

**JOACIR GRACIOLLI CORDEIRO**

**MODULAÇÃO DA EXCITABILIDADE POR MEIO DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL  
DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA NO MODELO DE *KINDLING* HIPOCAMPAL**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, 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. Antônio Carlos L. Campos

**CURITIBA  
2012**

C794

Cordeiro, Joacir Gracioli.

Modulação da excitabilidade por meio da estimulação cerebral de alta e baixa frequência no modelo de *kindling* hipocampal / Joacir Gracioli Cordeiro. – Curitiba, 2012.

78 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. João Cândido Araújo.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica-Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Excitação neurológica. 2. Epilepsia do lobo temporal. 3. Estimulação encefálica profunda. 4. Hipocampo - estimulação elétrica.  
I. Título. II. Araújo, João Cândido.

NLM: WL 102

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

A meus pais e irmão que fizeram de mim alguém... alguém cujo amor a Deus e à  
família é o bem maior que possuí.

À Francine e Ricardinho por terem trazido ainda mais alegria e paz para a família.

## AGRADECIMENTOS

Ao Pai, por ter-nos concedido, em seu amor e bondade infinitos, a graça da vida com a chance de buscarmos o crescimento a cada nascer do sol.

Ao Prof. Dr. João Cândido Araújo, chefe do serviço de neurocirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), não somente por orientar a confecção desta obra, mas por ser farol e exemplo em minha formação neurocirúrgica.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos, coordenador do Programa de Pós - Graduação em Cirurgia da UFPR, pelo apoio e pelas valiosas sugestões na realização deste trabalho.

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

Respeitosamente aos animais que foram testados e sacrificados na busca de um melhor tratamento para os pacientes portadores de epilepsia.

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	vi
<b>LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS .....</b>	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	x
<b>RESUMO .....</b>	xii
<b>ABSTRACT.....</b>	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	1
1.1 JUSTIFICATIVA.....	2
1.2 OBJETIVOS.....	2
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	3
2.1 ELETROFISIOLOGIA DAS DESCARGAS ICTAIS.....	3
2.2 O PAPEL DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL.....	4
2.3 EPILEPSIA TEMPORAL: MODELO ANIMAL.....	6
2.4 A INFORMÁTICA NO MODELO DE <i>KINDLING</i> HIPOCAMPAL.....	11
2.5 DEPRESSÃO DE LONGA DURAÇÃO.....	12
2.6 PARADIGMA DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL DESINCRONIZANTE.....	16
2.7 NEUROESTIMULAÇÃO NA ELT: ESTUDOS EM HUMANOS.....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	18
3.1.1 Critérios de inclusão.....	19
3.1.2 Critérios de exclusão.....	19
3.2 PREPARAÇÃO DO ANIMAL.....	19
3.3 CAPTAÇÃO E PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	25
3.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL.....	27
3.4.1 Indução do <i>kindling</i> hipocampal.....	27
3.4.2 Determinação do limiar de pós-descarga.....	29
3.4.3 Protocolos de estimulação cerebral contínua (ECC) .....	30

3.4.4 Sistema de estimulação cerebral contínua.....	32
3.5 CRONOGRAMA REFERENTE À ECC.....	34
3.6 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE <i>KINDLING</i> E DA ECC .....	34
3.6.1 Avaliação eletrofisiológica.....	34
3.6.2 Avaliação comportamental.....	35
3.7 ESTUDO HISTOLÓGICO.....	35
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 DADOS REFERENTES À POPULAÇÃO.....	37
4.2 ANÁLISE DO LIMIAR DE TOLERÂNCIA DA ECC.....	33
4.3 ANÁLISE DO LIMIAR DE PÓS-DESCARGA (ADT).....	38
4.4 ANÁLISE DA DURAÇÃO DAS AD.....	45
4.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	52
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
5.1 DISCUSSÃO DOS ACHADOS REFERENTES À AQUISIÇÃO DO <i>KINDLING</i> HIPOCAMPAL.....	
.. 57	
5.1.1 Registro eletrofisiológico .....	57
5.1.2 Padrão comportamental.....	58
5.2 DISCUSSÃO DOS ACHADOS REFERENTES À ECC.....	
58	
5.2.1 Análise da ECC de alta frequência.....	58
5.2.2 Análise da ECC de baixa frequência.....	61
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGEM.....</b>	<b>75</b>

<b>ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGEM.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGEM.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 4 – SUPORTE FINANCEIRO.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – IMAGEM DE RESSONÂNCIA EVIDENCIANDO A LOCALIZAÇÃO DOS ELETRODOS PARA ESTIMULAÇÃO TEMPORAL MESIAL.....	5
FIGURA 2 – DESENHO REPRESENTANDO A LOCALIZAÇÃO DO ELETRODO PARA ESTIMULAÇÃO SUBTALÂMICA.....	6
FIGURA 3 – PREPARADO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VISTA SAGITAL DO HIPOCAMPO DO RATO WISTAR.....	8
FIGURA 4 – REGISTRO DE LFP DE UMA SESSÃO DE ESTÍMULO NO HIPOCAMPO DORSAL.....	9
FIGURA 5 – SEGMENTO DO REGISTRO DE LFP DE UMA SESSÃO DE <i>KINDLING</i> COM O PADRÃO DE DUAS WDS.....	10
FIGURA 6 – FOTOGRAFIA DA CÂMARA PARA A INDUÇÃO ANESTÉSICA COM ISOFLUORANO.....	20
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DO LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DO TETRODO PARA ESTIMULAÇÃO DO HIPOCAMPO DIREITO EM CORTE CORONAL DO CÉREBRO.....	22
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DO LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DO TETRODO HIPOCAMPAL EM CORTE SAGITAL DO HEMISFÉRIO DIREITO.....	23

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DO LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS MONOPOLARES PARA REGISTRO HIPOCAMPAL EM CORTE CORONAL DO CÉREBRO.....	24
FIGURA 10 - FOTOGRAFIA DE DOIS RATOS EVIDENCIANDO O ASPECTO FINAL DO IMPLANTE CRANIANO.....	25
FIGURA 11 – FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO PARA O REGISTRO DE LFP.....	26
FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE REGISTRO SIMULTÂNEO DE LFP E PADRÃO COMPORTAMENTAL. ....	27
FIGURA 13 – FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO PARA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL.....	28
FIGURA 14 – REGISTRO DO PADRÃO COMPORTAMENTAL APÓS A ESTIMULAÇÃO CEREBRAL.....	29
FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO DO ESTÍMULO UTILIZADO PARA A ECC APLICADA ATRAVÉS DO PAR DE CONTATOS EXTERNOS DO TETRODO HIPOCAMPAL.....	31
FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO DO ESTÍMULO UTILIZADO PARA A ECC APLICADA ATRAVÉS DOS QUATRO PARES DE CONTATOS DO TETRODO HIPOCAMPAL.....	32
FIGURA 17 – FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO CEREBRAL CONTÍNUA.....	33
FIGURA 18 - ESPECTROGRAMA DE FREQUÊNCIA ILUSTRANDO A DETERMINAÇÃO DA DURAÇÃO DA AD.....	35

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

TABELA 1 – ESCALA COMPORTAMENTAL DE RACINE PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS.....	11
TABELA 2– RELAÇÃO DA AMPLITUDE DA ECC APLICADA EM CADA ANIMAL DO EXPERIMENTO.....	38
TABELA 3– RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO CONTROLE.....	39
GRÁFICO 1– MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO CONTROLE.....	39
TABELA 4 – RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO HFS2C. ....	40
GRÁFICO 2– MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO HFS2C.....	40
TABELA 5 – RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO HFS4C. ....	41
GRÁFICO 3– MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO HFS4C.....	41
TABELA 6 – RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO LFS2C. ....	42
GRÁFICO 4– MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO LFS2C.....	42
TABELA 7– RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO LFS4C. ....	44
GRÁFICO 5– MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO LFS4C.....	44
TABELA 8 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO CONTROLE.....	45
GRÁFICO 6 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO CONTROLE.....	46
TABELA 9 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO HFS2C.....	47

GRÁFICO 7 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO HFS2C.....	47
TABELA 10 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO HFS4C.....	48
GRÁFICO 8 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO HFS4C.....	49
TABELA 11 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO LFS2C.....	50
GRÁFICO 9 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO LFS2C.....	50
TABELA 12 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO LFS4C.....	51
GRÁFICO 10 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO LFS4C.....	51
GRÁFICO 11 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO CONTROLE.....	52
GRÁFICO 12 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO HFS2C.....	53
GRÁFICO 13 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO HFS4C.....	54
GRÁFICO 14 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO LFS2C.....	55
GRÁFICO 15 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO LFS4C.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1AD	- pós-descarga(s) primária(s)
2AD	- pós-descarga(s) secundária(s)
AD	- pós-descarga(s)
ADs	- pós-descargas
ADT	- limiar de pós-descarga
DG	- descarga(s) gama
DP	- desvio padrão
ECC	- estimulação cerebral contínua
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
HFS	- estimulação de alta frequência
HFS2C	- estimulação de alta frequência por dois contatos
HFS4C	- estimulação de alta frequência por quatro contatos
LFP	- <i>local field potentials</i>
LFS	- estimulação de baixa frequência
LFS2C	- estimulação de baixa frequência por dois contatos

LFS4C	- estimulação de baixa frequência por quatro contatos
LT	- lobo temporal
LTD	- depressão de longa duração
p	- nível de significância
PPD	- potenciais paroxísticos de despolarização
WDS	- <i>wet dog shakes</i>

## RESUMO

Há relatos de que estimulação de baixa e alta frequência (LFS e HFS, respectivamente) modifica as características de crises convulsivas em ratos. Nesta tese se relata os efeitos de LFS e HFS aplicadas em dois ou quatro locais em ratos com o processo de *kindling* completo.

Os ratos foram submetidos a um processo de *kindling* através de um tetrodo hipocampal até a plena aquisição do mesmo. Animais com limiar de pós-descarga (AD) estável foram randomicamente divididos em cinco grupos. Estimulação a 1 Hz (LFS) ou 130 Hz (HFS) foi continuamente aplicada por sete dias através de dois ou quatro contatos intrahipocampais. Um grupo controle não recebeu estimulação. Estimulação aplicada por meio de quatro contatos foi realizada de maneira rotatória, sendo alternada entre os pares de contatos. Os efeitos da estimulação no limiar de AD, duração da AD e padrão comportamental das crises convulsivas foram avaliados. A LFS de quatro contatos elevou consistentemente o limiar de AD por um período de dois dias a duas semanas, enquanto a HFS de quatro contatos diminuiu significativamente a duração da AD, 24 horas após o término da estimulação. Nenhuma modificação significativa foi observada com os paradigmas de estimulação de dois contatos. Nenhuma modificação relevante no padrão comportamental das crises convulsivas foi observado.

Estes achados sugerem que o efeito da estimulação hipocampal depende da topografia e da frequência da estimulação. LFS e HFS apresentaram efeitos antiepilépticos na pós-descarga quando aplicadas de forma rotatória. Isto suporta a aplicação dos conceitos de estimulação composta a fim de se induzir dessincronização e efeitos anti-*kindling* no sistema neural.

Palavras-chave: *kindling* hipocampal, epilepsia temporal, estimulação hipocampal, estimulação cerebral profunda, estimulação cerebral de baixa frequência, estimulação cerebral de alta frequência.

## ABSTRACT

Low- and high-frequency stimulation (LFS, HFS, respectively) have been reported to modify seizure characteristics in rats. We here report effects of hippocampal LFS and HFS applied at two or four sites in fully kindled rats.

Rats were kindled through a hippocampal tetrode until the fully kindled state. Animals with stable afterdischarge (AD) threshold were randomly assigned to 5 groups; stimulation at 1 Hz (LFS) or 130 Hz (HFS) was continuously applied for seven days at 2 or 4 intrahippocampal sites; a control group received no stimulation. Four-contact stimulation was performed in a rotating fashion, alternated between pairs of contacts. Stimulation effects on AD threshold, AD duration and behavioural seizures were assessed.

Four-contact LFS consistently increased AD threshold for a period of 2 days to 2 weeks, whereas 4-contact HFS significantly decreased AD duration 24 hours following the stimulation period. No significant AD modification was observed with either 2-contact stimulation paradigms. No behavioural alteration occurred in any group.

These findings suggest that effects of hippocampal stimulation depend on frequency and topography of stimulus application. LFS and HFS had anti-epileptic effect on afterdischarges when applied in a rotating pattern. This supports concepts on patterned stimulation to result in desynchronization and anti-kindling effects.

Key-words: hippocampal kindling, temporal epilepsy, hippocampal stimulation, deep brain stimulation, low-frequency brain stimulation, high-frequency brain stimulation.

## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia constitui uma das patologias cerebrais mais frequentes no mundo (ENGEL Jr., 1995) e acomete cerca de 1 a 2% da população (JACKSON, 1994). 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) e a prevalência é de aproximadamente 15 a 18 pessoas para cada mil (VOLCY GÓMEZ, 2004). 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), na região de Campinas 9,2 por mil habitantes (NORONHA et al., 2007) 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).

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). 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) 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).

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; SEMAH et al. 1998; VOLCY GÓMEZ, 2004). Nos pacientes com indicação, a microcirurgia (resseção das áreas epileptogênicas) representa uma alternativa terapêutica podendo controlar as crises epilépticas em 67 a 85% dos casos, restando uma substancial população de pacientes ainda refratária ao tratamento (MORRELL; WHISLER; BLECK, 1989; VOLCY GÓMEZ, 2004). 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; COOPER et al., 1977; GEORGE et al., 1994; LODDENKEMPER et al., 2001; THEODORE e FISHER, 2004).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Na busca de maior eficácia é primordial se compreender mais detalhadamente os fatores que possam influenciar no efeito da EEC na ELT. Com este intuito empregou-se sistemas computacionais avançados (*Spike2* e *Matlab* 6.5) no estudo sistemático de diferentes paradigmas de EEC no modelo animal de *kindling* hipocampal buscando melhor detalhar os fatores envolvidos na modulação da excitabilidade deste modelo.

