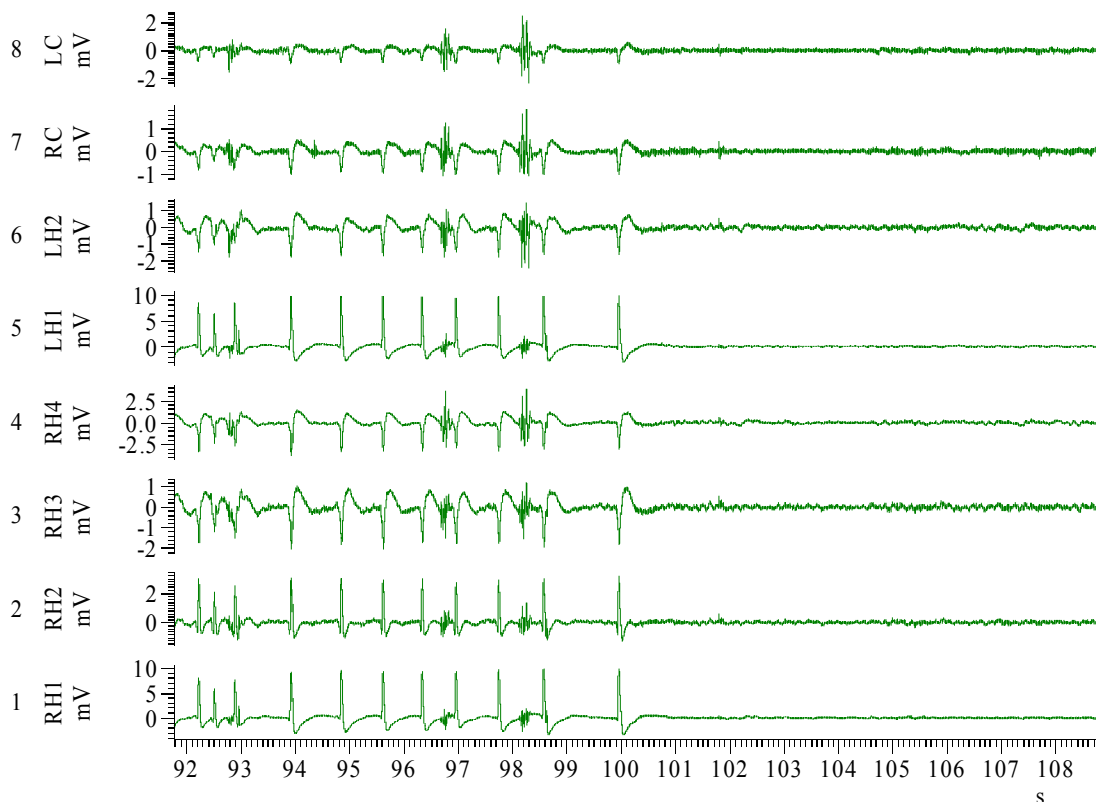


FONTE: Dados do estudo

5.6 ANÁLISE DA DURAÇÃO DAS AD

A duração total da AD de cada sessão foi aferida através da morfologia, pois as sessões apresentaram o mesmo padrão ao final. Em todas as sessões ocorreu um cessar simultâneo da AD nos oito canais do EEGI (Figura 17). Não foi encontrada diferença significativa ao *U-Test* entre os valores individuais de cada sessão referente a cada fase (Tabela 6) o que foi também observado quando comparadas as médias das sessões de cada fase (Gráfico 13)

FIGURA 17 – PADRÃO ELETROENCEFALOGRÁFICO CARACTERÍSTICO DO FINAL DAS AD.



FONTE: Dados do estudo

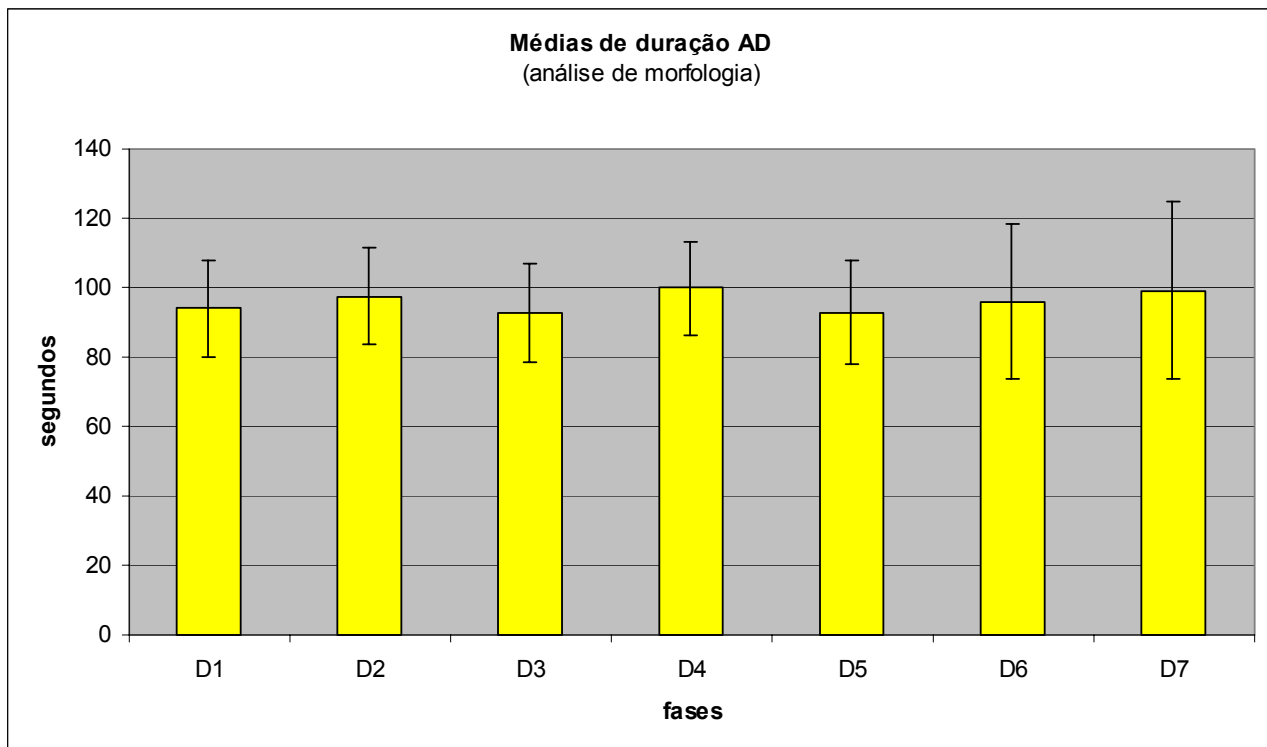
NOTA: Traçado de EEGI em que os canais RH1 a RH4 são referentes ao hipocampo direito, LH1 e LH2 referentes ao hipocampo esquerdo, RC referente ao neocórtex frontal direito e LC referente ao neocórtex frontal esquerdo.

TABELA 6 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA FASE.

	rato 40	rato 41	Rato 42	rato 43	rato 46	rato 47	rato 48	rato 49	rato 50	Média	DP
D1	84,55	89,03	113,29	86,21	100,22	70,97	113,76	99,09	97,46	94,95333	13,85649
D2	86,6	105,43	88,22	92,24	121,65	78,78	106,15	110,24	89,29	97,62222	13,84531
D3	86	87,95	82,15	82,12	118,01	72,92	105,55	104,36	94,37	92,60333	14,25797
D4	88,61	103,12	91,31	88,59	119,34	79,19	114,52	110,83	102,23	99,74889	13,62345
D5	87,28	139,11	118,85	89,05	113,56	80,74	78,8	83,98	89,48	97,87222	20,90885
D6	93,31	123,33	101,62	70,96	110,91	83,14	78,38	70,69	131,14	95,94222	22,32232
D7	136,82	109,57	98,14	71,85		116,26	67,06	75,22	117,72	99,08	25,39372

FONTE: Dados do estudo

GRÁFICO 13 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS AD.



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo.

5.7 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E AMPLITUDE DAS AD

5.7.1 Análise descritiva

À inspeção visual observou-se, nas sessões que antecederam a chegada das crises epiléticas, que as 1AD consistiram de ondas de maior amplitude e frequência quando comparadas ao traçado prévio ao estímulo (período controle). Após as 1AD, foi visualizado um período relativamente silencioso no qual a amplitude e frequência foram inferiores ao período controle. O período das 2AD foi composto por ondas lentas de alta amplitude as quais cessaram simultaneamente em todos os oito canais do EEGI, finalizando as sessões de *kindling*. Após o surgimento das crises epiléticas comportamentais generalizadas notou-se um aumento da complexidade das AD, tornando-se mais difícil a simples diferenciação visual entre o as 1AD, intervalo e 2AD, entretanto o fim das AD manteve-se nítido em todos os canais do EEGI.

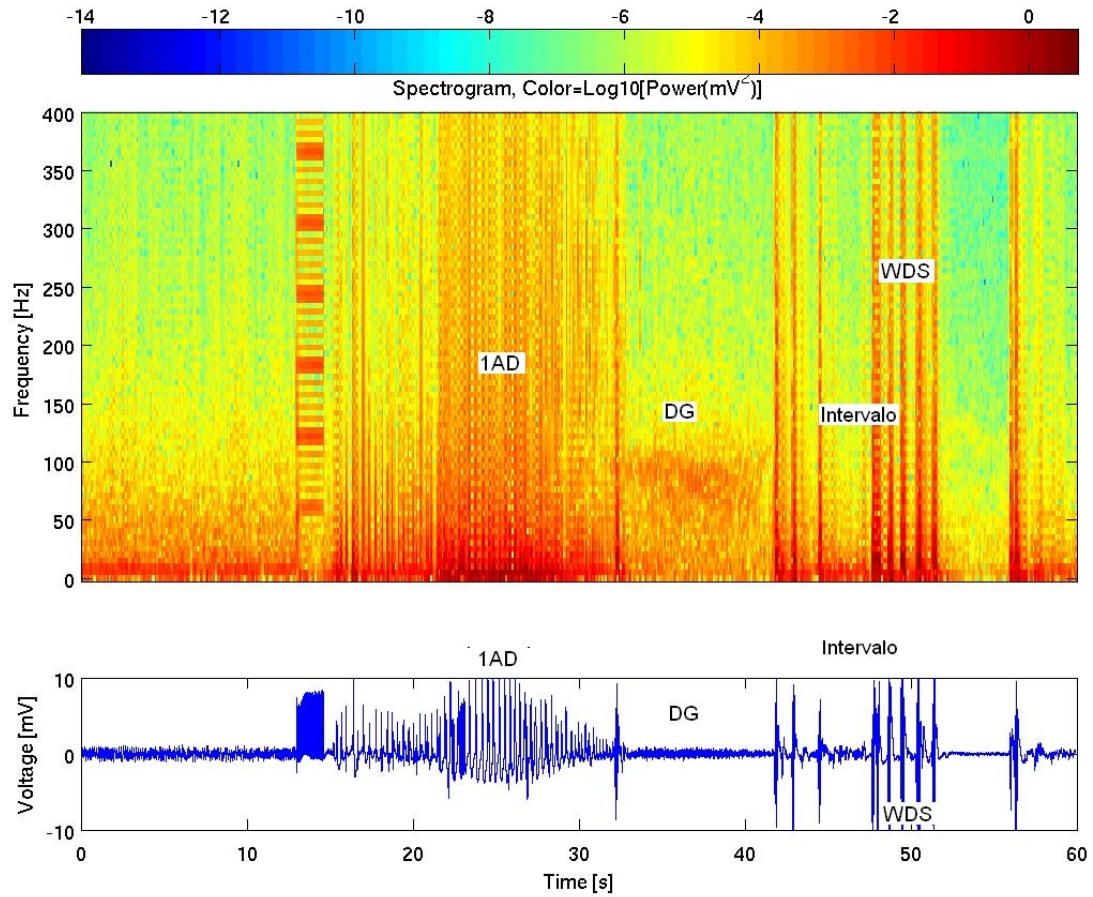
5.7.2 Análise do conteúdo de frequência das 1AD

Foram analisados os espectrogramas de frequência dos dez primeiros segundos após o estímulo nos traçados referentes aos hipocampus dorsais (eletrodos mais posteriores) e neocórtices frontais, sendo os valores normalizados aos períodos controle individuais (Figuras 18). Observou-se que tanto os neocórtices como os hipocampus apresentaram um incremento no padrão de frequência durante o processo de *kindling*. Os níveis de frequência dos hipocampus foram superiores aos níveis observados nos

neocórtices (Figura 19). Outro dado relevante foi o fato de que as frequências hipocâmpais mais altas foram observadas após a chegada das crises epiléticas generalizadas (fases D5, D6 e D7), sendo máximas apenas no início das crises (Figura20).