## 1.2 OBJETIVOS

- A) Estudar a utilização do sistema computacional *Spike2* na análise do efeito da EEC no modelo de *kindling* hipocampal em ratos Wistar.
- B) Estudar a utilização do sistema computacional *Matlab* 6.5 na análise do efeito da EEC no modelo de *kindling* hipocampal em ratos Wistar.
- C) Fornecer substrato para que haja melhor compreensão da fenomenologia relacionada à estimulação elétrica do foco ictal no modelo de *kindling* hipocampal 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; KNOTT et al., 2000; KNOTT et al., 1999; TRAUB e JEFFERYS, 1994; TRAUB, 2001). 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; DITTRICH et al., 2003; LOTHMAN, 1993; MAIWALD et al., 2004; WINTERHALDER et al., 2003).

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; DITTRICH et al., 2003; MAIWALD et al., 2004; WINTERHALDER et al., 2003). Em contrapartida existem mecanismos que modulam o processo, a citar o acoplamento elétrico dos neurônios inibitórios na fase de sincronização (BENNETT; ZUKIN, 2004) e o papel de células gliais na modulação excitatória (DOUGLAS FIELDS; STEVENS-GRAHAM, 2002).

Por meio do registro eletroencefalográfico de escalpe (EEG) ou invasivo é possível mapear tanto o foco epileptogênico como suas vias de propagação (BOVEN; AERTSEN, 1990; DIEMANN et al., 1999; GEWALTIG et al., 2001; KNOTT et al., 2000; MEHRING et al., 2003). Podem-se, também, reconhecer as diferentes fases que compõem a gênese da descarga ictal (ASCHENBRENNER-SCHEIBE et al., 2003; DITTRICH et al., 2003;

MAIWALD et al., 2004; WINTERHALDER et al., 2003). 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.

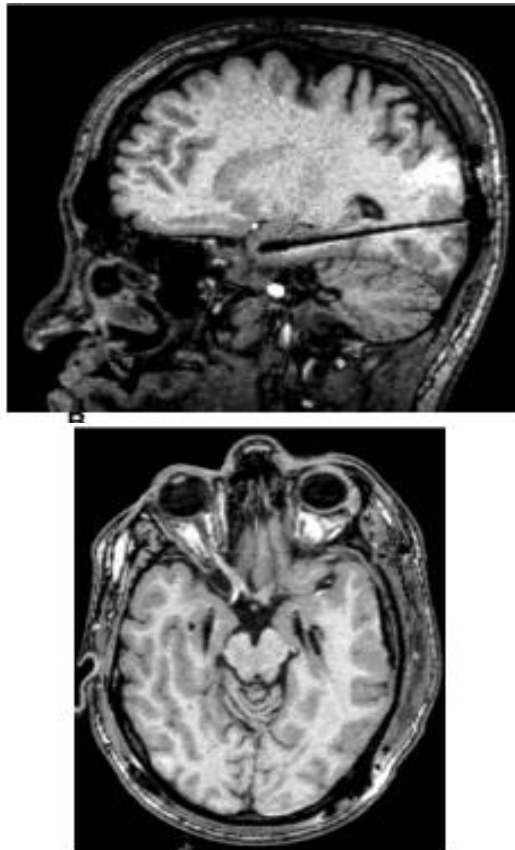
Técnicas envolvendo a estimulação elétrica cerebral (EEC) têm sido constantemente pesquisadas e sucessivos avanços têm sido obtidos. Não há, entretanto, consenso quanto ao seu uso e altos índices de eficácia não foram, até então, atingidos (BENABID et al., 2002; COOPER et al., 1977; GEORGE et al., 1994; LODDENKEMPER et al., 2001; THEODORE e FISHER, 2004).

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 e AERTSEN, 1990; DIESMANN et al., 1999; GEWALTIG et al., 2001; KNOTT et al., 2000; MEHRING et al., 2003).

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 et al., 2007; FISHER et al., 2010; MORRELL et al., 2011; LODDENKEMPER et al., 2001; SCHULZE-BONHAGE 2009; THEODORE e FISHER, 2004;

VELASCO et al., 2000; VELASCO et al., 2001; VESPER et al., 2007; VONCK et al., 2002; ZUMSTEG et al., 2006) (Figuras 1 e 2).

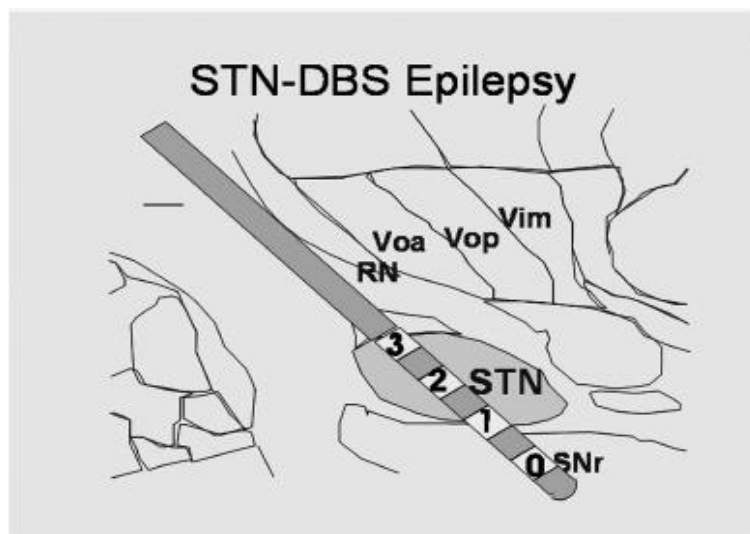
FIGURA 1 – IMAGEM DE RESSONÂNCIA EVIDENCIANDO A LOCALIZAÇÃO DOS ELETRODOS PARA ESTIMULAÇÃO TEMPORAL MESIAL



FONTE: Reproduzido de BOON. et al., 2007 com autorização (anexo um).

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: Reproduzido de VESPER et al., 2007 com autorização (anexo dois).

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.

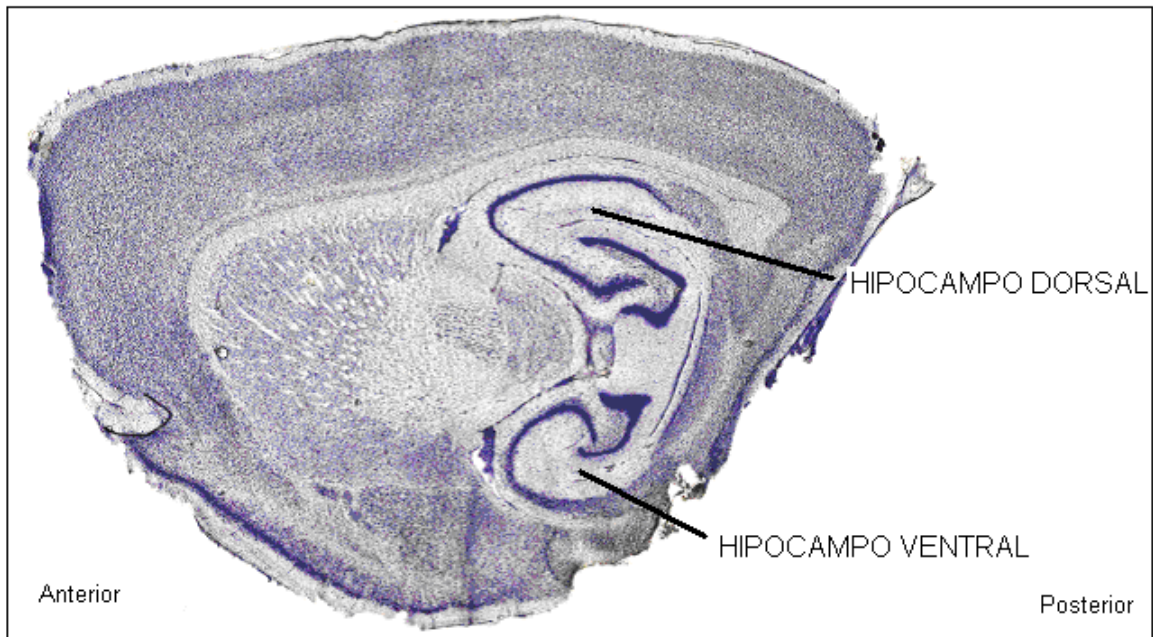
O fenômeno de *kindling* foi descrito em 1967 e desde então tem sido amplamente utilizado como modelo animal de epilepsia temporal crônica (GODDARD, 1967). O fenômeno se instala progressivamente no animal à medida que os estímulos indutores de resposta ictal são repetidos. Os estímulos elétricos são os mais frequentemente 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 frequência e com pouca reação comportamental relacionada. A complexidade dos eventos aumenta com o decorrer do processo, começam a aparecer as descargas de alta frequência 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; MCNAMARA, 1984; RACINE et al., 1972). 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 et al., 1999).

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; MCINTYRE, 1979). Nas fases mais avançadas do processo, as crises epiléticas surgem espontaneamente, ou seja, sem mais a necessidade da aplicação de estímulos desencadeantes (PINEL et al., 1975; WADA e OSAWA, 1976).

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; GRACE e CORCORAN, 1990; LEUNG, 1987; RACINE et al., 1977).

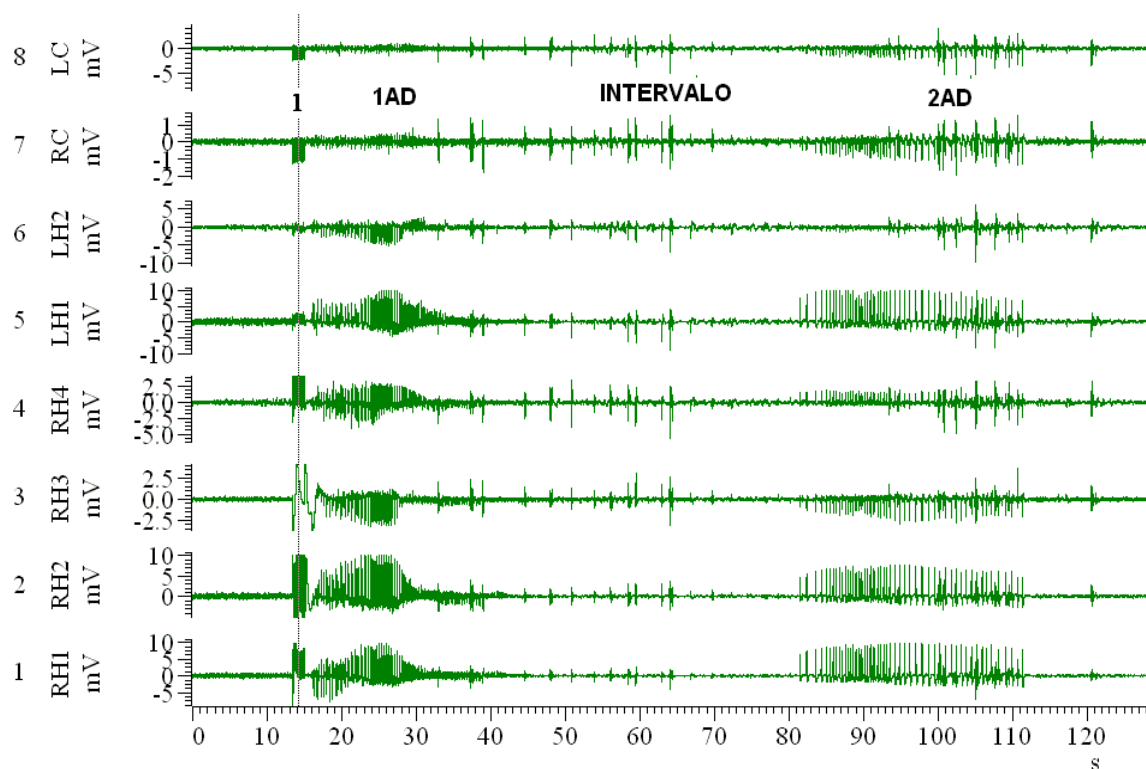
FIGURA 3 – PREPARADO ANÁTOMO-PATOLÓGICO COM VISTA SAGITAL DO HIPOCAMPO DO RATO WISTAR



FONTE: Reproduzido e adaptado de PAXINOS e WATSON, 2007 com permissão (anexo três).

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

FIGURA 4 – REGISTRO DE LFP DE UMA SESSÃO DE ESTÍMULO NO HIPOCAMPO DORSAL.

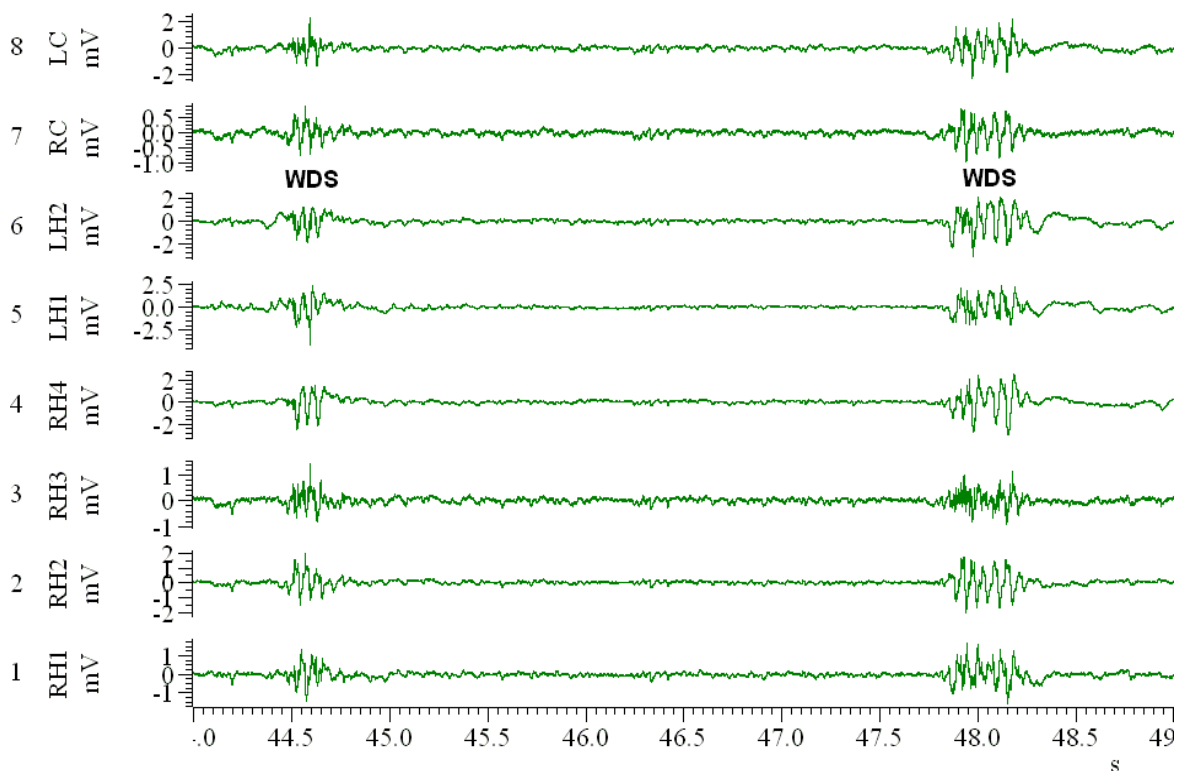


FONTE: Dados do serviço.

NOTA: Neste registro de LFP (local field potentials) é visualizado o padrão típico de uma sessão de *kindling* hipocampal dorsal. 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 frequente 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 epiléticas generalizadas (Figura 5).

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



FONTE: Dados do serviço.

NOTA: Neste segmento de LFP 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 LFP pode ser analisado segundo inúmeras variáveis como morfologia, amplitude e frequência das ondas. Já o padrão comportamental (crises epilépticas) pode ser analisado utilizando-se a escala de Racine (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 flexão-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. (RACINE, 1972).

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

<b><u>Escala Comportamental de Racine</u></b>	
<b>Estágio</b>	<b>Comportamento</b>
1	movimentos oro-alimentares
2	flexão-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

FONTE: RACINE, 1972.

NOTA: Escala comportamental de Racine pode ser utilizada para a classificação da resposta comportamental epiléptica, sendo o estágio cinco o grau de resposta mais complexa.

#### 2.4 A INFORMÁTICA NO MODELO DE *KINDLING* HIPOCAMPAL

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 de registro eletrofisiológico.

## 2.5 DEPRESSÃO DE LONGA DURAÇÃO

Depressão de longa duração (*long term depression* - LTD) é amplamente aceita como uma forma de plasticidade sináptica que depende do grau de ativação sofrido. Ela pode ser definida como a duradoura diminuição da efetividade da transmissão sináptica que ocorre por consequência de certos padrões de estimulação elétrica hipocampal. A LTD divide-se em basicamente dois tipos: heterossináptico e homossináptico. A LTD heterossináptica pode ocorrer em sinapses que são inativas, durante a HFS de uma aferência sináptica convergente. A LTD homossináptica pode ocorrer em sinapses que são ativadas por estimulação de baixa frequência. A ocorrência da LTD heterossináptica é mais robusta no giro denteado e foi descrita há mais de 25 anos, enquanto a ocorrência da LTD homossináptica é mais consistente em CA1 e foi descoberta mais recentemente (BEAR E ABRAHAM, 1996).

Em relação aos mecanismos que levam à depressão de longa duração, dados experimentais sugerem que intensa despolarização pós-sináptica e o influxo de cálcio sejam fatores importantes para a ocorrência da LTD heterossináptica. Foi descrito que o uso da bicuculina, que é um antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub> e contribui para a despolarização pós-sináptica, facilita a indução da LTD heterossináptica (ZHANG e LEVY, 1993, TOMASULO et al., 1993). Evidências colhidas com a aplicação de antagonistas dos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L demonstraram que estes promovem a inibição da ocorrência da LTD heterossináptica ao diminuírem o influxo celular do cálcio (CHRISTIE e ABRAHAM, 1994). Em relação à LTD homossináptica descreve-se que para sua ocorrência,

a ativação dos receptores NMDA (glutamatérgicos) desempenha papel relevante, uma vez que na maioria das circunstâncias a LTD homossináptica é reversivelmente bloqueada por antagonistas destes receptores (BEAR e ABRAHAM, 1996).

A ocorrência da LTD *in vivo* foi relatada por WEISS et al. com a LFS da amígdala de ratos submetidos ao modelo de *kindling* (Weiss et al., 1995 e 1998). Posteriores estudos realizados com o cérebro de ratos sugerem o envolvimento de sistemas de opióides endógenos e GABA-benzodiazepínico. Acredita-se, portanto, que ambos os sistemas atuem conjuntamente na redução das descargas epileptiformes. No experimento, LFS foi aplicada na amígdala no decorrer do processo de *kindling* durante os 15 minutos que antecederam o estímulo desencadeante. A LFS interferiu na epileptogênese prevenindo a plena aquisição do *kindling*. Um grupo de animais do mesmo experimento, que não foi submetido ao *kindling*, recebeu 40 sessões de LFS e então foram sacrificados, sendo os cérebros removidos e submetidos à análise imunohistoquímica. Um aumento na ligação dos receptores GABA-benzodiazepínicos foi verificado na amígdala basolateral, tálamo e córtex temporal contralateral. Em relação aos sistemas de opióides endógenos, observou-se uma diminuição nos valores de ligação dos receptores *mu* nos córtices sensório-motor e temporal, giro denteado de ambos os hemisférios e região CA1 do hipocampo contralateral (LÓPEZ-MERAZ et al., 2004).

## 2.6 PARADIGMA DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL DESINCRONIZANTE

O paradigma da estimulação cerebral dessincronizante paradigma foi desenvolvido baseado nos experimentos teóricos com modelos computacionais de estimulação cerebral. Nestes experimentos propôs-se a utilização da estimulação cerebral dessincronizante para o tratamento de distúrbios de movimento e epilepsia. A base para a estimulação dessincronizante foi desenvolvida em um modelo computacional de rede neuronal composta por neurônios interativos por meio de sinapses. Neste modelo foi observado que a HFS contínua, classicamente utilizada na estimulação cerebral para distúrbios de movimento,

basicamente imobiliza a atividade sináptica. Em contrapartida, técnicas de estimulação envolvendo estimulação multifocal e com o reiniciar da estimulação em diferentes momentos apresentaram um efeito global dessincronizante. Este efeito conduziu a um intenso efeito inibidor do *kindling* induzido, permitindo a rede neural a "desaprender" as profundas interações sinápticas patológicas presentes na epilepsia e em distúrbios de movimento.

Ao se estimular de forma bipolar um par de contatos a população neuronal adjacente é sincronizada ao estímulo. Ao se estimular diferentes pares de contatos a atividade da rede neural é dividida em subpopulações neuronais. Uma vez sendo os pares de contatos estimulados de forma alternada, a atividade das subpopulações é sincronizada a tempos diferentes, dessincronizando o sistema como um todo (TASS e MAJTANIK, 2006; HAUPTMANN, 2005).

## 2.7 NEUROESTIMULAÇÃO NA ELT: ESTUDOS EM HUMANOS.

Técnicas envolvendo neuroestimulação elétrica para a supressão de crises epilépticas 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; COOPER et al., 1977; GEORGE et al., 1994; LODDENKEMPER et al., 2001; THEODORE e FISHER, 2004).

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; MOTAMEDI et al., 2002; VELASCO et al., 2000; VONCK et al., 2002). A epilepsia temporal refratária pode ser controlada pela utilização da estimulação elétrica contínua ou intermitente dos focos

epilépticos hipocampais ou amigdalianos (VELASCO et al., 2007; VELASCO et al., 2001; VELASCO et al., 2000; VONCK et al., 2002). Para tal fim, é necessário o implante de dispositivos que gerem e transmitam corrente elétrica ao cérebro, os quais são controlados por programas computacionais especialmente desenvolvidos (CHAPIN e MOXON, 2000; LITT e ECHAUZ, 2002). 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; VELASCO et al., 2001; VONCK et al., 2002).

A frequência da estimulação utilizada parece ser uma característica importante para se obter a supressão da atividade epileptogênica. Estudos clínicos foram realizados com o uso de alta frequência (HFS) e baixa frequência (LFS). A utilização de HFS é definida como um mínimo de 100Hz. Na maioria dos estudos a frequência utilizada é 130 Hz devido à sua maior eficácia e menor consumo de energia, quando comparada a frequências mais elevadas. (BOON et al., 2007; MIRSKI et al., 1997; MIRSKI e FISHER, 1994; LADO et al., 2003; OSORIO et al., 2005; VELASCO et al., 2007).

Recentes estudos discorrem sobre significativa redução da frequência de crises convulsivas com a utilização da HFS hipocampal (BOON et al., 2007; OSORIO et al., 2005; VELASCO et al., 2007). BOON et al. reportou uma série de pacientes com ELT mesial refratária, os quais foram implantados com dois eletrodos quadripolares hipocampais, sendo a ponta do eletrodo mais anterior posicionado dentro da amígdala. Nos pacientes com ELT mesial bilateral foram implantados eletrodos em ambos os hipocampos (BOON et al., 2007). Pares de contatos foram continuamente estimulados a 130Hz. Após um seguimento médio de 31 meses, um paciente ficou livre de crises convulsivas, um apresentou uma redução de mais de 90%, cinco apresentaram uma redução superior a 50%; dois uma redução entre 30 e 49% e um não respondeu à estimulação. Nenhum dos pacientes relatou efeitos colaterais da estimulação.

Além da HFS contínua descrita por Boon, um paradigma de HFS cíclica foi reportado por VELASCO et al. Nesta série, três pacientes com ELT bilateral e seis com ELT unilateral foram implantados com eletrodos dirigidos ao foco hipocampal. Dois pares de contatos contíguos foram utilizados para a HFS a 130Hz de forma a envolver o foco epiléptico. A HFS foi aplicada de forma cíclica durante um minuto seguida de uma pausa de 4 minutos. O seguimento variou de 18 meses a sete anos e o resultado foi dividido em dois grupos. No primeiro grupo cinco pacientes apresentaram ressonância magnética (RM) normal e uma redução na frequência das crises convulsivas superior a 95%. No segundo grupo quatro pacientes apresentaram esclerose hipocampal à RM e uma redução na frequência das crises convulsivas 50 e 70%. Nenhum paciente demonstrou deterioração cognitiva ou apresentou efeitos colaterais. (VELASCO et al., 2007).

Paradigmas de estimulação distante do foco ictal (*remote stimulation*) têm sido intensamente investigados. FISHER et al. reportaram os resultados de seu estudo multicêntrico com HFS bilateral do núcleo talâmico anterior que envolveu 110 pacientes portadores de epilepsia focal incluindo crises com generalização secundária. Neste estudo, foram incluídos pacientes com epilepsia temporal e extra-temporal, refratários à medicação, estimulação do nervo vago e/ou ressecção. Em metade dos pacientes a HFS foi iniciada logo após a cirurgia de implante e na outra metade três meses após. A partir do quarto mês, todos os pacientes receberam estimulação. No último mês da fase inicial o grupo estimulado apresentou maior redução (29%) dos eventos ictais do que o grupo não estimulado (controle). Após dois anos houve uma redução mediana das crises epiléticas de 56%, 54% dos pacientes apresentaram uma redução de pelo menos 50% e 14 pacientes permaneceram livres de crises por pelo menos seis meses (FISHER et al., 2010).

HFS de curta duração aplicada no início da descarga ictal (*close-loop stimulation*) foi descrita por OSÓRIO et al. A interrupção das descargas ictais de forma automática utilizando HFS foi realizada em pacientes com epilepsia unifocal ou multifocal. O grupo um foi composto de sete pacientes com epilepsia unifocal, sendo a HFS aplicada diretamente

ou próxima ao foco ictal (*local-close-loop stimulation*). O grupo dois foi composto de seis pacientes com epilepsia multifocal e a HFS foi aplicada em ambos os núcleos talâmicos anteriores (*remote-close-loop stimulation*). No grupo um a HFS foi composta de 1 segundo de estimulação podendo ser repetido se necessário e no grupo dois a HFS foi composta de 30 segundo de estimulação. Quatro pacientes do grupo um apresentaram uma redução média na frequência das descargas ictais de 55.5% e três pacientes uma redução média de 86%. No grupo dois, quatro pacientes apresentaram uma redução média na frequência das descargas ictais de 40.8% e dois pacientes uma redução média de 74.3%. Nenhum efeito colateral foi reportado durante o período do estudo (OSÓRIO et al, 2005). Outro exemplo de *close-loop stimulation* é a estimulação cortical responsiva. Baseado nesta técnica, 191 pacientes portadores de epilepsia parcial foram implantados em seus focos epiléticos com eletrodos conectados a um neuroestimulador capaz de reconhecer atividade cortical anormal e desencadear a estimulação. O grupo de pacientes estimulados (N=97) apresentou uma redução na frequência de crises convulsivas na ordem de 37,9%, já o grupo que não recebeu estimulação (N=94) apresentou uma redução de apenas 17,3% (p=0,012). Nenhum dos pacientes apresentou piora da função cognitiva ou alteração de humor (MORRELL, 2011).