Com a análise ampliada dos traçados de EEGI dos períodos de alta frequência (observados nos referidos espectrogramas) foi visualizada a presença das descargas de alta frequência (*ripples*). Os ripples foram visualizados superpostos a ondas mais lentas e estiveram presentes em ambos os hipocâmpos. (Figura 21)

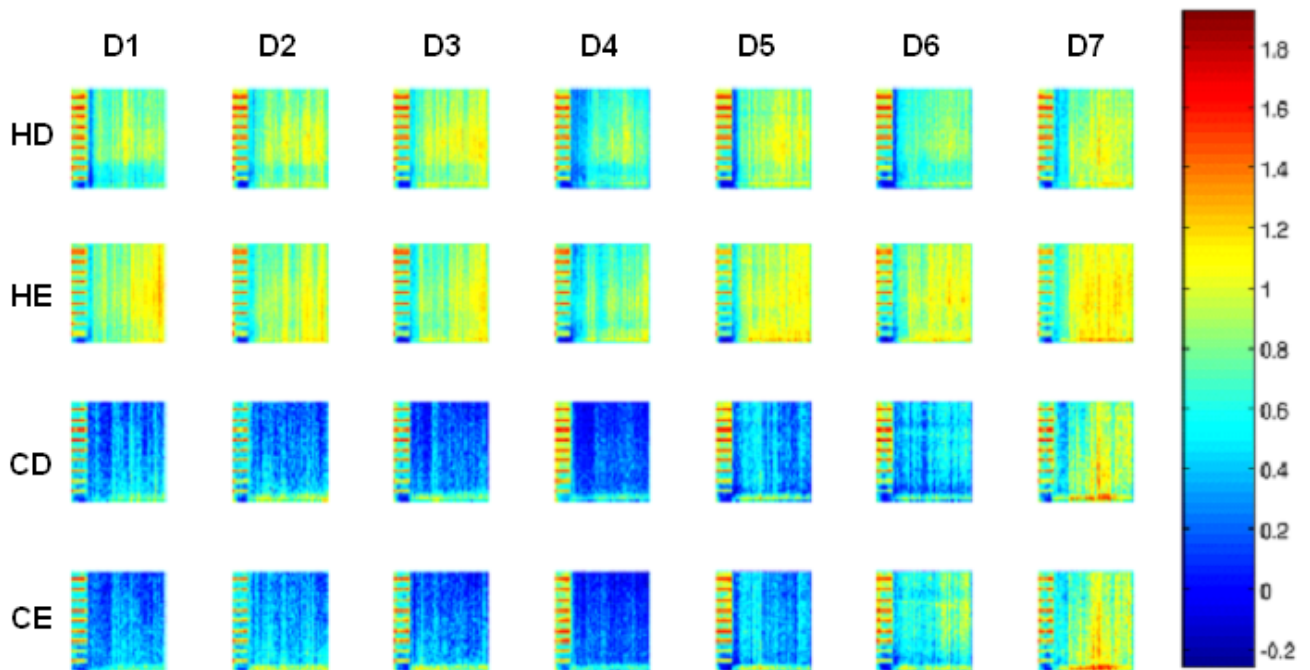
FIGURA 18 - ESPECTROGRAMA EXPLICATIVO COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA DE UM RATO NOS PRIMEIROS 60 SEGUNDOS DE UMA SESSÃO.



FONTE: Dados do estudo

NOTA: A análise de frequência e o traçado de EEGI proveniente do HE são sincronizados. São visualizadas as 1AD, intervalo, 2AD, e DG (descarga gama) e WDS.

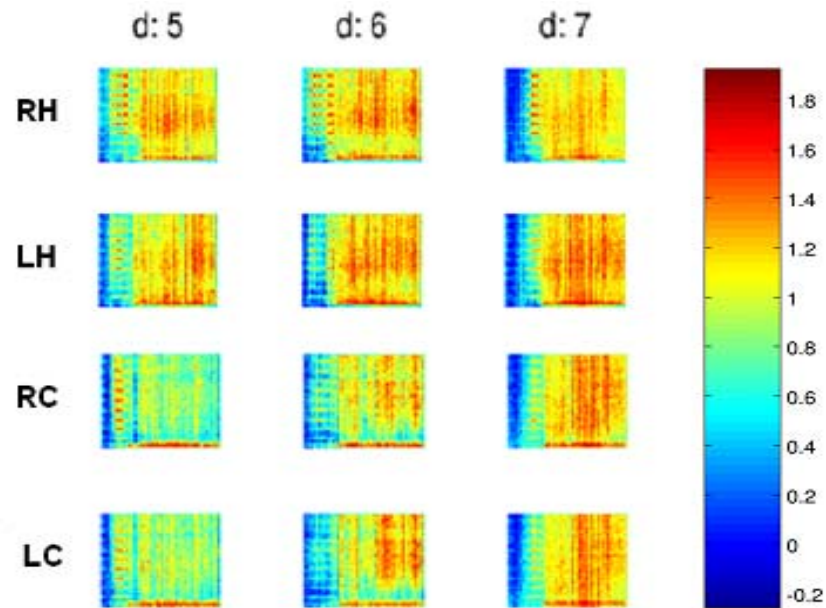
FIGURA 19 – ESPECTROGRAMAS COM O CONTEÚDO MÉDIO DE FREQUÊNCIA NOS PRIMEIROS 10 SEGUNDOS APÓS O ESTÍMULO (1AD) DO GRUPO DE RATOS



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Espectrogramas com o espectro de potência (normalizados ao período controle) em cada faixa de frequência nas fases do processo (para o grupo de ratos). Sendo HD = hipocampo direito, HE = hipocampo esquerdo, CD = neocórtex frontal direito, CE = neocórtex frontal esquerdo.

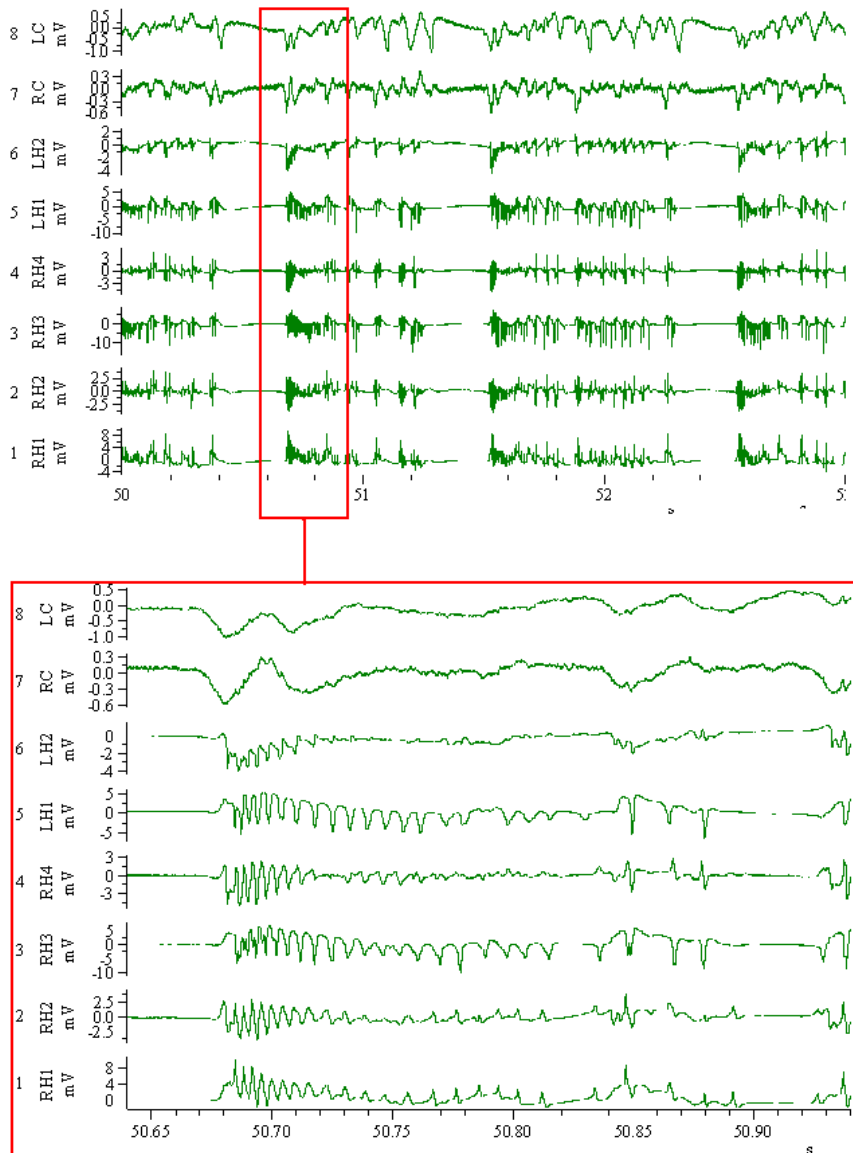
FIGURA 20 – ESPECTROGRAMAS COM O CONTEÚDO MÉDIO DE FREQUÊNCIA DO GRUPO DE RATOS ENVOLVENDO OS PRIMEIROS SEGUNDOS DO COMPORTAMENTO CONVULSIVO GENERALIZADO.



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Espectrogramas com o espectro de potência durante três segundos antes e dez segundos depois do estímulo (normalizados ao período controle) em cada faixa de frequência nas fases do processo que apresentam crises epiléticas comportamentais (D5, D6 e D7). Sendo HD = hipocampo direito, HE = hipocampo esquerdo, CD = neocórtex frontal direito, CE = neocórtex frontal esquerdo.

FIGURA 21 – TRAÇADO DE EEGI EVIDENCIANDO AS DESCARGAS DE ALTA FREQUÊNCIA (*RIPPLES*) EM AMBOS OS HIPOCAMPOS



FONTE: Dados do estudo

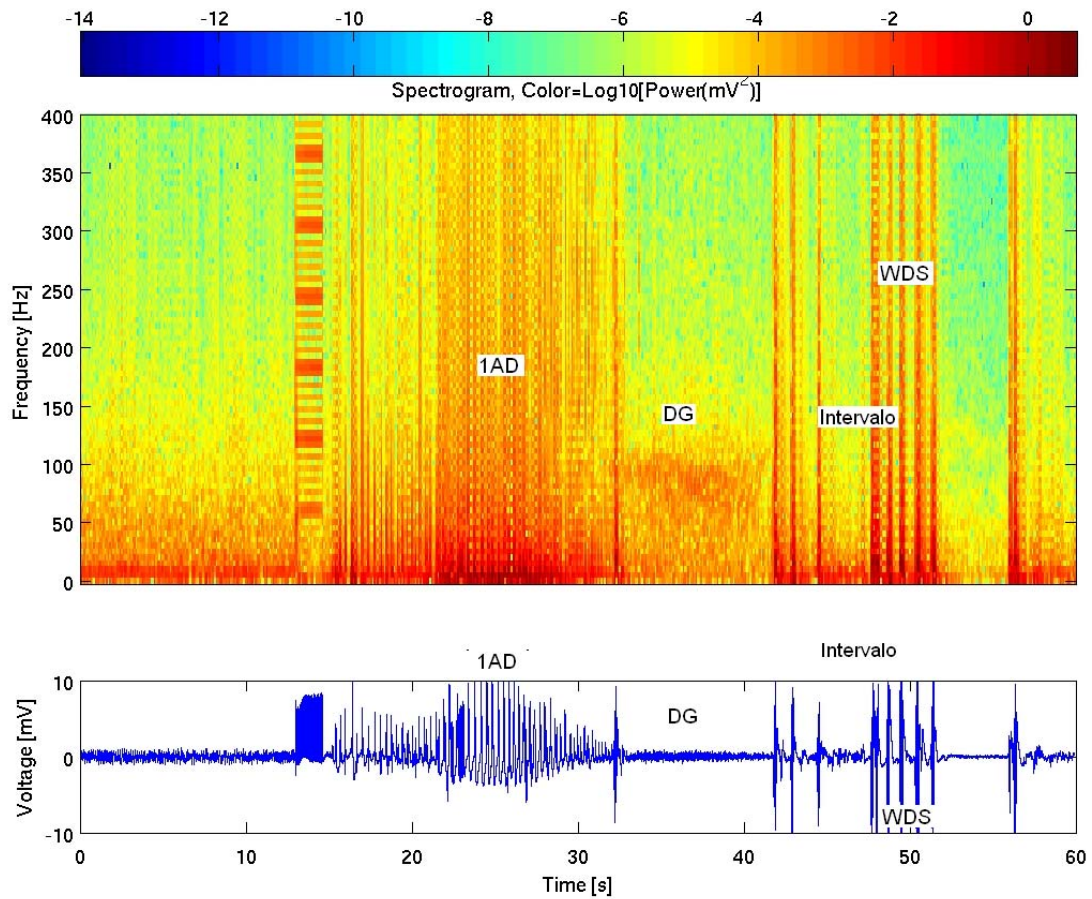
NOTA: Traçados de EEGI em que os canais RH1 a RH4 são referentes ao hipocampo direito, LH1 e LH2 referentes ao hipocampo esquerdo, RC referente ao neocórtex frontal direito e LC referente ao neocórtex frontal esquerdo. O primeiro traçado foi amplificado para a melhor visualização dos *ripples* os quais se apresentaram superpostos a ondas mais lentas.

5.7.3 Análise do conteúdo de frequência das 1AD hipocampais

Na análise do conteúdo de frequência das 1AD hipocampais de D1 a D7 constatou-se a presença repetida ao fim das 1AD de uma faixa de descarga ao redor de 80 Hz a qual foi nomeada descarga gama (DG) (Figura 22). A DG esteve presente nas 1AD do HD em 100% dos traçados de D1, D3, D5 e D6. Em D2 ela foi observada em 89% dos traçados, em D4 em 78% e em D7 em 75% dos mesmos. Nas 1AD pertencentes ao HE a DG esteve presente em 100% dos traçados de D2, D3, D4, D5, D6, D7 e em 89% dos traçados de D1 (Figuras de 23 a 30).

A duração da DG de cada traçado foi medida e observou-se que as durações individuais das DG foram superiores no HE em D1 ($p = 0,017$) e em D2 ($p = 0,012$), ao *Wilcoxon signed ranks test* (Tabela 7). As médias das durações das DG em cada fase foram também maiores no HE (Gráfico 14).

FIGURA 22 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA NO HE DE UM RATO EM D1



FONTE: Dados do estudo

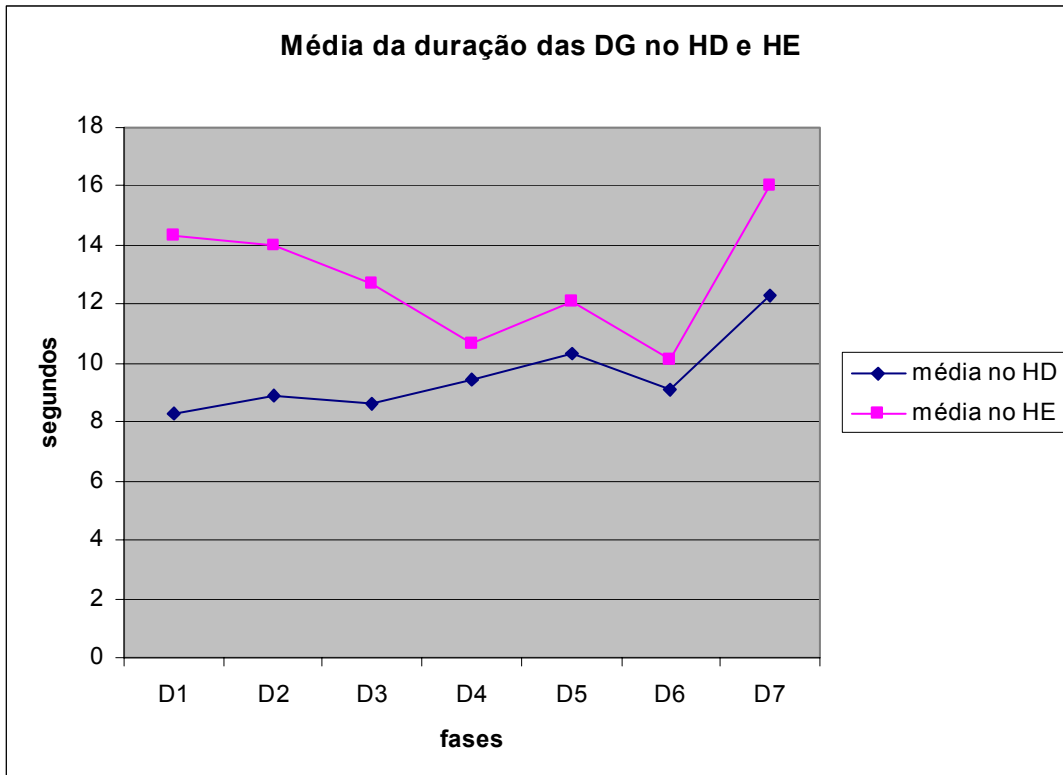
NOTA: A análise de frequência e o traçado de EEGI proveniente do HE estão temporalmente ajustados. São visualizados períodos transitórios de alta frequência durante o intervalo os quais são a representação espectrográfica das WDS.

TABELA 7 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS DG APRESENTADAS POR CADA RATO EM CADA FASE NO HD E HE.

DG no HD	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
rato 40	7,36	9,34	12,31	10,52	7,27	8,94	12,98
rato 41	7,08	10,42	7,57	6,98	5,6	10,03	
rato 42	14,45	6,39	6,49	11,89	22,31	11,01	12,49
rato 43	10,32	12,68	10,82	7,67	10,91	6,68	
rato 46	3,24		3,44		4,81	5,02	
rato 47	6,69	8,46	9,24	8,75	10,12	5,31	12,78
rato 48	7,97	10,91	11,89	13,66	12,38	19,07	13,66
rato 49	6,49	8,16	11,7	8,65	12,58	10,91	14,25
rato 50	11,21	5,01	4,13	7,17	7,07	5,11	7,77
Média	8,312222	8,92125	8,621111	9,41125	10,33889	9,12	12,32167
DP	3,246582	2,478545	3,384739	2,402626	5,315069	4,472122	2,319443
DG no HE	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
rato 40	9,24	11,88	6,98	9,83	9,73	9,05	12,68
rato 41	9,44	15,63	17,99	7,87	11,2	9,73	19,46
rato 42	19,07	12,98	12,09	11,5	12,78	9,73	6,78
rato 43	9,14	13,57	13,51	10,23	10,13	8,65	8,06
rato 46		13,28	8,07	8,56	11,9	10,13	
rato 47	9,24	11,11	8,89	6,59	4,22	4,92	12,89
rato 48	26,93	14,54	11,99	15,63	17,21	19,26	32,73
rato 49	11,51	19,76	23,88	8,45	21,04	13,27	24,09
rato 50	19,95	12,97	11,08	17,2	10,86	6,2	11,4
Média	14,315	13,96889	12,72	10,65111	12,11889	10,10444	16,01125
DP	6,797342	2,543828	5,312732	3,582846	4,749667	4,17547	8,841607

FONTE: Dados do estudo

GRÀFICO 14 – MÉDIAS DE DURAÇÃO DAS DG NO HD E HE



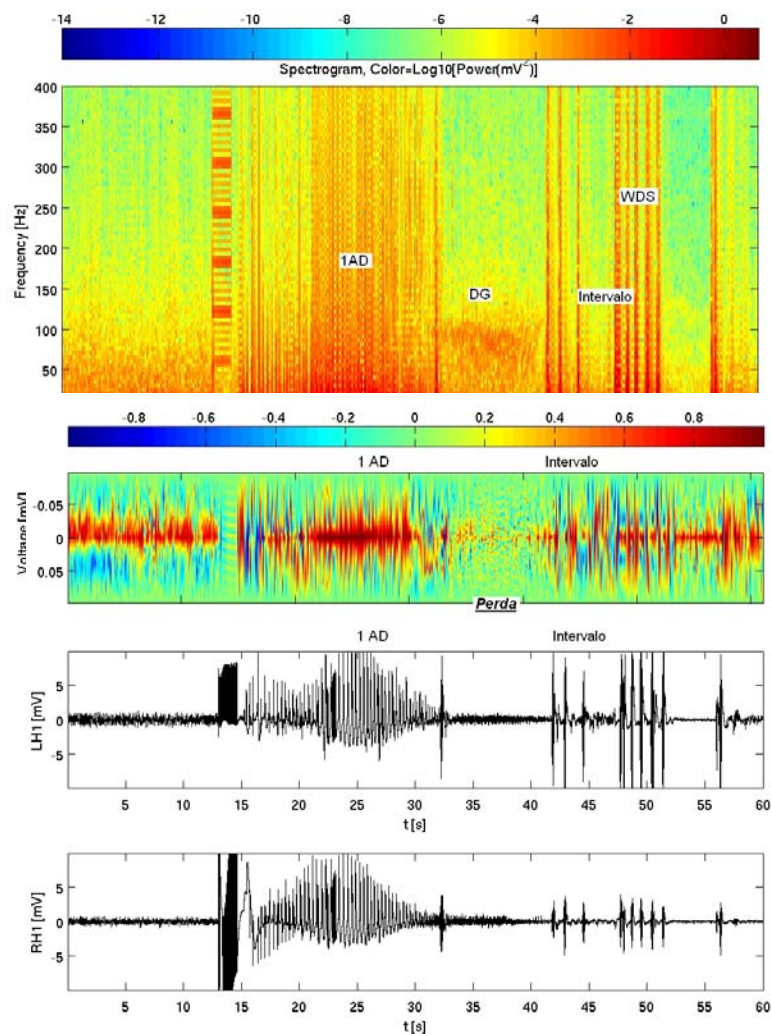
FONTE: Dados do estudo

5.8 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE AS AD HIPOCAMPAS

A análise da correlação linear entre os traçados provenientes dos eletrodos dos hipocampus direito e esquerdo mostrou uma alta correlação entre os hipocampus durante as 1AD e durante os períodos intermediários (períodos que sucedem as 1AD). A alta correlação esteve, entretanto, ausente ou bastante reduzida nos segundos finais das

1AD. Esta perda da alta correlação entre os hipocampus esteve relacionada cronologicamente à ocorrência das DG (Figura 23). A presença da associação entre a perda da correlação e as DG foi encontrada em 100% dos traçados das fases D1, D2, D3 D4 e D5, em 89% de D6 e em 88% de D7.