Estudos envolvendo o uso da LFS são geralmente realizados com a frequência em torno de 1Hz. A LFS foi significativamente menos empregada em pacientes epiléticos é quando comparada à HFS. YAMAMOTO et al. investigou o efeito da LFS cortical, aplicada por eletrodos subdurais, em um paciente com ELT mesial refratária por meio da quantificação das descargas epileptiformes interictais desencadeadas. LFS a 0.9 Hz foi aplicada e observou-se uma redução do número de descargas interictais quando estas foram desencadeadas após a aplicação da LFS a 0.5 mA (YAMAMOTO et al., 2002). KINOSHITA et al. relatou o efeito da LFS cortical em quatro pacientes com epilepsia neocortical e mesial temporal. LFS a 0.9 Hz foi aplicada durante 15 minutos na área epileptogênica e o resultado foi uma redução no número de pontas desencadeadas e um

discreto decréscimo na intensidade na banda de frequência entre 12 e 14 Hz (KINOSHITA et al., 2005). SCHRADER et al. publicou sua experiência relacionada ao uso da LFS em um paciente em estado de mal epiléptico refratário. Após três meses de estado de mal epiléptico o paciente foi submetido ao implante de eletrodos subdurais e cinco áreas epileptogênicas independentes foram identificadas. LFS cortical foi diariamente aplicada durante 30 minutos. Após o primeiro dia de estimulação um agente anestésico pôde ser descontinuado e as descargas ictais apenas retornaram no quarto dia quando a dose do segundo anestésico foi diminuída. Nesta ocasião as descargas ictais foram visualizadas em apenas um dos cinco focos prévios. (SCHRADER et al., 2006).

Em pacientes epilépticos portadores de EMT sem indicação cirúrgica (ou a ela refratários), a EEC constitui um método alternativo de tratamento. Em relação aos pacientes candidatos ao tratamento microcirúrgico corrente, são necessários mais estudos para se definir se a EEC pode se tornar uma opção eficaz e menos invasiva. (LESSER et al., 1999; MOTAMEDI et al., 2002; THEODORE e FISHER, 2004; VELASCO et al., 2000; VELASCO et al., 2001; VONCK et al., 2002).

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

Foram utilizados 62 ratos Wistar do sexo feminino com 250 a 350 gramas no momento do implante dos eletrodos. Os animais foram obtidos através da Universidade de *Freiburg* e seu emprego foi aprovado pelo comitê de ética e estatuto experimental para modelos animais da mesma. Os animais 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*. A temperatura foi mantida em  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e a umidade entre 50 a 60%.

### 3.1.1 Critérios de inclusão

Os critérios para inclusão no estudo foram:

- a) Ratos Wistar adultos jovens, do sexo feminino e não gestantes.
- b) Peso entre 250 e 350 gramas no momento do implante.
- c) Resposta eletrofisiológica compatível com *kindling* hipocampal desde a primeira sessão de *kindling*, ou seja, pós-descarga primária, intervalo, pós-descarga secundária e WDS.
- d) ADT estável após a completa aquisição do *kindling* hipocampal.

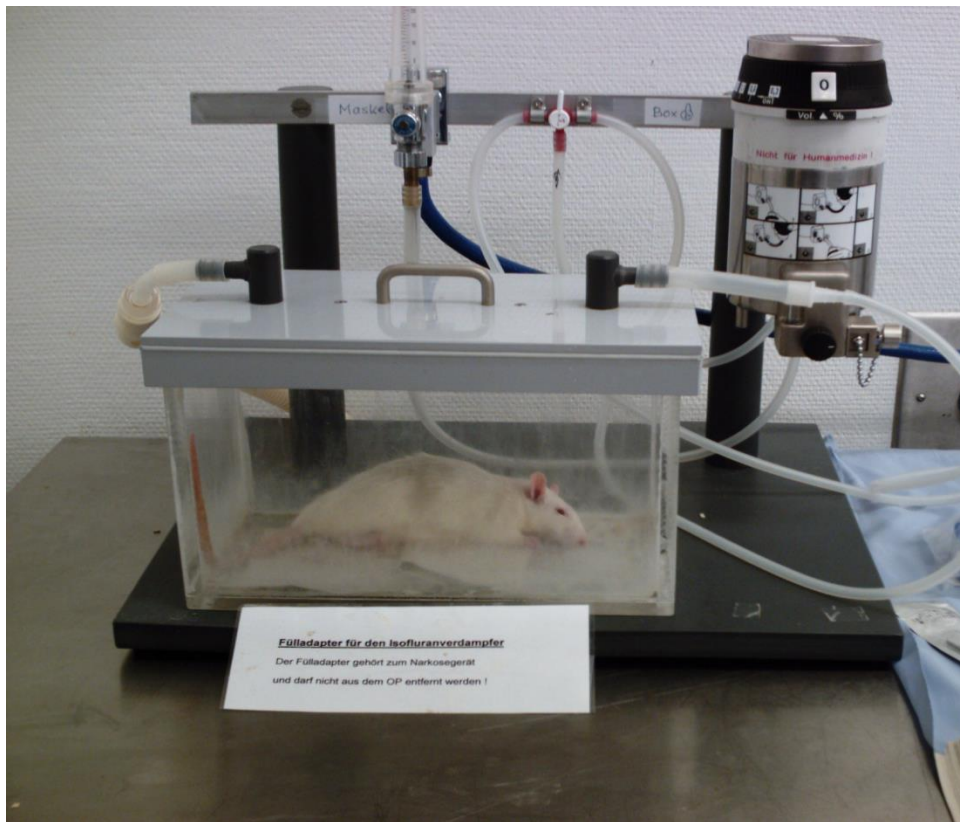
### 3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos 25 animais os quais apresentaram problemas com o implante, não atingiram um limiar de pós-descarga (ADT) estável ao fim do processo de *kindling* ou apresentaram incorreto posicionamento dos eletrodos na análise histológica. Desta forma, restaram 37 animais a serem estudados.

## 3.2 PREPARAÇÃO DO ANIMAL

Cada rato foi colocado em uma câmara anestésica com isofluorano a 2% e oxigênio e após a indução, pesado (Figura 6). Em seguida foram administrados (por via intraperitoneal) quetamina 10% à dose de 100mg/kg, xilosina 2% à dose de 3mg/kg e atropina 0,005% à dose de 0,1mg/kg. A analgesia pós-operatória foi realizada com buprenorfina à dose de 0,05mg/kg.

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 antissepsia 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 estereotáxicas para a formação hipocampal (PAXINOS e WATSON, 2007), foram realizados os orifícios cranianos. Foi implantado um tetrodo (eletrodo com quatro contatos) de platina composto por quatro fios insulados de 125 $\mu$ m de diâmetro cada, unidos por torção (contatos com separação de 1mm) no hipocampo direito (Y=-5.5; X= +4.8; Z= -7.0). Foi também implantado um eletrodo de tungstênio insulado (60  $\mu$ m de diâmetro) em

ambas as regiões hipocâmpais dorsais anteriores ( $Y=-4.0$ ;  $X=\pm 2.6$ ;  $Z=-3.0$ ). Além dos eletrodos hipocâmpais foi implantado um eletrodo referencial de tungstênio (de iguais características) no cerebelo esquerdo 1mm posterior à sutura lambdóide à 3mm de profundidade (Figuras 7 a 9). 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 10).

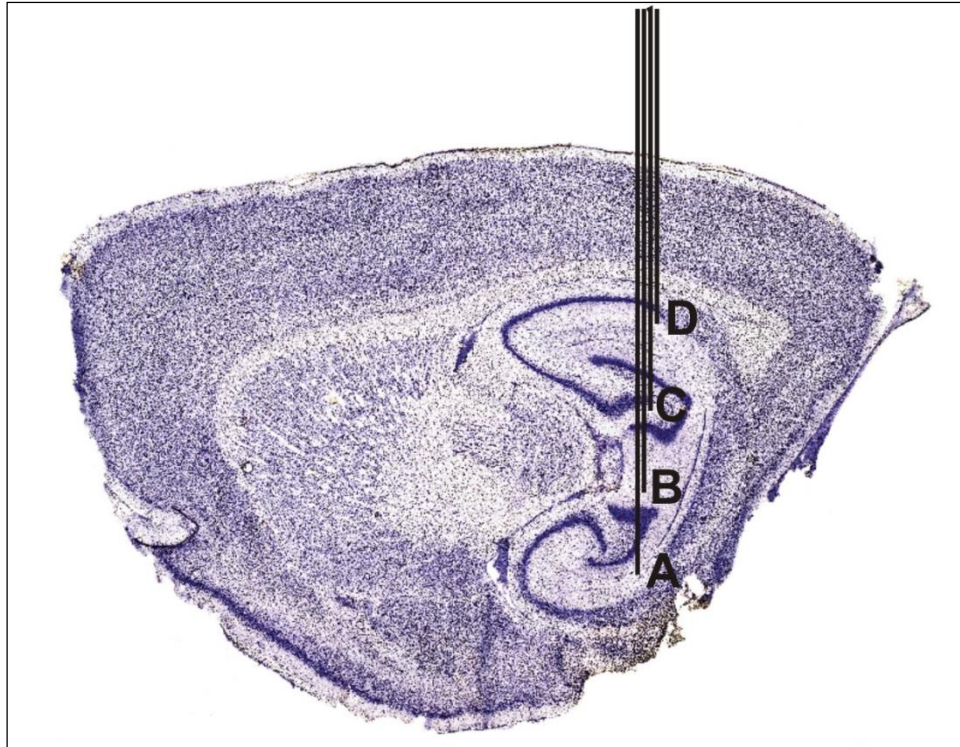
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DO LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DO TETRODO PARA ESTIMULAÇÃO DO HIPOCAMPO DIREITO EM CORTE CORONAL DO CÉREBRO.



FONTE: Reproduzido e adaptado de PAXINOS e WATSON, 2007 com autorização (anexo três).

NOTA: Vista coronal do cérebro do rato Wistar a 5,5 mm posterior ao bregma, sendo A-D o tetrodo implantado no hipocampo posterior direito para estimulação. O estímulo para a indução do *kindling* foi aplicado através dos contatos B e C. Para os protocolos de LFS e HFS bipolar fixa, o estímulo foi aplicado através do par de contatos A-D. Para os protocolos de LFS e HFS bipolar rotatória, o estímulo foi aplicado de forma alternada entre os pares de contatos A-B, B-C, C-D e D-A.

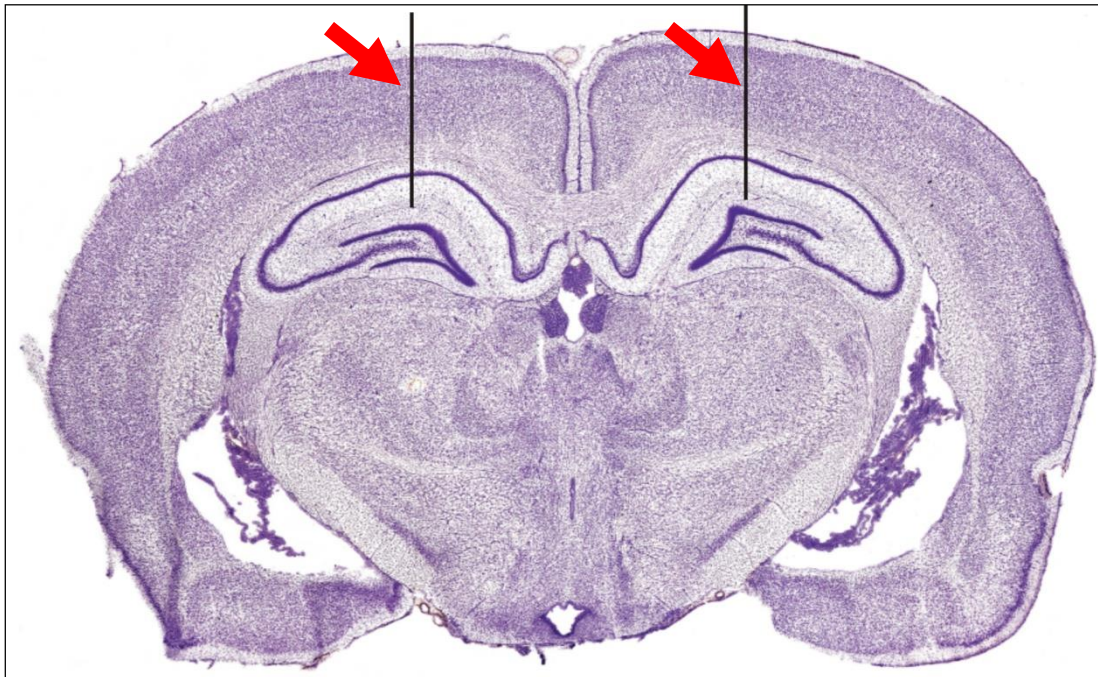
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DO LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DO TETRODO HIPOCAMPAL EM CORTE SAGITAL DO HEMISFÉRIO DIREITO.



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

NOTA: Vista sagital do cérebro do rato Wistar a 4.4 mm lateral à linha média, sendo de A D os contatos do tetrodo implantado no hipocampo posterior direito para estimulação.

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO FORA DE ESCALA DO LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS MONOPOLARES PARA REGISTRO HIPOCAMPAL EM CORTE CORONAL DO CÉREBRO.



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

NOTA: Vista coronal do cérebro do rato Wistar a 4,0 mm posterior ao bregma, representando os eletrodos monopolares implantados nos hipocampos dorsais para fins de registro (setas vermelhas).

FIGURA 10 – FOTOGRAFIA DE DOIS RATOS EVIDENCIANDO O ASPECTO FINAL DO IMPLANTE CRANIANO.



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: O implante é fixo ao crânio por meio de seis parafusos e cimento odontológico. No topo do implante pode-se observar o conector para sistema de múltiplos canais (seta vermelha) ao qual o cabo para a estimulação cerebral é conectado.

### 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 três GHz e um GB de memória RAM. Foi utilizado o *software Spike2* quinta versão para receber os impulsos cerebrais transmitidos pelo conversor analógico-digital e exibir-los para a análise simultânea (Figura 11).

FIGURA 11 – FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO PARA O REGISTRO DE LFP

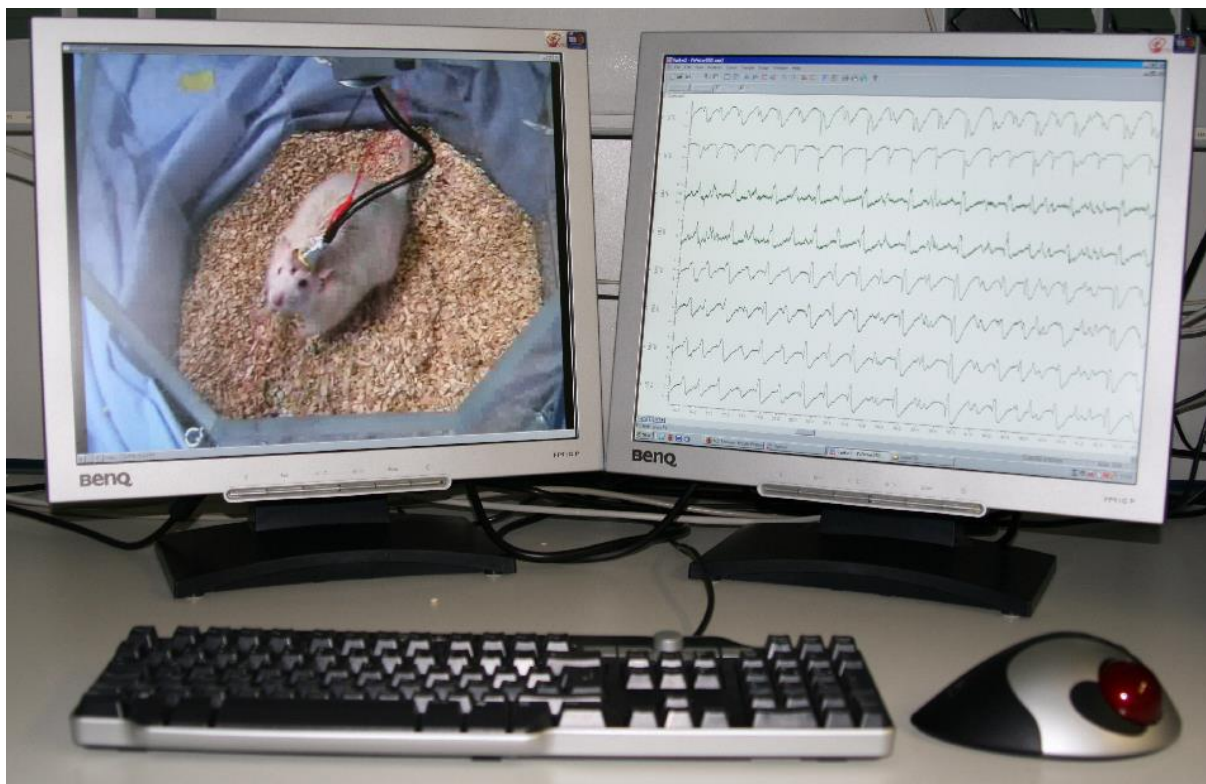


FONTE: Dados do estudo.

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 registro de LFP com o registro de vídeo em tempo real no monitor do computador. (Figura 12)

FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE REGISTRO SIMULTÂNEO DE LFP E PADRÃO COMPORTAMENTAL.



FONTE: Dados do serviço.

NOTA: Registro de LFP de uma sessão de *kindling* hipocampal 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 25 imagens por segundo.

### 3.4 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL

#### 3.4.1 Indução do *kindling* hipocampal

Com o intervalo de uma semana após a cirurgia de implante, foi iniciado o processo de *kindling* no hipocampo 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,  $\pm 0.5$  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 13). Após a descarga foram observadas a resposta neurofisiológica e a resposta comportamental - câmera de vídeo (Figura 14).

FIGURA 13 – 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 14 – REGISTRO DO PADRÃO COMPORTAMENTAL APÓS A ESTIMULAÇÃO CEREBRAL.



FONTE: Dados do serviço

NOTA: Registro do padrão comportamental por câmera digital (a 25 imagens por segundo). Animal apresentando clônus no membro anterior direito o que configura uma crise epiléptica estágio três de Racine.

As sessões foram repetidas individualmente até cada animal apresentar dez crises consecutivas com estágio mínimo cinco na escala comportamental de Racine, completando o processo de aquisição do *kindling* hipocampal.

### 3.4.2 Determinação do limiar de pós-descarga (ADT)

Após completar o processo de *kindling*, a amplitude necessária para desencadear a pós-descarga (AD) foi individualmente determinada. A determinação do ADT foi realizada

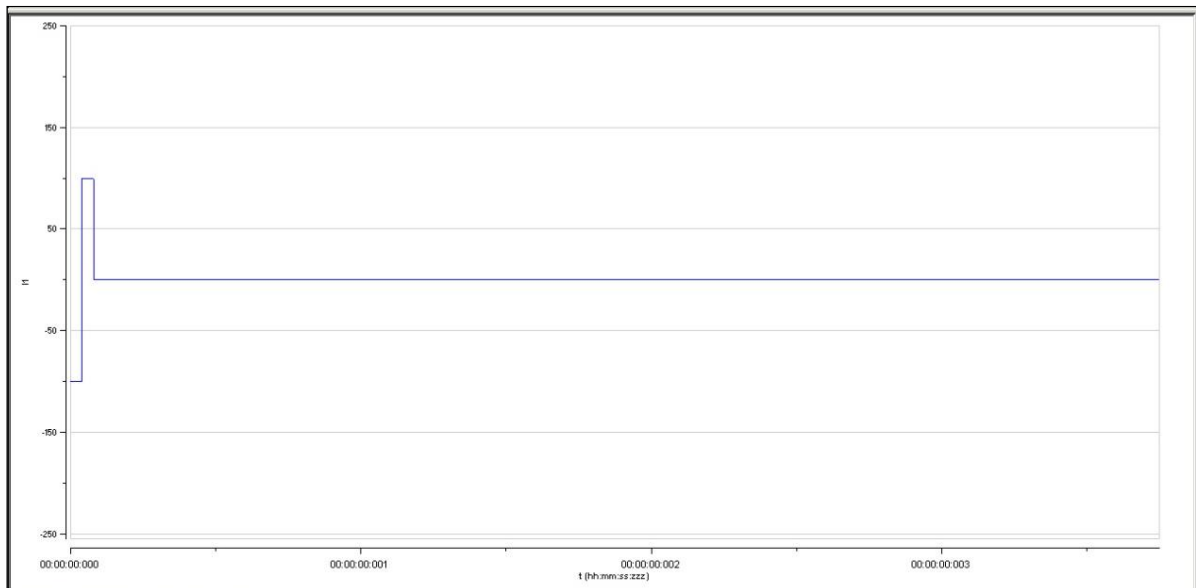
com o incremento progressivo de 25 $\mu$ A na estimulação de 0 $\mu$ A a 100 $\mu$ A e então com o incremento progressivo de 50 $\mu$ A na estimulação de 150 $\mu$ A a 800 $\mu$ A, com um minuto de intervalo entre cada estímulo (MCINTYRE, 2006). A determinação do ADT foi realizada diariamente por três dias consecutivos. O animal foi considerado estável se o ADT sofreu uma variação máxima de um incremento durante as três sessões de ADT. Somente os animais estáveis foram selecionados para compor o passo seguinte do experimento e foram então randomicamente subdivididos em cinco grupos sendo um grupo controle e quatro submetidos à estimulação cerebral contínua.

### 3.4.3 Protocolos de estimulação cerebral contínua (ECC)

Foram aplicados diferentes protocolos de estimulação bipolar utilizando ondas retangulares bifásicas com cargas balanceadas os quais nomearam os grupos:

- **Grupo HFS2C** (N=7) – estimulação aplicada através dos **contatos externos** do tetrodo hipocampal (Figuras 7 e 15, contatos A e D) com duração do impulso de 80 $\mu$ s e frequência de **130Hz**.
- **Grupo LFS2C** (N=8) - estimulação aplicada através dos **contatos externos** do tetrodo hipocampal (Figuras 7 e 15, contatos A e D) com duração do impulso de 120 $\mu$ s e frequência de **1Hz**.
- **Grupo HFS4C** (N=9) - estimulação aplicada através dos **quatro pares de contatos** do tetrodo hipocampal de forma rotatória e com intervalo fixo entre cada impulso (Figuras 7 e 16, contatos A-B, B-C, C-D e D-A). Duração do impulso de 80 $\mu$ s e frequência de **130Hz**.
- **Grupo LFS4C** (N=7) - estimulação aplicada através dos **quatro pares de contatos** do tetrodo hipocampal de forma rotatória e com intervalo fixo entre cada impulso (Figuras 7 e 16, contatos A-B, B-C, C-D e D-A). Duração do impulso de 120 $\mu$ s e frequência de **1Hz**.
- **Grupo Controle** (N=6) - não recebeu ECC.

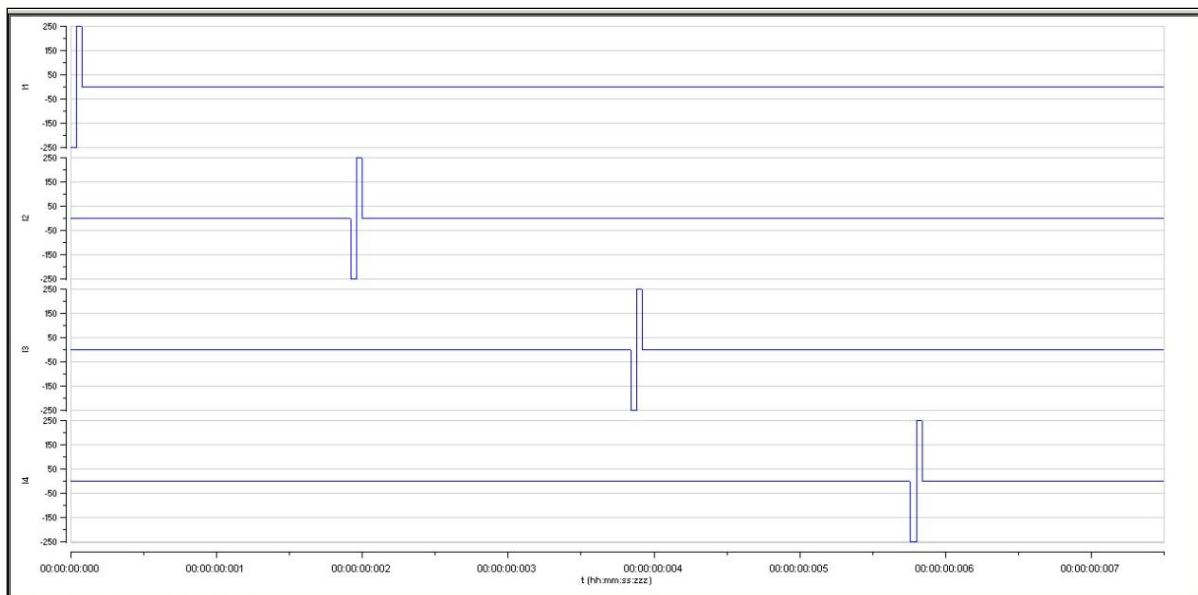
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DO ESTÍMULO UTILIZADO PARA A ECC APLICADA ATRAVÉS DO PAR DE CONTATOS EXTERNOS DO TETRODO HIPOCAMPAL



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Nesta representação pode-se observar um pulso bifásico de ondas retangulares com carga balanceada ( $80\mu\text{s}$ ,  $130\text{Hz}$ ,  $100\mu\text{A}$ ) aplicado através do par de contatos externos. Neste paradigma de estimulação a ECC é aplicada de forma a envolver o foco ictal induzido pelo *kindling*, o qual é realizado através do par de contatos internos.

FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DO ESTÍMULO UTILIZADO PARA A ECC APLICADA ATRAVÉS DOS QUATRO PARES DE CONTATOS DO TETRODO HIPOCAMPAL



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Nesta representação pode-se observar pulsos bifásicos de ondas retangulares com carga balanceada ( $80\mu\text{s}$ ,  $130\text{Hz}$ ,  $250\mu\text{A}$ ) aplicados em cada par de eletrodos do tetrodo hipocampal. Os pulsos são aplicados de forma alternada, sendo separados por um intervalo fixo. Esta técnica visa a criar subpopulações neuronais sincronizadas a cada estímulo, o que leva a uma dessincronização global da rede neuronal.

#### 3.4.4 Sistema de estimulação cerebral contínua (ECC)

A amplitude da ECC necessária para desencadear uma AD foi individualmente determinada 5 minutos após o término da terceira sessão de ADT. Os mesmos incrementos de amplitude para a determinação do ADT foram utilizados e o tempo de estimulação testado foi de 30 segundos. A fim de se evitar o desencadear de AD, a amplitude de estimulação selecionada para cada protocolo foi  $100\mu\text{A}$  inferior ao limiar de AD. Os animais que não apresentaram AD com estimulação até  $800\mu\text{A}$ , a amplitude utilizada no referido protocolo foi de  $700\mu\text{A}$ . Uma vez determinada a amplitude da ECC, o animal foi conectado ao sistema de estimulação onde foi continuamente estimulado por uma semana (Figura 17).

FIGURA 17 – FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE ESTIMULAÇÃO CEREBRAL CONTÍNUA.