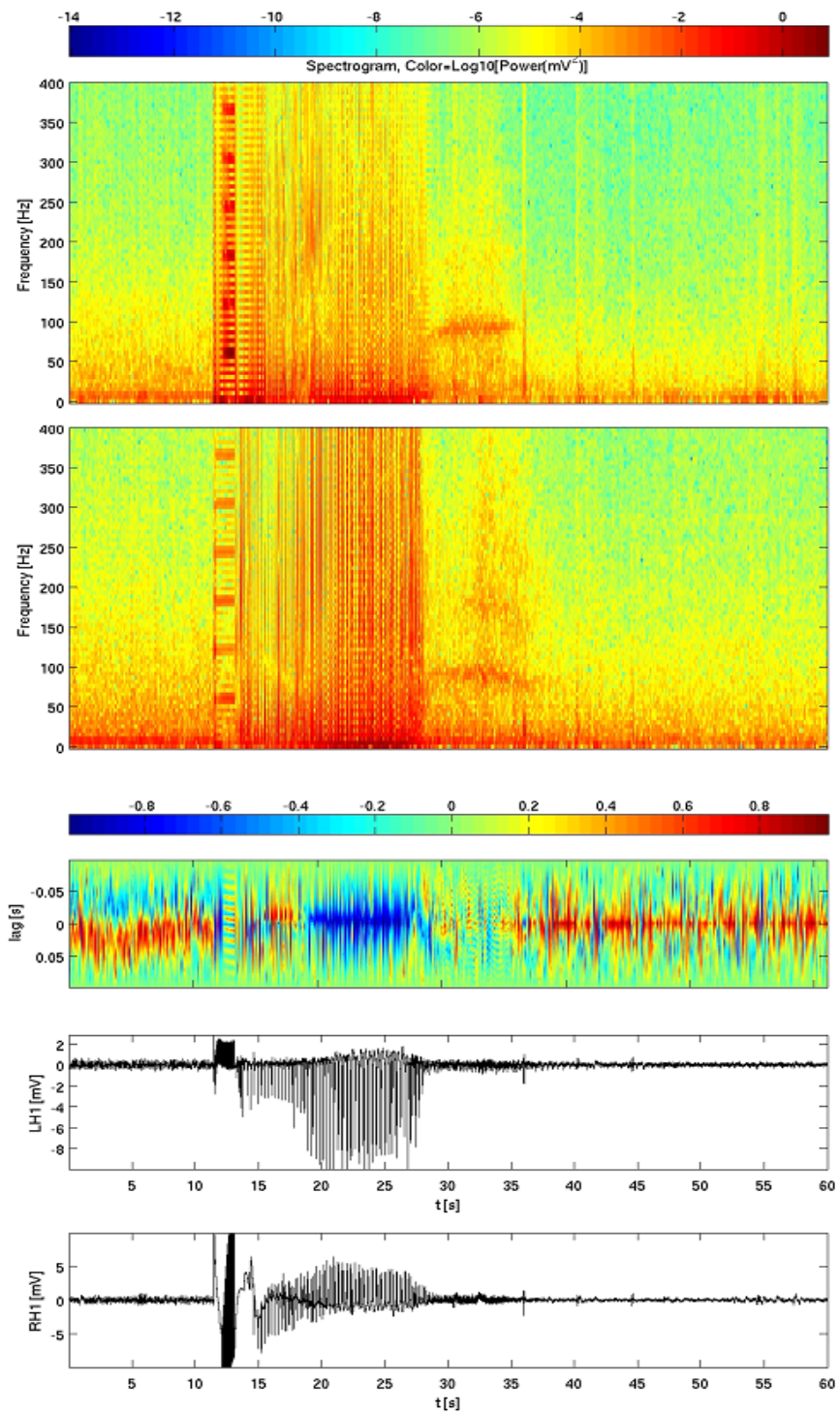
FIGURA 23 - ESPECTROGRAMA EXPLICATIVO COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA DO HE E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HE E HD.



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Caso representativo onde RH1 mostra o traçado pertencente ao eletrodo hipocampal dorsal direito posterior e LH1 mostra o traçado pertencente ao eletrodo hipocampal dorsal esquerdo posterior.

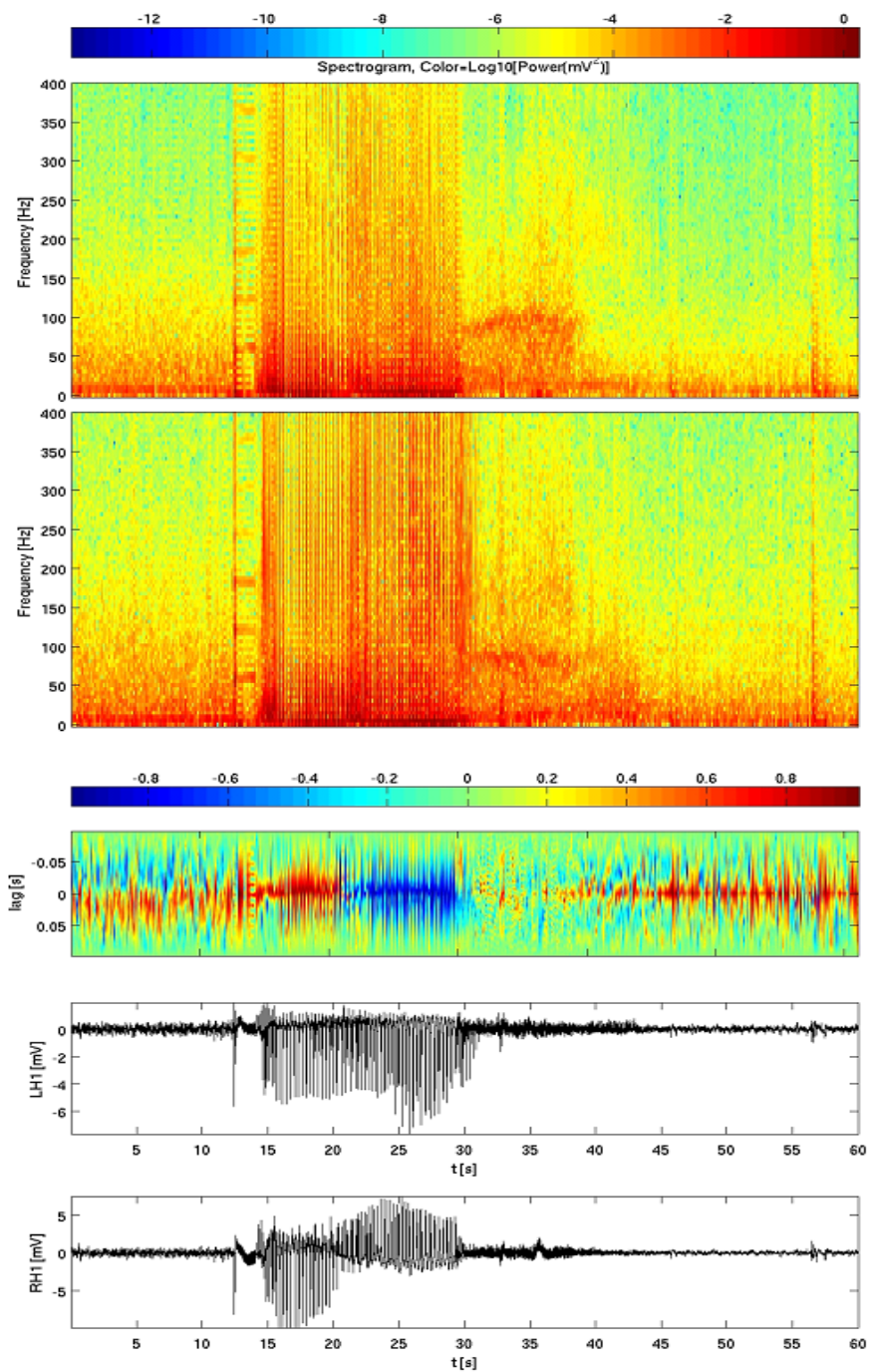
FIGURA 24 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D1.



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Caso representativo com o espectro de frequência no HD (acima) e HE (abaixo). A seguir a correlação entre ambos os hipocampus e por fim os traçados de EEGI do HE (LH1) e HD (RH1).

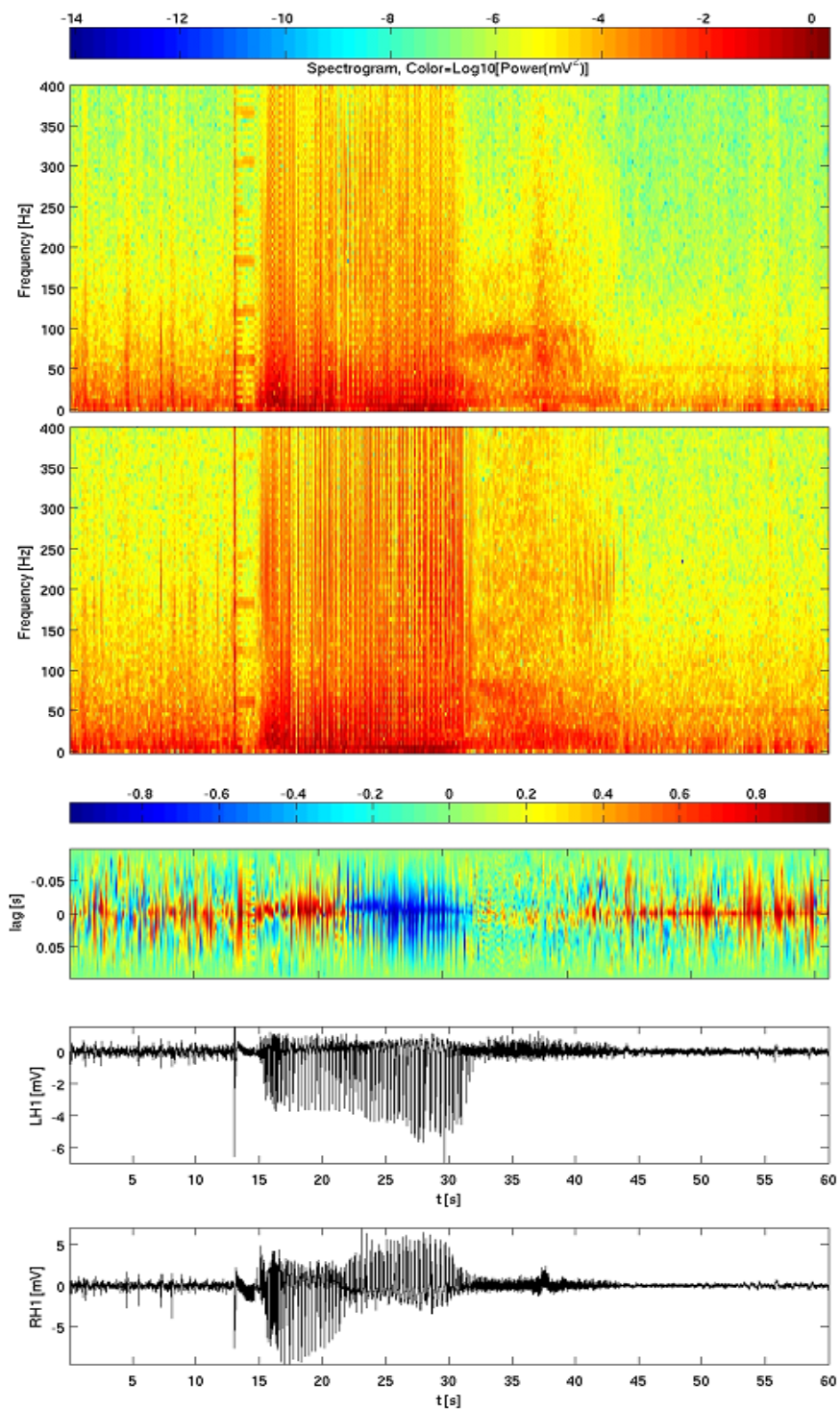
FIGURA 25 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D2



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Caso representativo com o espectro de frequência no HD (acima) e HE (abaixo). A seguir a correlação entre ambos os hipocampus e por fim os traçados de EEGI do HE (LH1) e HD (RH1).

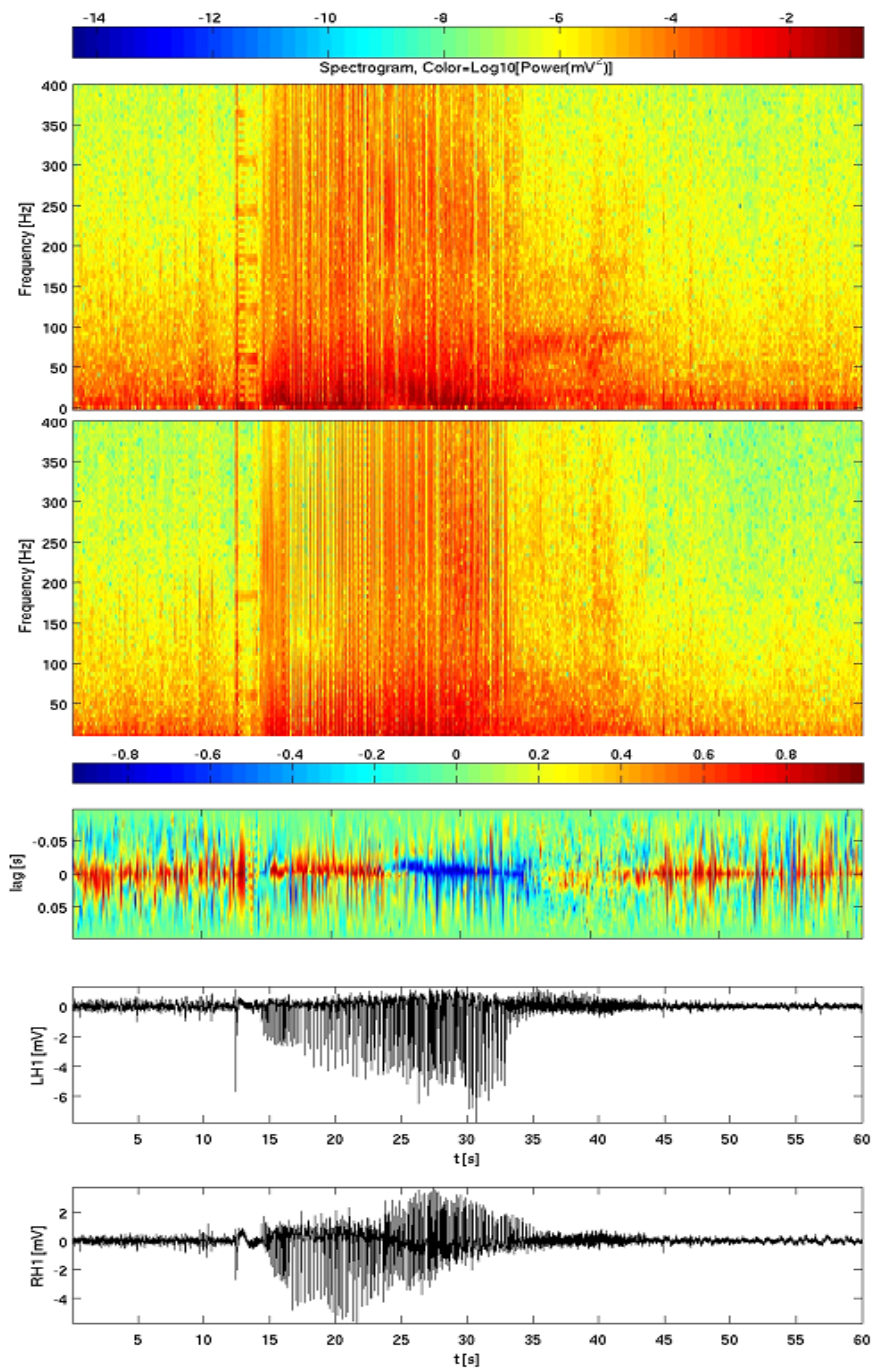
FIGURA 26 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D3



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Caso representativo com o espectro de frequência no HD (acima) e HE (abaixo). A seguir a correlação entre ambos os hipocampus e por fim os traçados de EEGI do HE (LH1) e HD (RH1).

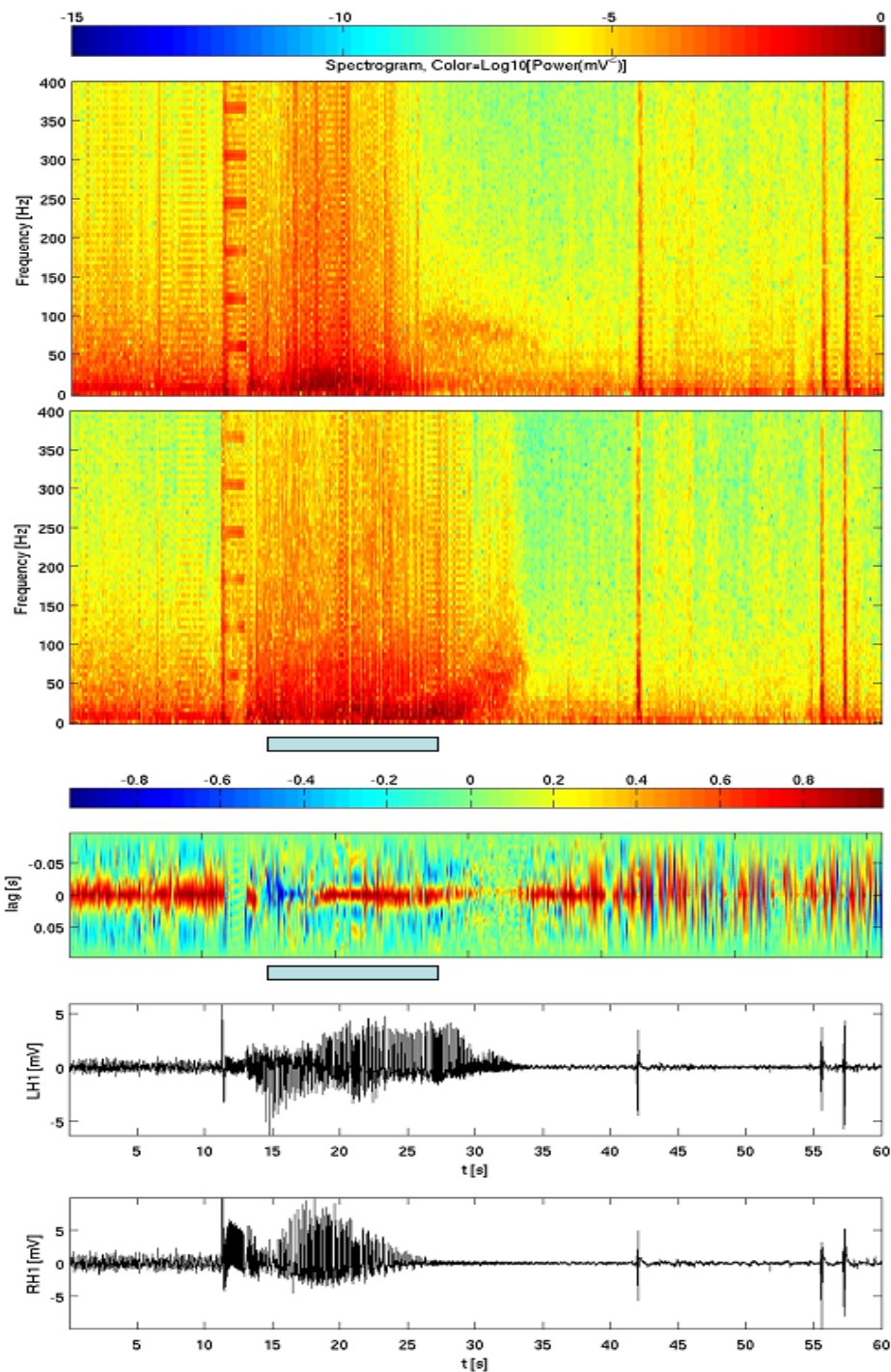
FIGURA 27 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D4



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Caso representativo com o espectro de frequência no HD (acima) e HE (abaixo). A seguir a correlação entre ambos os hipocampus e por fim os traçados de EEGI do HE (LH1) e HD (RH1).

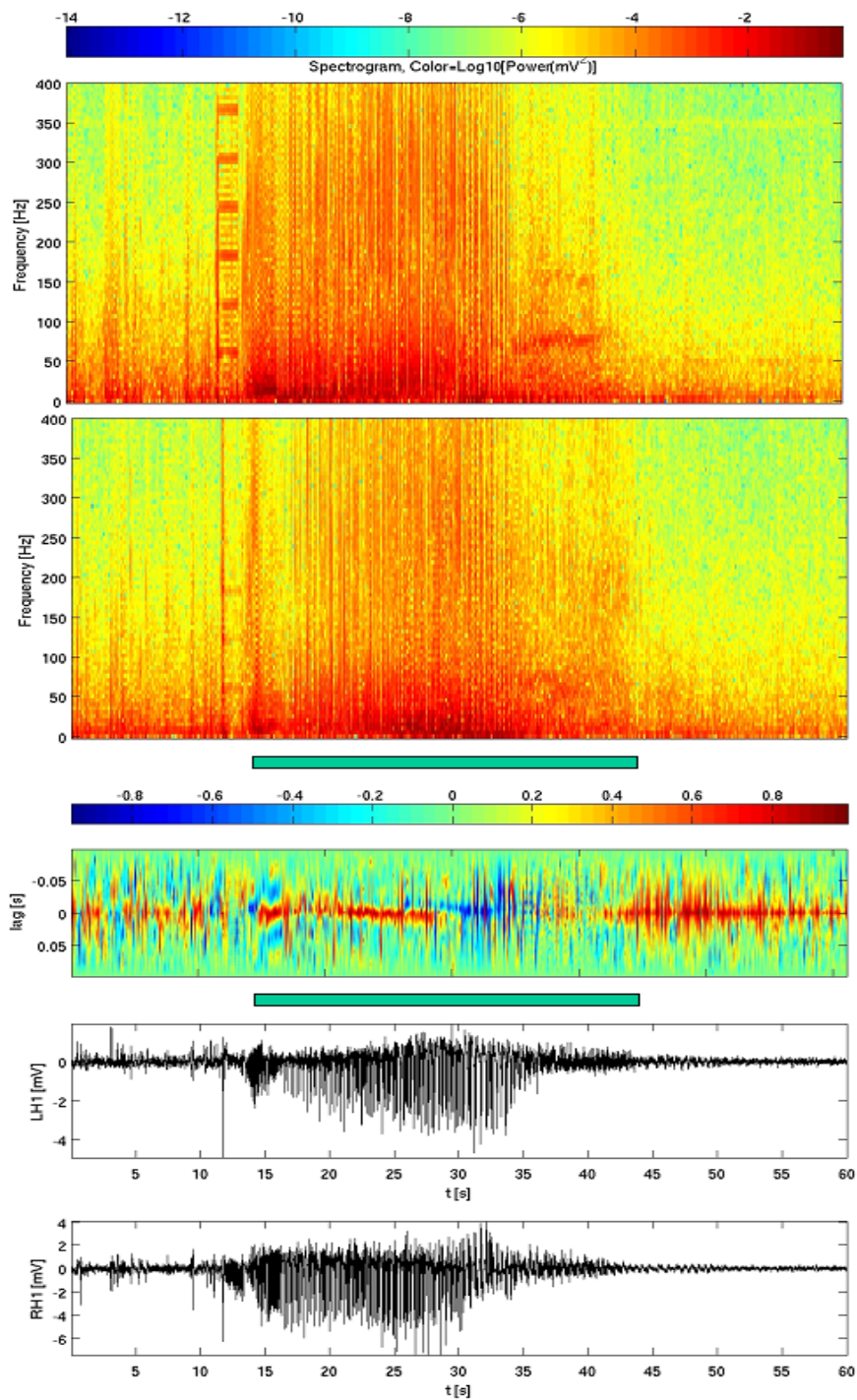
FIGURA 28 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D5