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Sistema de estimulação cerebral desenvolvido para a estimulação contínua dos animais do experimento. Cada animal foi estimulado durante uma semana conforme o protocolo ao qual foi selecionado.

Após completar os sete dias de ECC, esta foi interrompida e o ADT foi determinado. Em outras palavras, a amplitude do estímulo de *kindling* (200 pulsos de 0.4 ms, a 60 Hz) necessária para desencadear uma AD foi determinada. Esta etapa foi realizada seguindo o mesmo padrão empregado na fase prévia à ECC, ou seja, uma sessão por dia totalizando três sessões. A fim de se avaliar a influência da ECC no ADT, os grupos foram individualmente comparados em relação às médias dos valores de ADT obtidos nas três sessões de determinação do ADT prévias à ECC (Pre1, Pre2 e Pre3) e posteriores à ECC (Post1, Post2 e Post3). O grupo controle foi utilizado com o objetivo de demonstrar o caráter de estabilidade do modelo de *kindling* hipocampal empregado no experimento.

### 3.5 CRONOGRAMA REFERENTE À ECC

Pre1 = Primeira determinação do ADT prévia à ECC.

Pre2 = Segunda determinação do ADT prévia à ECC.

Pre3 = Terceira determinação do ADT prévia à ECC.

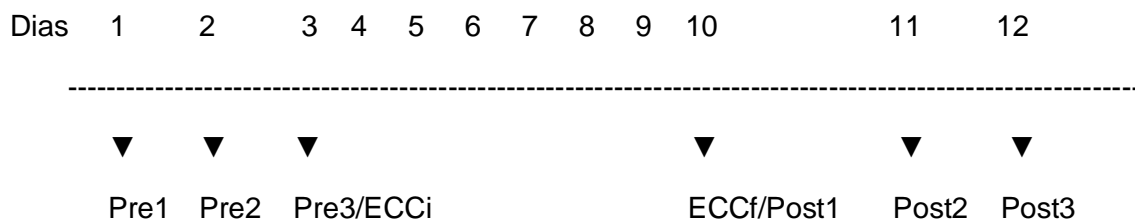
ECCi = Início da ECC

ECCf = Fim da ECC

Post1 = Primeira determinação do ADT posterior à ECC.

Post2 = Segunda determinação do ADT posterior à ECC.

Post3 = Terceira determinação do ADT posterior à ECC.



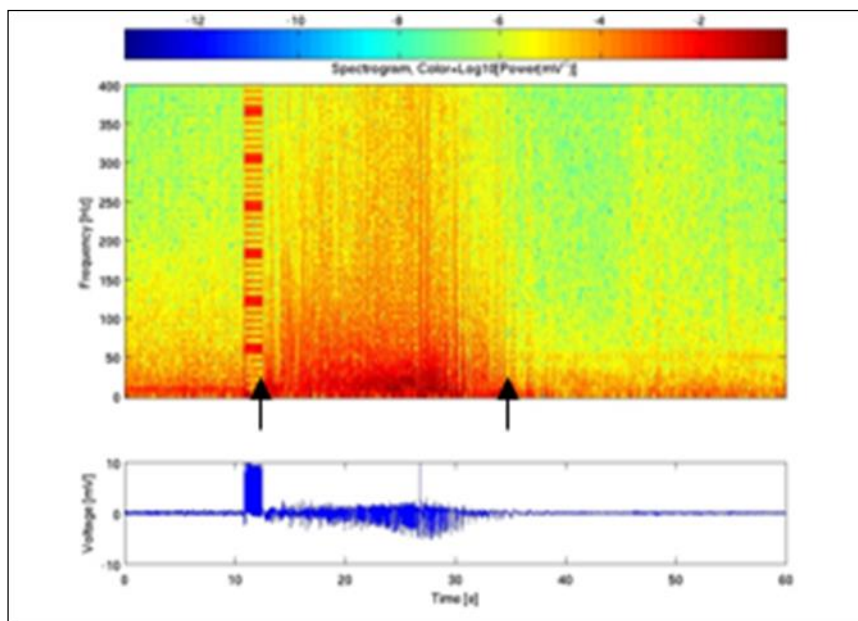
### 3.6 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE *KINDLING* E DA ECC

#### 3.6.1 Avaliação eletrofisiológica

O registro de LFP foi filtrado para as frequências de um Hz a cinco 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 (25 imagens por segundo). Em seguida, o segmento de LFP referente a cada sessão de *kindling* foi analisado a fim de se determinar o ADT. A seguir o registro de LFP foi transformado em espectrograma de frequência para a determinação da duração da AD com o auxílio do *software Matlab6.5* (da empresa *MathWorks, Natick, EUA*).

O início da AD foi marcado quando a frequência do registro excedeu o valor prévio ao estímulo desencadeante (estímulo do *kindling*) e o fim quando a frequência retornou ao valor prévio ao estímulo (Cordeiro et al., 2009) (Figura 18).

FIGURA 18 – ESPECTROGRAMA DE FREQUÊNCIA ILUSTRANDO A DETERMINAÇÃO DA DURAÇÃO DA AD.



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Espectrograma de frequência processado do registro de LFP com o auxílio do *software Matlab 6.5*. Caso representativo demonstrando a determinação da duração da AD através da análise do conteúdo de frequência. A primeira seta (esquerda) indica o início da AD e a segunda (direita) marca o fim da AD. Tempo em segundos, frequência em Hz e barra colorida com a escala em  $\text{Log}_{10}[\text{mV}^2]$ .

No *kindling* hipocampal, crises epiléticas generalizadas intensas são desencadeadas durante os testes. Devido aos fenômenos motores pode ocorrer a desconexão do sistema, levando a um registro parcial da AD. As ADs registradas de forma incompleta foram excluídas da análise de duração.

### 3.6.2 Avaliação comportamental

O padrão de resposta comportamental promovida pela estimulação cerebral foi classificado conforme a escala de Racine (Racine et al.,1972). As crises epiléticas generalizadas gravadas nas sessões de ADT anteriores e posteriores à ECC foram analisadas e sua duração quantificada. Quando o animal apresentou um padrão de resposta igual ou superior a três na Escala de Racine foi marcado o início da crise epilética e quando o animal apresentou um padrão de resposta inferior a três, o fim da crise foi assinalado.

### 3.7 ESTUDO HISTOLÓGICO

Uma semana após completar o processo, foi realizada a marcação da posição dos eletrodos, sob narcose profunda, por meio de corrente DC (corrente direta) a 50 $\mu$ A (Seidenbecher et al., 1998), seguida da perfusão intracardíaca com salina e solução de paraformaldeído a 4% (PFA). A seguir os animais foram sacrificados e os cérebros removidos e deixados por 12 horas em PFA. Após, os cérebros foram acondicionados em solução de Sucrose a 30% e foram então fatiados em cortes coronais de 50 $\mu$ m. Em seguida foi realizada a coloração de Nissl para o estudo histológico da verificação da posição dos eletrodos. Foi considerado correto o posicionamento dos eletrodos quando o sinal das pontas foi identificado dentro dos limites anatômicos do hipocampo.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido ao número de animais analisados de cada grupo e ao padrão de distribuição dos dados obtidos (não normal) optou-se por testes não paramétricos. O teste não paramétrico pareado *Wilcoxon signed-rank test* foi empregado para análise dos resultados

obtidos (dados dependentes entre si) e o *Mann–Whitney U-test* foi utilizado para as comparações entre os grupos. Os testes empregados compararam os valores individuais obtidos por um grupo em cada sessão. O nível de significância adotado nos testes foi de 95%. As análises foram realizadas com o *software* SPSS (da *SPSS Inc.*, Chicago, EUA). Os resultados obtidos no experimento foram também apresentados como médias  $\pm$  um desvio padrão de forma demonstrativa.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 DADOS REFERENTES À POPULAÇÃO E AQUISIÇÃO DO *KINDLING***

Os animais apresentaram a primeira crise epiléptica generalizada com um intervalo médio de 40,5 dias com desvio padrão (DP) de 18,5 após o início do processo de *kindling* hipocampal. A completa aquisição do *kindling* foi alcançada após uma média de 75,6 dias (DP=23,4) após o início do processo de *kindling*.

### **4.2 ANÁLISE DO LIMIAR DE TOLERÂNCIA DA ECC**

A amplitude média aplicada no grupo HFS2C foi de 414 $\mu$ A (SD=221), no grupo HFS4C foi de 233 $\mu$ A (DP=164), no grupo LFS2C foi de 687 $\mu$ A (DP=35), e no grupo LFS4C foi de 700 $\mu$ A (DP=0). Observou-se que em nenhum dos animais do grupo LFS4C a ECC desencadeou pós-descarga (Tabela 2).

TABELA 2 – RELAÇÃO DA AMPLITUDE DA ECC APLICADA EM CADA ANIMAL DO EXPERIMENTO.

<b>Grupos</b>	<b>HFS2C</b>	<b>HFS4C</b>	<b>LFS2C</b>	<b>LFS4C</b>
Rato 1	200	500	700	700
Rato 2	400	250	600	700
Rato 3	250	150	700	700
Rato 4	600	250	700	700
Rato 5	600	500	700	700
Rato 6	700	50	700	700
Rato 7	150	100	700	700
Rato 8		150	700	
Rato 9		150		
<b>Mean</b>	<b>414</b>	<b>233</b>	<b>687</b>	<b>700</b>
<b>DP</b>	<b>221</b>	<b>163</b>	<b>35</b>	<b>0</b>

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ .

Em se comparando os valores aplicados, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos HFS2C e LFS2C ( $p < 0,05$ ), bem como entre os grupos HFS4C e LFS4C ( $p < 0,05$ ). As diferenças encontradas evidenciaram uma maior tolerabilidade da aplicação da LFS em detrimento à HFS.

#### 4.3 ANÁLISE DO LIMIAR DE PÓS-DESCARGA (ADT)

A média dos valores encontrados prévias à ECC (em  $\mu\text{A}$ ) no grupo Controle foi de Pre1=125 (DP=50), Pre2=125 (DP=50), Pre3=133,3 (DP=66,5), Post1=95,8 (DP=43,1), Post2=95,8 (DP=43,1), Post3=83,3 (DP=37,6). Foi observado um discreto declínio na média dos valores de ADT após uma semana sem estimulação. A análise dos valores não mostrou diferença estatisticamente significativa (Tabela 3 e Gráfico 1).

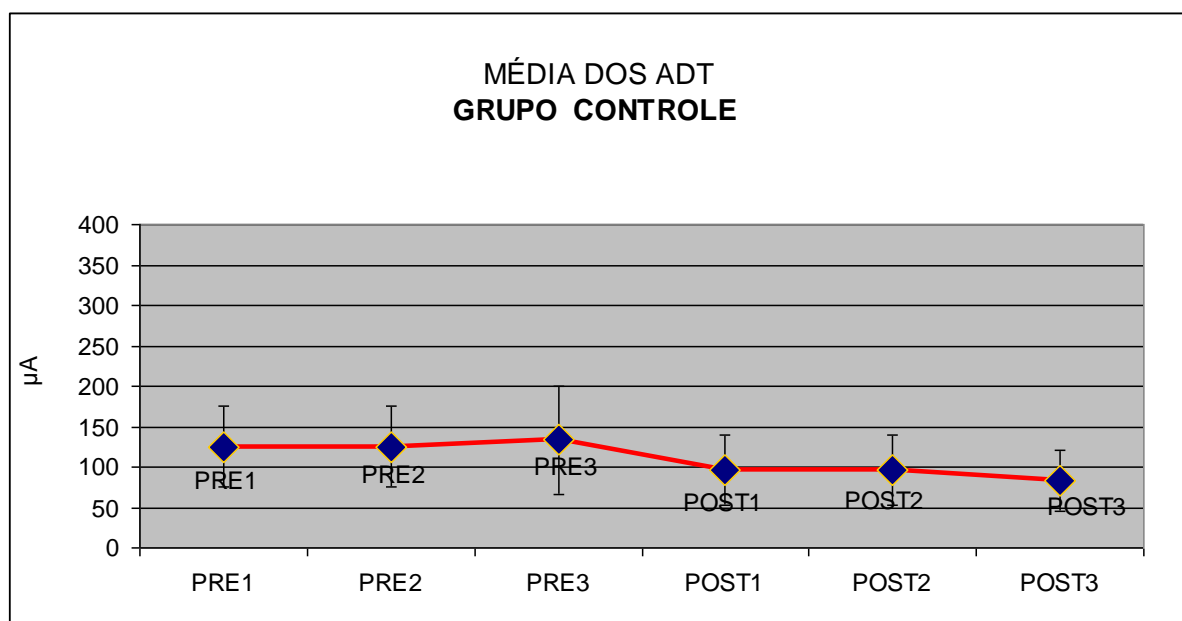
TABELA 3 – RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO CONTROLE.

<b>Grupo Controle</b>	<b>Pre1</b>	<b>Pre2</b>	<b>Pre3</b>	<b>Post1</b>	<b>Post2</b>	<b>Post3</b>
Rato1	75	75	75	75	75	75
Rato2	200	200	250	50	50	50
Rato3	75	75	100	75	75	50
Rato4	100	100	75	75	75	75
Rato5	150	150	150	150	150	150
Rato6	150	150	150	150	150	100
<b>Média</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>133,3</b>	<b>95,8</b>	<b>95,8</b>	<b>83,3</b>
<b>DP</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>67</b>	<b>43,1</b>	<b>43,1</b>	<b>37,6</b>

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ .

GRÁFICO 1 – MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO CONTROLE



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ . Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo HFS2C foi encontrado Pre1=135,7 (DP=74,8), Pre2=135,7 (DP=62,7), Pre3=128,6 (DP=63,6), Post1=125 (DP=77,7), Post2=110,7 (DP=80,2) e Post3=128,6 (DP=82,2). A diferença entre os valores prévios e posteriores à ECC não foi estatisticamente significativa (Tabela 4 e Gráfico 2).