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Caso representativo com o espectro de frequência no HD (acima) e HE (abaixo). A seguir a correlação entre ambos os hipocampus e por fim os traçados de EEGI do HE (LH1) e HD (RH1). A barra verde indica o período da crise convulsiva generalizada.

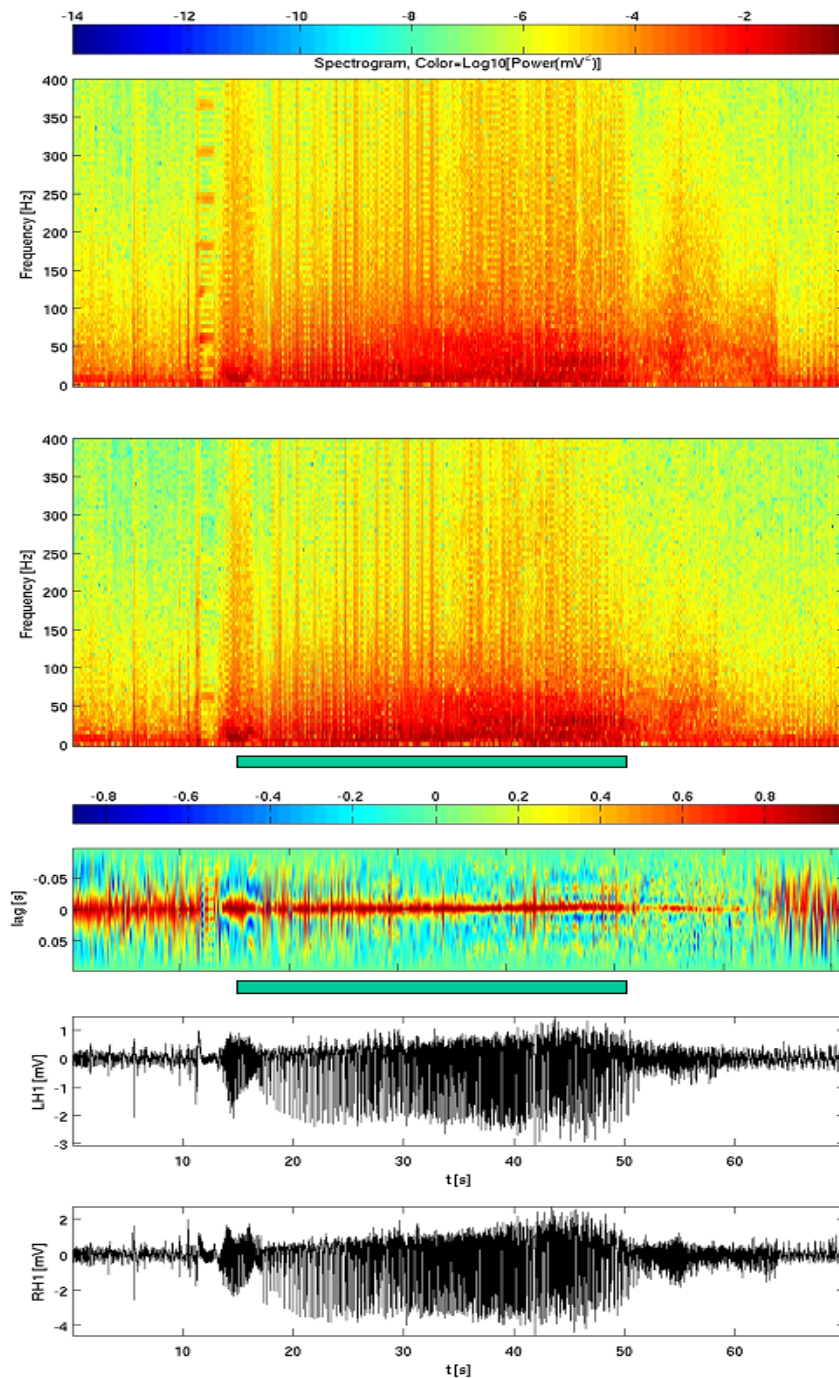
FIGURA 29 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D6



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Caso representativo com o espectro de frequência no HD (acima) e HE (abaixo). A seguir a correlação entre ambos os hipocampus e por fim os traçados de EEGI do HE (LH1) e HD (RH1). A barra verde indica o período da crise convulsiva generalizada.

FIGURA 30 - ESPECTROGRAMA COM O CONTEÚDO DE FREQUÊNCIA E A CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS TRAÇADOS DO HD E HE EM D7



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Caso representativo com o espectro de frequência no HD (acima) e HE (abaixo). A seguir a correlação entre ambos os hipocampus e por fim os traçados de EEGI do HE (LH1) e HD (RH1). A barra verde indica o período da crise convulsiva generalizada.

O padrão comportamental dos animais durante a ocorrência das DG foi analisado para se verificar uma possível relação causa e efeito (interferência comportamental). Não foi encontrada correlação entre algum padrão comportamental repetido relacionado à ocorrência das DG (Tabelas 8 e 9).

TABELA 8 – COMPORTAMENTO APRESENTADO ANTES E DURANTE AS DG NO HD

	Rato 40	Rato 41	Rato 42	Rato 43	Rato 46	Rato 47	Rato 48	Rato 49	Rato 50
WDS	2	5		5		2	1	17	6
Parado	4	3	6			3	5	6	5
Move cabeça p D	1	3		2		3	2	3	1
Move cabeça p E	2	2	1	1			1	4	3
Move orelha	1								
Anda à frente	1				1	2			
Coça a cara		3				1		1	3
Cheira as patas		1							
Parado 2 patas		1		1	1				
Cheira o chão		1			1				
Anda p D						2			
Move cabeça p baixo				1					
Anda p E						1		2	
Move as 2 patas para alto						1			
Final crise G5						1			

FONTE: Dados do estudo

TABELA 9 – COMPORTAMENTO APRESENTADO ANTES E DURANTE AS DG NO HE

	Rato 40	Rato 41	Rato 42	Rato 43	Rato 46	Rato 47	Rato 48	Rato 49	Rato 50
WDS	4	6	1		2	2	1	17	5
Parado	6	3	4	1		2	5	8	5
Move cabeça p D	1	11	6	6	1	4	2	6	6
Move cabeça p E	1	9	5	5	2		1	4	6
Move orelha	2			1					
Anda à frente	3		4			1	1	7	2
Move cabeça p alto	1			1		1			
Coloca pata na gaiola	2	3	9				1	1	2
DESCEU gaiola	2	3	9				1	1	2
Coça a cara		2							3
Cheira as patas		2							
Parado 2 patas		2			1				
Cheira o chão		2							
Anda p D		1	1			1			1
Move cabeça p baixo			1	2	1				
Anda p E			3			2	1	1	2
Move as 2 patas			1			2			
Final crise G5						1			

FONTE: Dados do estudo

6 DISCUSSÃO

A epilepsia temporal mesial é uma doença de significativa prevalência e causa progressiva incapacitação social e laborativa. Com o tratamento medicamentoso consegue-se o controle pleno dos eventos ictais em cerca de 20% a 40% dos casos (COMMISSION, 1989, p. 389-399; SEMAH et al. 1998, p. 1256-1262; VOLCY GÓMEZ, 2004, p.663-667). Com o tratamento microcirúrgico (ressecção das áreas epileptogênicas) a taxa de controle das crises aumenta para 67 a 85%. Existe, entretanto, uma substancial parcela de pacientes com EMT que não são candidatos à cirurgia, como no caso dos portadores de doença bilateral manifesta (MORRELL; WHISLER; BLECK, 1989, p. 231-239; VOLCY GÓMEZ, 2004, p.663-667). Na busca de modalidades terapêuticas menos invasivas, de maior eficácia e com ampla indicação, formas alternativas têm sido pesquisadas. De acordo com estes princípios, foi delineado este trabalho, o qual tem como meta fornecer substrato para a compreensão mais detalhada dos mecanismos envolvidos na gênese e interrupção das crises epilêpticas temporais mesiais utilizando-se de novos sistemas computacionais para a análise do modelo de *kindling* hipocampal.

6.1 DISCUSSÃO DOS ACHADOS REPRODUZIDOS

5.1.1 Padrão comportamental.

Foram registrados, neste experimento, os padrões comportamentais conhecidos referentes ao modelo de *kindling* hipocampal. Os ratos deste trabalho apresentaram os estágios convulsivos motores classificados por Racine e desenvolveram durante a grande

maioria das crises epilépticas a típica seqüência três, quatro, cinco sem passar pelos estágios um e dois. Isto foi também relatado por outros autores, pois diferente do modelo de *kindling* amigdaliano o *kindling* hipocampal apresenta uma progressão mais rápida para os estágios motores avançados o que indica rápida generalização ictal envolvendo a área motora. O aumento progressivo da duração do componente generalizado das crises epilépticas e a presença dos estágios seis, sete e oito da escala de Pinel e Rovner vão de encontro às descrições existentes que relatam um aumento progressivo da complexidade tanto no padrão eletroencefalográfico como comportamental nos modelos de *kindling* hipocampal (LEUNG; SHEN, 2006, p. 274-281; MCINTYRE; KELLY, 1993, p. 49-61).

A ocorrência dos fenômenos motores descritos como *wet dog shakes* apresentaram inicial aumento com posterior queda ao longo do processo e uma relação inversa com o surgimento dos fenômenos motores de Racine o que está em acordo com experimentos descritos (LERNER-NATOLI et al., 1983, p. 93-101; LEUNG; SHEN, 2006, p. 274-281; MCINTYRE; KELLY, 1993, p. 49-61).

5.1.2 Padrão eletroencefalográfico

Os ratos deste experimento apresentaram em todos os traçados o padrão eletroencefalográfico típico dos modelos de *kindling* hipocampal. Sendo ele, pós-descargas primárias com início precoce e com alta amplitude, um intervalo relativamente silencioso, um rebote com ondas lentas e alta amplitude (pós-descargas secundárias) e a presença de WDS entremeadas. Além do padrão eletroencefalográfico característico, o progressivo aumento da duração das 1AD com origem no hipocampo que recebe o estímulo elétrico e a relativa estabilidade da duração da AD total são também congruentes

com os achados descritos (MCINTYRE; KELLY, 1993, p. 49-61; LERNER-NATOLI et al., 1983, p. 93-101; LEUNG; ZHAO; SHEN, 1994, p. 696-704).

Com relação ao conteúdo de frequência das pós-descargas, foram encontrados descargas de alta frequência (na faixa de 100 a 400 Hz), com distribuição espacial e formato de onda, equivalentes aos descritos por BRAGIN nos modelos de epilepsia temporal induzida pela injeção hipocampal de kainato em ratos e em EEGI proveniente do hipocampo de pacientes epiléticos. BRAGIN descreve que a ocorrência destes descargas (*ripples*) está restrita ao hipocampo que recebeu a injeção de kainato. Os ripples presentes no experimento descrito nesta dissertação foram encontrados não somente no hipocampo estimulado, como também no hipocampo contralateral (BRAGIN et al., 1999, p. 129-137).

6.2 DISCUSSÃO DOS NOVOS ACHADOS

5.2.1 Duração das 1AD

Observou-se através da análise correlacional que as AD elicítadas no hipocampo direito com a estimulação apresentaram uma propagação muito rápida para o hipocampo contralateral com uma diferença da ordem de milisegundos. Este fato pode ser atribuído à presença das fibras comissurais inter-hipocampais as quais possuem apenas uma sinapse no trajeto (PAXINOS, 2004, p. 443-486).

A duração das 1AD foi significativamente maior no hipocampo esquerdo do que no hipocampo direito. Embora não haja precedentes na literatura relacionada, este dado ressalta a importância do hipocampo contralateral (ao estímulo) na gênese ictal dos ratos

submetidos ao modelo de *kindling* hipocampal. No modelo de kainato intrahipocampal, o papel do hipocampo contralateral na epileptogênese temporal foi também recentemente destacado (MEIER et al., 2007, p. 138-149).

5.2.2 Descargas gama e correlação linear

Em se analisando as DG observou-se que em todos os casos ela esteve presente nos segundos finais das 1AD. Observou-se também que as DG apresentaram simultaneidade com a quebra da alta correlação entre as AD registradas nos hipocampus. Este dado pode ser interpretado como sendo as DG agentes que contribuem para o cessar das 1AD. Um dado que reforça esta interpretação é o retorno da alta correlação entre as AD hipocampais quando as DG desaparecem, pois isto torna pouco provável que o término das 1AD seja devido às simples “exaustão neuronal”. Considera-se a hipótese de que as DG sejam o reflexo da ação de um sistema anticonvulsivo endógeno que atue através da dessincronização de diferentes populações neuronais. Este sistema endógeno seria capaz de controlar o surgimento das crises epiléticas durante as primeiras fases do processo e posteriormente sua capacidade seria ultrapassada pela instalação dos intensos potenciais sinápticos que caracterizam o fenômeno de *kindling*. A existência de um sistema de controle endógeno da atividade ictal envolvendo os núcleos da base foi reportada por LODDENKEMPER. Seu mecanismo de ação não foi completamente elucidado, porém seu efeito anticonvulsivo foi demonstrado em modelos animais através da desinibição da assim chamada zona anticonvulsiva dorsal mesencefálica. A ação deste sistema explicaria, inclusive, a eficácia da estimulação elétrica do núcleo subtalâmico na redução das crises epiléticas em pacientes epiléticos (LODDENKEMPER et al., 2001,

p. 514-532). Tanto os núcleos da base quanto os sistemas monoaminérgicos do tronco encefálico poderiam estar envolvidos na gênese das DG, pois ambos apresentam rápida e ampla conectividade com diferentes áreas cerebrais. Acredita-se que a atividade deste sistema anticonvulsivo endógeno produza uma mudança do padrão oscilatório na alça de neurônios piramidais e interneurônios gabaérgicos os quais estão envolvidos na gênese das ondas registradas nos EEGI hipocampais (BUZSÁKI et al., 1992, p. 1025-1027; WENDLING et al., 2005, p. 343-356). O mecanismo da perda da correlação poderia ser um reiniciar de fases que se utilizaria de um padrão oscilatório de diferentes fases atuando em diferentes locais do cérebro. Este mecanismo foi descrito como *resetting techniques* supostamente capazes de interferir nas ondas epiléticas de modelos neuronais (HAUPTMANN et al., 2005, p. 463-470). Outro comentário pertinente é a relação descrita entre receptores para o neurotransmissor GABA (subunidade GABA-A) e as oscilações gama, na qual a perda induzida destas subunidades alterou o perfil oscilatório gama possivelmente por ação do GABA em receptores extra-sinápticos (TOWERS, 2004, p.721-728).

5.2.3 Descargas de alta frequência e padrão comportamental

Em relação às crises comportamentais, foi observado que elas foram, em todos os casos, precedidas e acompanhadas por descargas de alta frequência e com altos valores absolutos de correlação entre os hipocampos. O padrão de frequência apresentou uma queda no decorrer das crises epiléticas o que sugere serem as altas frequências necessárias apenas para o início, mas não para a manutenção das mesmas.

As altas frequências e altas correlações estiveram presentes nos hipocampos

desde os estágios iniciais do processo de *kindling* hipocampal, entretanto seus níveis máximos foram registrados apenas quando as crises epiléticas generalizadas foram desencadeadas. Outro dado relevante é a ocorrência da propagação das altas frequências para os neocórtices frontais que somente ocorreu com a chegada das crises epiléticas. Em EEGI registrados através de eletrodo hipocampal profundo em pacientes em investigação pré-operatória para amigdaló-hipocampectomia, descargas espontâneas de alta frequência foram espontaneamente registradas (*ripples* e *fast ripples* de 200-500 Hz), bem como no modelo de epilepsia induzida por kainato intrahipocampal em ratos (BRAGIN et al., 1999, p. 129-137). Estes dados sugerem que as altas frequências e altas correlações são fatores de suma importância no processo da epileptogênese no modelo de *kindling* hipocampal.

6. CONCLUSÕES

Com este estudo concluiu-se que:

- A) O sistema computacional *Spike2* é adequado para a confecção e análise do modelo de *kindling* hipocampal dorsal em Ratos Wistar, sendo capaz de registrar simultaneamente o EEGI e o padrão comportamental e oferecer ferramentas analíticas pertinentes ao modelo.

- B) O sistema computacional *Matlab* 6.5 é adequado para a análise do EEGI obtido através do modelo de *kindling* hipocampal dorsal em ratos Wistar, permitindo o estudo detalhado do conteúdo de freqüência e correlação linear entre os canais do EEGI.

- C) A presença de altas freqüências e o acoplamento de ambos os hipocampos desempenham papel importante na epileptogênese do modelo de *kindling* hipocampal dorsal em ratos Wistar e descargas de freqüência gama apresentam intensa associação com o término das pós-descargas primárias deste modelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSCOMBE, F. J. Graphs in statistical analysis. **American Statistician**, v. 27, p. 17–21, 1973.

ASCHENBRENNER-SCHEIBE, R. et al. A Evaluation of a nonlinear method for the prediction of epileptic seizures. **Brain**, Freiburg, v. 126, p. 2616-2626, December 2003.

BENABID, A.L. et al. Antiepileptic effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus (corpus luyisi) in a case of medically intractable epilepsy caused by focal dysplasia: a 30-month follow-up. **Neurosurgery**, v. 50, p. 1385-91, June 2002.

BENNETT, M.V.; ZUKIN, R.S. Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain. **Neuron**, v. 41, p. 495-511, February 2004.

BOON, P. et al. D. Deep brain stimulation in patients with refractory temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, p. 1551-60, Aug 2007.

BOVEN, K.H.; AERTSEN, A. Dynamics of activity in neuronal networks give rise to fast modulations of functional connectivity. In: ECKMILLER, R.; HARTMANN, G.; HAUSKE, G. (Eds.) **Parallel Processing in Neural Systems and Computers**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 53-56.Ã.

BRAGIN, A.; ENGEL Jr., J.; WILSON, C.L.; FRIED I.; MATHERN, G.W. Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100-500 hz) in human epileptic brain and in kainic acid-treated rats with chronic seizures. **Epilepsia**, v. 40, p. 127-137, 1999.

BURNHAM, W. M. Primary and "transfer" seizure development in the kindled rat. **Can.J.Neurol.Sci**, v. 2, p. 417-428, 1975.

BUZSÁKI, G.; HORVÁTH, Z.; URIOSTE, R.; HETKE, J.; WISE, K. High frequency network oscillation in the hippocampus. **Science**, v. 256, p. 1025-1027, 1992.

CHAPIN, J.K.; MOXON, K.A. Neural Prostheses for Restoration of Sensory and Motor Function. In: **Series Frontiers in Neuroscience**. Boca Raton (USA): CRC press, 2000. v. 4.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY: proposal of revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, New York, v.30, p. 389-399, 1989.

COOPER, I.S. et al. Safety and efficacy of chronic stimulation. **Neurosurgery**, v. 1, p. 203-205, September-October 1977.

DIESMANN, M.; GEWALTIG, M.-O.; AERTSEN, A. Stable propagation of synchronous spiking in cortical neural networks. **Nature**, v. 402, p. 529-533, December 1999.

DITTRICH, H. et al. Relevanz der Klassifikation iktualer Muster in einer EEGI-Datenbank für die Entwicklung und Evaluation von Algorithmen zur automatisierten Detektion von Anfallsmustern. **Klin Neurophysiol**, v.34, p. A8, 2003.

DOUGLAS FIELDS, R.; STEVENS-GRAHAM, B. New Insights into Neuron-Glia Communication. **Science**, v. 298, p. 556-562, October 2002.

ENGEL Jr., J. Concepts of epilepsy. **Epilepsia**, New York, v.36 (suppl 1), p. s23-s29, 1995.

FALCONER, M.A.; TAYLOR D.C. Surgical treatment of drug-resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis: etiology and significance. **Archives of Neurology**, Cleveland, v.19, n.4, p. 353-61, Oct. 1968.

FERNANDES J.G. et al. Prevalence of epilepsy: the porto Alegre study. **Epilepsia**, New York, v.33 (suppl 3), p. 132, 1992.

GAYEN, A. K. The frequency distribution of the product moment correlation coefficient in random samples of any size draw from non-normal universes". **Biometrika**, v. 38, p. 219–247, 1951.

GEORGE, R. ; SALINSKY, M. ; KUZNIECKY, R. et al. Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures. 3. Long-term follow-up of first 67 patients exiting a controlled study. First International Vagus nerve stimulation study group. **Epilepsia**, v. 35, p. 637-643, May-June 1994.

GEWALTIG, M.O.; DIEMANN, M.; AERTSEN, A. Propagation of cortical synfire-activity: Survival probability in single trials and stability in the mean. **Neural Networks**, v. 14, p. 657-673, July-September 2001.

GODDARD, G. V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, v. 214, p.1020-1021, 1967.

GODDARD, G. V.; MCINTYRE, D. C.; LEECH, C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exp.Neurol**, v. 25, p. 295-330, 1969.

GOLOMB, D.; AMITAI, Y. Propagating neuronal discharges in neocortical slices: computational and experimental study. **J Neurophysiol**, p. 78, v. 1199-1211, September 1997.