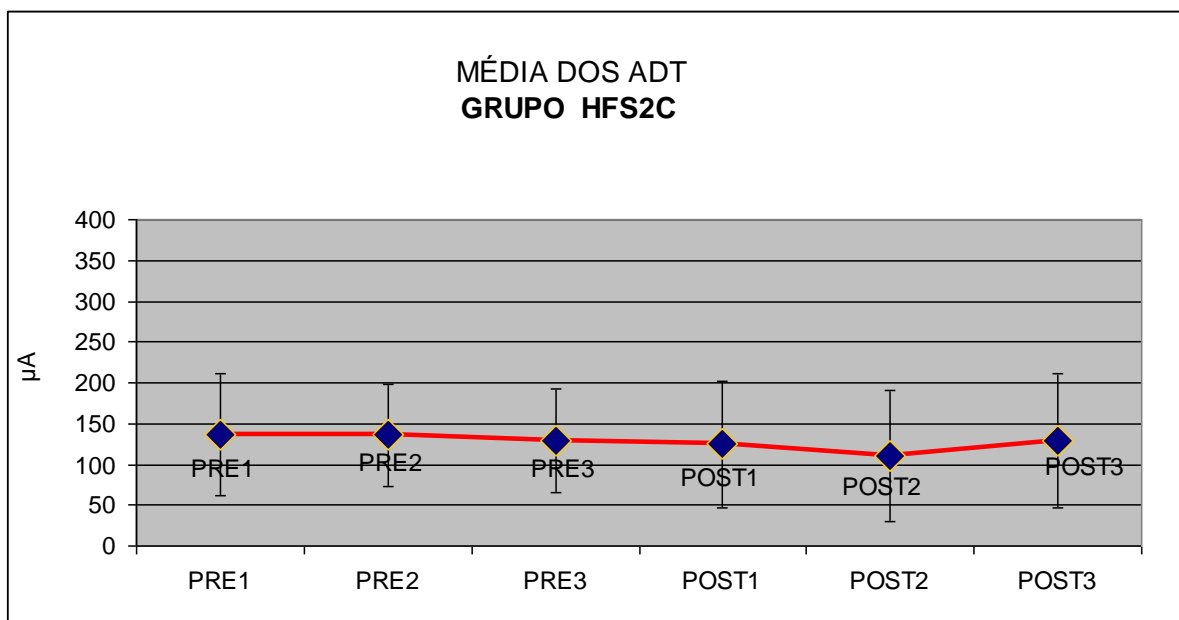
TABELA 4 – RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO HFS2C.

Grupo HFS2C	Pre1	Pre2	Pre3	Post1	Post2	Post3
Rato1	100	150	150	75	75	150
Rato2	50	50	50	50	50	50
Rato3	250	200	200	200	200	200
Rato4	150	150	150	150	75	150
Rato5	150	150	100	100	75	75
Rato6	200	200	200	250	250	250
Rato7	50	50	50	50	50	25
<b>Média</b>	<b>135,7</b>	<b>135,7</b>	<b>128,6</b>	<b>125,0</b>	<b>110,7</b>	<b>128,6</b>
<b>DP</b>	<b>74,8</b>	<b>62,7</b>	<b>63,6</b>	<b>77,7</b>	<b>80,2</b>	<b>82,2</b>

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ .

GRÁFICO 2 – MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO HFS2C



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ . Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média da média.

No grupo HFS4C foi observado Pre1=150 (DP=117,3), Pre2=141,7 (DP=109), Pre3=141,7 (DP=96,8), Post1=147,2 (DP=87,9), Post2=130,6 (DP=92,5), Post3=130,6 (DP=92,5). A diferença entre os valores prévios e posteriores à ECC não foi estatisticamente significativa (Tabela 6 e Gráfico 4).

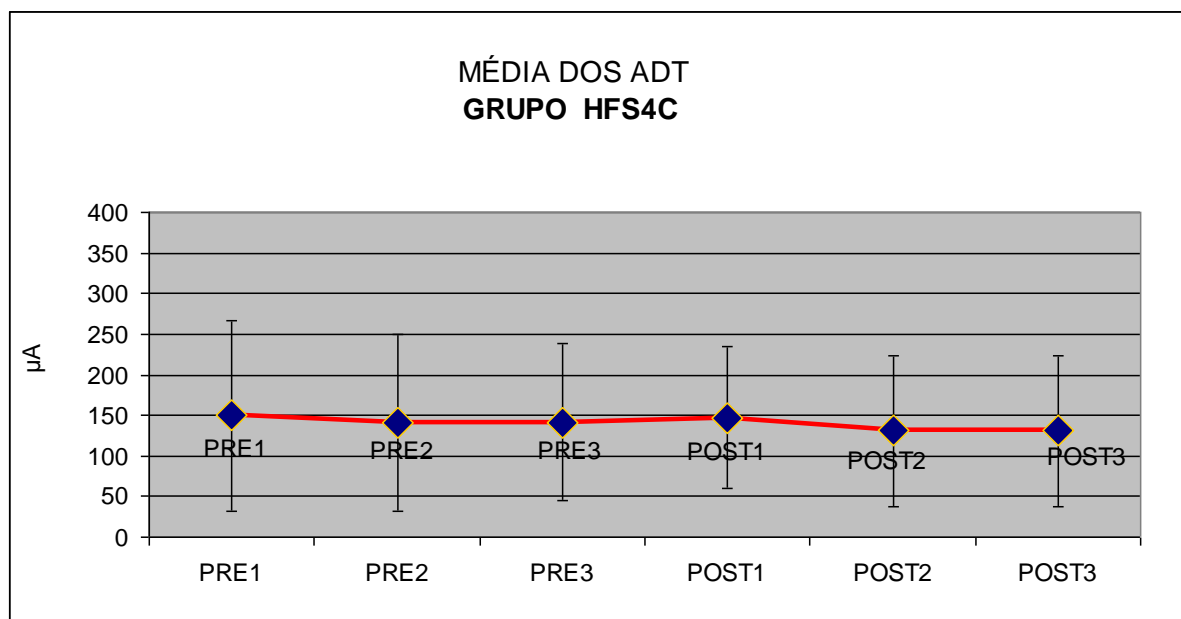
TABELA 5 – RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO HFS4C.

<b>Grupo HFS4C</b>	<b>Pre1</b>	<b>Pre2</b>	<b>Pre3</b>	<b>Post1</b>	<b>Post2</b>	<b>Post3</b>
Rato1	400	400	350	300	300	300
Rato2	150	150	150	150	150	150
Rato3	100	100	100	150	100	100
Rato4	50	50	50	75	50	50
Rato5	250	200	200	250	250	250
Rato6	50	50	50	50	25	25
Rato7	100	100	100	75	75	75
Rato8	200	150	200	200	150	150
Rato9	50	75	75	75	75	75
<b>Média</b>	<b>150,0</b>	<b>141,7</b>	<b>141,7</b>	<b>147,2</b>	<b>130,6</b>	<b>130,6</b>
<b>DP</b>	<b>117,3</b>	<b>109,0</b>	<b>96,8</b>	<b>87,9</b>	<b>92,5</b>	<b>92,5</b>

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ .

GRÁFICO 3 – MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO HFS4C



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ . Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo LFS2C foi observado Pre1=103,1 (DP=57,4), Pre2=109,4 (DP=65,4), Pre3=112,5 (DP=73,2), Post1=109,4 (DP=46,2), Post2=125 (DP=99,1), Post3=112,5 (DP=87,6). A diferença entre os valores prévios e posteriores à ECC não foi estatisticamente significativa (Tabela 5 e Gráfico 3).

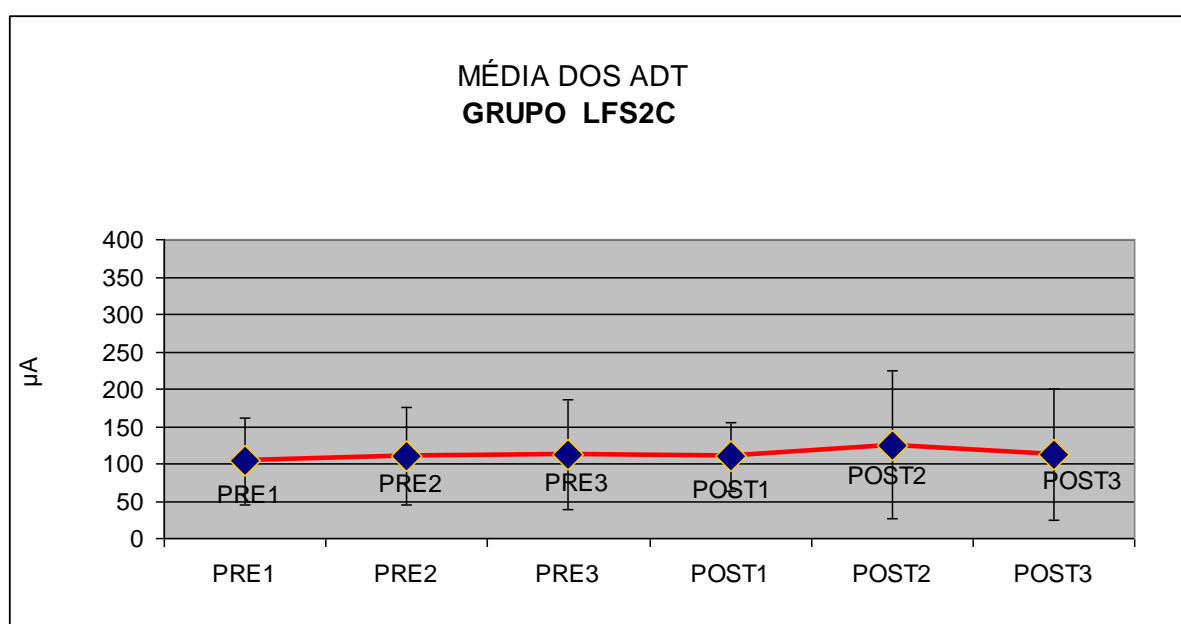
TABELA 6 – RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO LFS2C.

Grupo LFS2C	Pre1	Pre2	Pre3	Post1	Post2	Post3
Rato1	50	50	50	50	50	50
Rato2	75	75	75	75	75	50
Rato3	200	200	200	150	350	300
Rato4	50	50	50	50	50	50
Rato5	150	150	200	150	150	150
Rato6	50	50	50	150	75	50
Rato7	150	200	200	150	150	150
Rato8	100	100	75	100	100	100
<b>MÉDIA</b>	<b>103,1</b>	<b>109,4</b>	<b>112,5</b>	<b>109,4</b>	<b>125</b>	<b>112,5</b>
<b>DP</b>	<b>57,4</b>	<b>65,4</b>	<b>73,2</b>	<b>46,2</b>	<b>99,1</b>	<b>87,6</b>

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ .

GRÁFICO 4 – MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO LFS2C



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ . Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo LFS4C foi encontrado Pre1=107,1 (DP=42,6), Pre2=107,1 (DP=62,4), Pre3=100 (DP=52), Post1=239,3 (DP=95,6), Post2=203,6 (DP=89,5), Post3=182,1 (DP=62,4). Foi observado um aumento estatisticamente significativo no ADT quando comparados os valores prévios e posteriores à ECC, sendo Pre1 menor que Post1, Post2 e Post3 ( $p=0,018$ ;  $p=0,018$ ;  $p=0,017$ , respectivamente), Pre2 menor que Post1, Post2 e Post3 ( $p=0,018$ ;  $p=0,027$ ;  $p=0,027$ , respectivamente) e Pre3 menor que Post1, Post2 e Post3 ( $p=0,018$ ;  $p=0,018$ ;  $p=0,017$ , respectivamente) (Tabela 7 e Gráfico 5).

É importante destacar que nenhum os valores de ADT posteriores à ECC foi superior aos valores prévios à ECC em qualquer um dos outros grupos. O único grupo em que houve um aumento no valor dos ADT após a ECC foi o grupo LFS4C. Em se comparando os valores de ADT após a ECC notou-se um declínio estatisticamente significativo de Post2 para Post3 ( $p=0,039$ ).

Os animais pertencentes ao grupo LFS4C cujos ADT não retornaram aos níveis prévios à ECC foram novamente testados ao cabo de uma semana após a interrupção da estimulação (Post4). Nesta sessão o ADT de cinco dos sete animais testados retornaram ao nível prévio à ECC. Com um intervalo de outra semana, os dois animais restantes foram novamente testados (Post5). Em um deles o ADT retornou ao nível prévio e no outro ele persistiu elevado (Tabela 7 e Gráfico 5).