GRACE, G. M.; CORCORAN, M. E.; Skelton, R. W. Kindling with stimulation of the dentate gyrus. I. Characterization of electrographic and behavioral events. **Brain Res**, v. 509, p. 249-256, 1990.

HAUPTMANN, C.; POPOVYCH, O.; TASS, P.A. Effectively desynchronizing deep brain stimulation based on a coordinated delayed feedback stimulation via several sites: a computational study. **Biol. Cybern**, v. 93, p. 463-470, 2005.

JACKSON, G.D. New techniques in magnetic resonance and epilepsy. **Epilepsia**, New York, v.35 (suppl 6), p. s2-s13, 1994.

JERGER, K.; SCHIFF, S.J. Periodic pacing an in vitro epileptic focus. **J Neurophysiol**, v. 73, p. 876-879, February 1995.

KNOTT, T. et al. Long term monitoring of in vitro epileptogenesis in organotypic hippocampal slices using a MEA. **Soc Neurosci Abstr**, v. 25, p. 539, 1999.

KNOTT, T. et al. Propagation of epileptic activity in organotypic hippocampal slices is accompanied by wave-form sharpening of the population spike. In: ELSNER, N.; EYSEL, U. (Eds.) **Göttingen Neurobiology Report**. Stuttgart: Thieme, 1999, p 538.

KNOTT, T. et al. Synchronization in propagating epileptiform population spikes in organotypic hippocampal slices. In: HÄMMERLE, H.; LEIBROCK, C. (Eds.) **Substrate-Integrated Microelectrode Arrays: Hard-, Soft- and Wetware**. Reutlingen: Abstr Internat Conf NMI, 2000. p. 22.

LERNER-NATOLI, M.; HASHIZUME, A.; RONDOUIN, G.; BALDY-MOULINIER, M. Wet-dog shaking behavior in rats in hippocampal kindling. **C.R.Seances Soc.Biol.Fil**, v. 177, p. 93-101, 1983.

LESSER, R.P. et al. Brief bursts of pulse stimulation terminate afterdischarges caused by cortical stimulation. **Neurology**, v. 53, p. 2073-2081, December 1999.

LEUNG, L.S.; ZHAO, D.; SHEN, B. Long-lasting effects of partial hippocampal kindling on hippocampal physiology and function. **Hippocampus**, v. 4, p. 696-704, 1994.

LEUNG, L.S.; SHEN, B. Hippocampal partial kindling decreased hippocampal GABA_B receptor efficacy and wet dog shakes in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 173, p. 274-281, 2006.

LEUNG, L.W. Hippocampal electrical activity following local tetanization. I. Afterdischarges. **Brain Res**, v. 419, p. 173-187, 1987.

LITT, B.; ECHAUZ J. Prediction of epileptic seizures. **Lancet Neurology**, v. 1, p. 22-30, May 2002.

LODDENKEMPER, T. et al. Deep brain stimulation in epilepsy. **J Clin Neurophysiol**, v. 18, p. 514-532, November 2001.

LOPES DA SILVA, F . EEGI Analysis: theory and practice. In: NIEDERMEYER, E.; LOPES DA SILVA, F , (Eds.) **Electroencephalography: basic principles, clinical applications and related fields**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p.

1207-1214.

LOTHMAN, E.W. The neurobiology of epileptiform discharges. *Am J EEGI Technol*, v. 33, p. 93-112, 1993.

MAIWALD, T. et al. Comparison of three nonlinear seizure prediction methods by means of the seizure prediction characteristic. **Physica D**, v. 194, p. 357-368, July 2004.

MARINO Jr.,R.; CUKIERT,A.; PINHO, E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo: um estudo de prevalência. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.44, n.3, p. 243-254, Set. 1986.

MCINTYRE, D. C. Differential amnestic effect of cortical vs. amygdaloid elicited convulsions in rats. **Physiol Behav**, v. 5, p.747-753, 1970.

MCINTYRE, D. C. Effects of focal vs generalized kindled convulsions from anterior neocortex or amygdala on CER acquisition in rats. **Physiol Behav**, v. 23, p. 855-859, 1979.

MCINTYRE, D. C.; KELLY, M. E. Are differences in dorsal hippocampal kindling related to amygdala-piriform area excitability? **Epilepsy Res**, v. 14, p. 49-61, 1993.

MCINTYRE, D. C.; Kelly, M. E.; Dufresne, C. Fast and Slow amygdala kindling rat strains: comparison of amygdala, hippocampal, piriform and perirhinal cortex kindling. **Epilepsy Res**, v. 35, p.197-209, 1999.

MCNAMARA, J. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. **Ann Neurol**, v. 16 (S), p. 72-76, 1984.

MEHRING, C. et al. Activity dynamics and propagation of synchronous spiking in locally connected random networks. **Biol Cybern**, v. 88, p. 395-408, May 2003.

MEIER, R.; HÄUSSLER, U.; AERTSEN, A.; DERANSART, C.; DEPAULIS, A.; EGERT, U. Short term changes in bilateral hippocampal coherence precede epileptiform events. **Neuroimage**, v. 38, p.138-149, 2007.

MORRELL, F.; WHISLER, W.W.; BLECK, T.P. Multiple subpial transaction: a new approach to the surgical treatment of focal epilepsy (see comments). **Journal Neurosurgery**, v.70, p. 231-239, 1989.

MOTAMEDI, G.K. et al. Optimizing parameters for terminating cortical afterdischarges with pulse stimulation. **Epilepsia**, v. 43, p. 836-846, August 2002.

PAXINOS, G. The rat nervous system. San Diego: **Academic Press**, 2004, p.443-486.

PAXINOS G.; WATSON C. The rat brain: in stereotaxic coordinates. **Elsevier Inc**, v. 1, 6th Ed., 2007.

PINEL, J.P.J.; MUCHA, R. F.; PHILIPS, A. G. Spontaneous seizures generated in rats by kindling: a preliminary report. **Physiol Psychol**, v. 3, p. 127-129, 1975.

PINEL J.P.; ROVNER L.I. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. **Exp Neurol**. V.15, 58(2), p.190-202, Jan 1978.

RACINE R.J.; ROSE P.A.; BURNHAM M.W. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. **Can J Neurol Sci**, v.4, p.273-278, April 1972.

RACINE; R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol**. 32 (3):281-294, 1972.

SEMAH, F. et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? **Neurology**, Cleveland, v.51, n.5, p. 1256-1262, Nov. 1998.

SHORVON, S.D. Epidemiologia, classificação, história natural e genética da epilepsia. Em: **Epilepsia**. Tradução de: Jaderson Costa da Costa. São Paulo: Biogalênica Ciba-

Geigy, 1992, p.3-13

THEODORE, W.H.; FISHER, R.S. Brain stimulation for epilepsy. **Lancet Neurol**, v. 3, p. 111-118, February 2004.

TOWERS, S.K. et al. Alpha 5 subunit-containing GABAA receptors affect the dynamic range of mouse hippocampal kainate-induced gamma frequency oscillations in vitro. **J Physiol**, v. 559, p.721-728, Sep 2004.

TRAUB, R.D.; JEFFERYS, J.G. Simulations of epileptiform activity in the hippocampal CA3 region in vitro. **Hippocampus**, v. 4, p. 281-285, June 1994.

TRAUB, R.D. et al. A possible role for gap junctions in generation of very fast EEGI oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating, seizures. **Epilepsia**, v.42, p.153-170, February 2001.

VELASCO, M. et al. Subacute electrical stimulation of the hippocampus blocks intractable temporal lobe seizures and paroxysmal EEGI activities. **Epilepsia**, v. 1, p. 158-169, February 2000.

VELASCO, F. et al. Electrical stimulation for epilepsy: stimulation of hippocampal foci. **Stereotact Funct Neurosurg**, v. 77 (1-4), p. 223-227, 2001.

VESPER, J. et al. Chronic High-Frequency Deep Brain Stimulation of the STN/SNr for Progressive Myoclonic Epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, p. 1984-1989, Oct 2007.

VOLCY GOMEZ M. Mesial temporal lobe epilepsy: its physiopathology, clinical characteristics, treatment and prognosis. **Rev Neurol**, v. 38 , p. 663-667, April 2004.

VONCK, K. et al. Long-term amygdalohippocampal stimulation for refractory temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**, v. 52, p. 556-565, November 2002.

WADA, J. A.; OSAWA, T. Spontaneous recurrent seizure state induced by daily electric amygdaloid stimulation in Senegalese baboons (*Papio papio*). **Neurology**, v. 26, p. 273-286, 1976.

WATSON, C. et al. Anatomic basis of amygdaloid and hippocampal volume measurement by magnetic resonance imaging. **Neurology**, Cleveland, v.42, p.1743- -1750, Sep.1992.

WENDLING, F.; HERNANDEZ, A.; BELLANGER, J.J.; CHAUVEL, P.; BARTOLOMEI, F. Interictal to ictal transition in human temporal lobe epilepsy: insights from a computational model of intracerebral EEGI. **J Clin Neurophysiol**, v. 22, p. 343-356, 2005.

WINTERHALDER, M. et al. The seizure prediction characteristic: a general framework to assess and compare seizure prediction methods. **Epil Behav**, v. 4, p. 318-325, June 2003.

ZUMSTEG, D.; LOZANO, A.M.; WENNBERG, R.A. Mesial temporal inhibition in a patient with deep brain stimulation of the anterior thalamus for epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, p. 1958-62, Nov 2006.

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGENS

Dear Joacir Cordeiro,

Thank you for your message. I grant you the permission to use the MR image in my article that was published in Epilepsia with references below.

Deep brain stimulation for refractory epilepsy
BOON P, VONCK K, DE HERDT V, VAN DYCKE A, GOETHALS M, GOOSSENS L, VAN
ZANDIJCKE M, DE SMEDT T, DEWAELE I, ACHTEN R, WADMAN W, DEWAELE F, CAEMAERT
J, VAN ROOST D
Epilepsia 2007;48:1551-1560

Best regards and wishing you success in you research efforts.
Prof. Paul Boon

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: Joacir Cordeiro [<mailto:joacir.cordeiro@uniklinik-freiburg.de>]

Verzonden: dinsdag 6 november 2007 17:00

Aan: Paul.Boon@UGent.be

Onderwerp: UNIKLINIK FREIBURG - Dr. Schulze-Bonhage

ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGENS



Dear Dr Cordeiro,

THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES, 2 figures only

We hereby grant you permission to reprint the material above at no charge **in your thesis** subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year).”

3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. Permission excludes use in an electronic form other than submission. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
6. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Kind regards

Laura Steward

Laura Steward

Rights Assistant

Elsevier Ltd.

Tel: +44 (0) 1865 843517

Fax: +44 (0) 1865 843950

This email is from Elsevier Limited, a company registered in England and Wales with company number 1982084, whose registered office is The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom.

ANEXO 3 - SUPORTE FINANCEIRO

O projeto foi desenvolvido na *Uniklinik- Freiburg* (Universidade de *Freiburg*, Alemanha) em cooperação com a Universidade Federal do Paraná pelo autor desta e o Dr. Alberto Capurro (pós-doutorando do *Freiburger Bernstein Center for Computational Neuroscience -FBCCN*), sob a supervisão do Prof. Dr. Andreas Schulze-Bonhage (chefe do departamento de epilepsia da *Uniklinik-Freiburg*) e Prof. Dr. Ad Aertsen (*FBCCN*), sob a orientação do Prof. Dr. João Cândido Araújo e Prof. Dr. Jorge E. Fouto Matias e financiado pelo *Bundesministerium für Bildung und Forschung - BMBF* (*Grant 01GQ0420 - BCCN-Freiburg*).