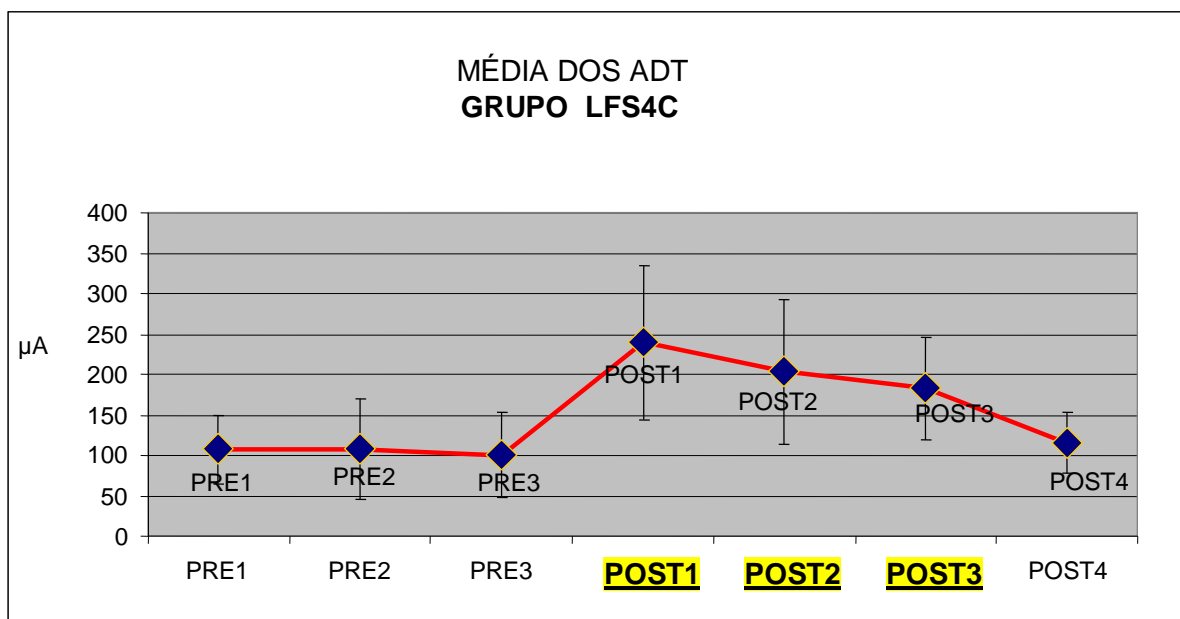
TABELA 7 – RELAÇÃO DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO LFS4C.

Grupo LFS4C	Pre1	Pre2	Pre3	Post1	Post2	Post3	Post4	Post5
Rato1	75	50	50	300	150	150	100	75
Rato2	150	200	150	250	200	200	150	
Rato3	75	75	75	150	150	150	100	100
Rato4	150	150	150	350	350	250	150	
Rato5	150	100	100	300	250	250	150	
Rato6	50	25	25	75	75	75	50	
Rato7	100	150	150	250	250	200	100	
<b>Média</b>	<b>107,1</b>	<b>107,1</b>	<b>100,0</b>	<b>239,3</b>	<b>203,6</b>	<b>182,1</b>	<b>114,3</b>	
<b>DP</b>	<b>42,6</b>	<b>62,4</b>	<b>52,0</b>	<b>95,6</b>	<b>89,5</b>	<b>62,4</b>	<b>37,8</b>	

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$

GRÁFICO 5 – MÉDIAS DOS VALORES DE ADT ENCONTRADOS NO GRUPO LFS4C



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Dados expressos em  $\mu\text{A}$ . Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

#### 4.4 ANÁLISE DA DURAÇÃO DAS AD

A média dos valores encontrados (em segundos) no grupo Controle foi de Pre1=41,0 (DP=14,8), Pre2=31,6 (DP=14,8), Pre3=36,5 (DP=11,6), Post1=30,3 (DP=12,2), Post2=31,8 (DP=3,9), Post3=37,0 (DP=8,0). A diferença entre os valores não foi estatisticamente significativa (Tabela 8 e Gráfico 6).

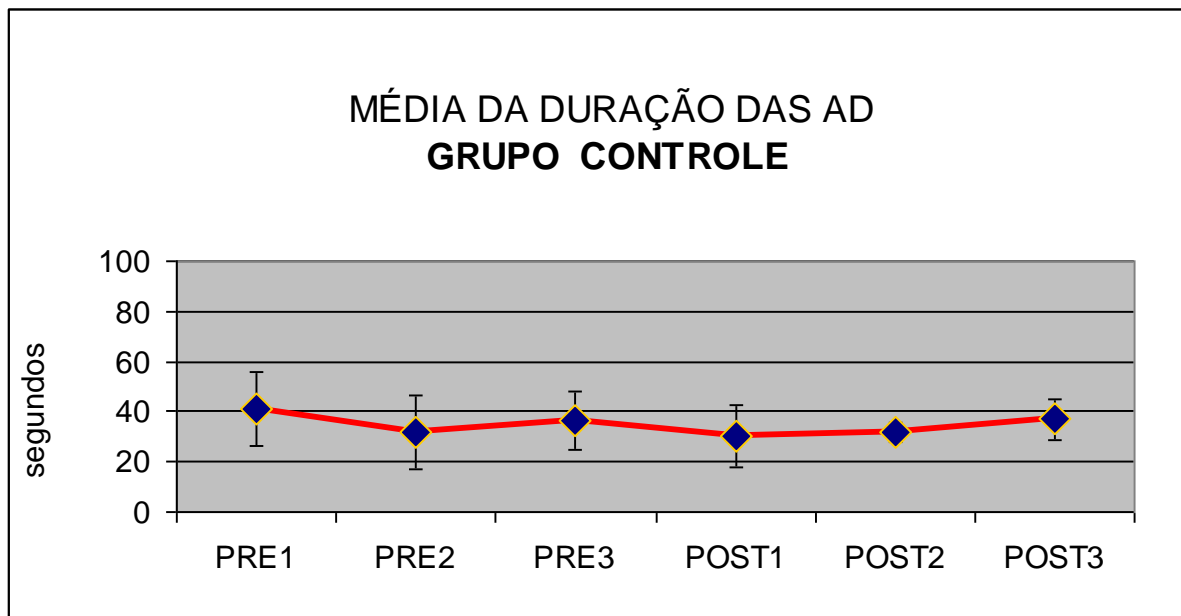
TABELA 8 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO CONTROLE.

<b>Grupo Controle</b>	<b>Pre1</b>	<b>Pre2</b>	<b>Pre3</b>	<b>Post1</b>	<b>Post2</b>	<b>Post3</b>
Rato2	25	29	29	15	36	33
Rato3	54	50	53	42	28	49
Rato4	31	27	36	26	29	33
Rato5	36	41		38	34	33
Rato6	59	11	28			
<b>MÉDIA</b>	<b>41,0</b>	<b>31,6</b>	<b>36,5</b>	<b>30,3</b>	<b>31,8</b>	<b>37,0</b>
<b>DP</b>	<b>14,8</b>	<b>14,8</b>	<b>11,6</b>	<b>12,2</b>	<b>3,9</b>	<b>8,0</b>

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Dados expressos em segundos

GRÁFICO 6 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO CONTROLE



FONTE: Dados do estudo

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo HFS2C foi encontrado Pre1=48,4 (DP=29,8), Pre2=37,8 (DP=9,4), Pre3=37,5 (DP=5,9), Post1=46,4 (DP=15,4), Post2=34,4 (DP=6,5), Post3=36,4 (DP=10,3). A comparação dos valores prévios e posteriores à ECC não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 9 e Gráfico 7).

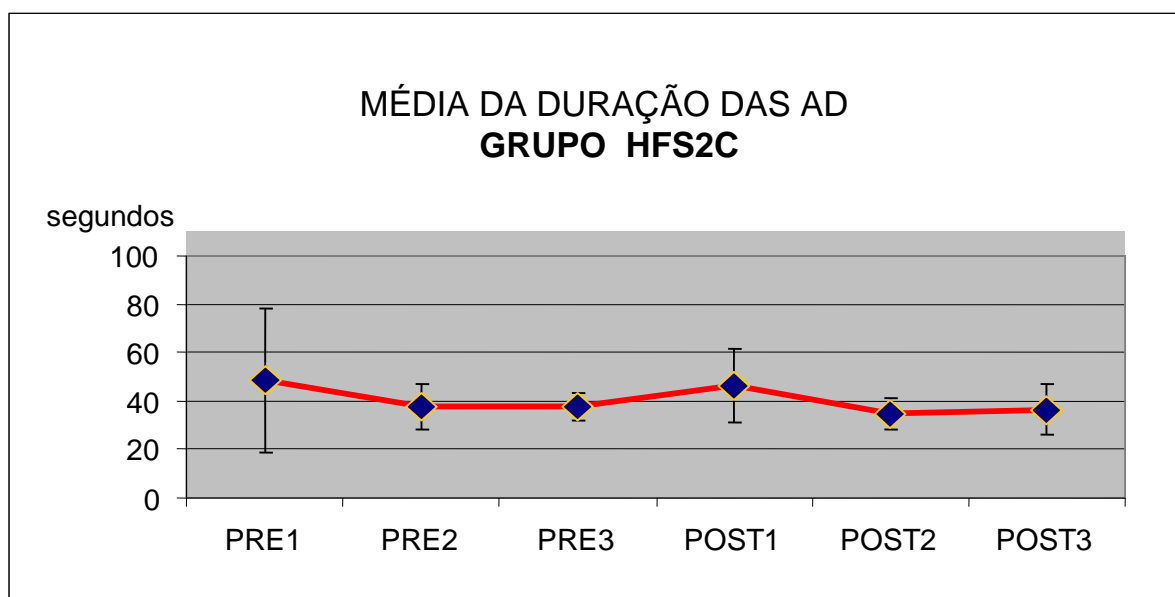
TABELA 9 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO HFS2C.

<b>Grupo HFS2C</b>	<b>Pre1</b>	<b>Pre2</b>	<b>Pre3</b>	<b>Post1</b>	<b>Post2</b>	<b>Post3</b>
Rato1	32			42	39	37
Rato2	30	42	39	45	30	27
Rato3	40	24	40	39	31	58
Rato4	46	39	27	46	28	33
Rato5	36	29	35	40	45	35
Rato6	115	48	40	80	39	28
Rato7	40	45	44	33	29	37
<b>MÉDIA</b>	<b>48,4</b>	<b>37,8</b>	<b>37,5</b>	<b>46,4</b>	<b>34,4</b>	<b>36,4</b>
<b>DP</b>	<b>29,8</b>	<b>9,4</b>	<b>5,9</b>	<b>15,4</b>	<b>6,5</b>	<b>10,3</b>

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Dados expressos em segundos

GRÁFICO 7 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO HFS2C



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo HFS4C foi encontrado Pre1=38,5 (DP=8,5), Pre2=45,4 (DP=9,1), Pre3=47,6 (DP=16,5), Post1=38,1 (DP=15,8), Post2=30,9 (DP=8,7), Post3=39,2 (DP=7,8). A duração das AD apresentou uma redução estatisticamente significativa na aferição 24 horas após o término da ECC, sendo Post 2 menor que Pre1, Pre2 e Pre3 ( $p=0,043$ ;  $p=0,043$ ,  $p=0,028$ , respectivamente) (Tabela 10 e Gráfico 8).

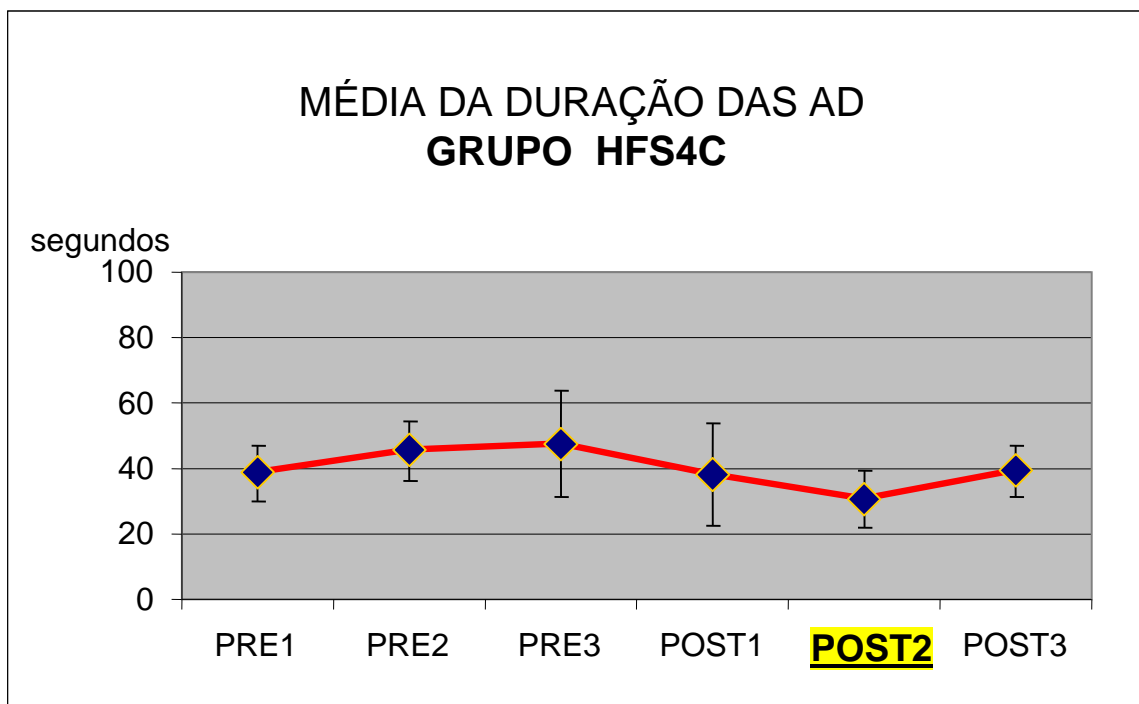
TABELA 10 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO HFS4C.

<b>Grupo HFS4C</b>	<b>Pre1</b>	<b>Pre2</b>	<b>Pre3</b>	<b>Post1</b>	<b>Post2</b>	<b>Post3</b>
Rato1	46	51	48	68	45	37
Rato2			53	45	26	50
Rato4	28	30	30	25	26	32
Rato5	28	53	48	30	28	35
Rato6	47		40	35	19	
Rato8	42	48	80	43	38	48
Rato9	40	45	34	21	34	33
<b>MÉDIA</b>	<b>38,5</b>	<b>45,4</b>	<b>47,6</b>	<b>38,1</b>	<b>30,9</b>	<b>39,2</b>
<b>DP</b>	<b>8,5</b>	<b>9,1</b>	<b>16,5</b>	<b>15,8</b>	<b>8,7</b>	<b>7,8</b>

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos.

GRÁFICO 8 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO HFS4C



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo LFS2C foi encontrado Pre1=46,1 (DP=16,9), Pre2=41,1 (DP=7), Pre3=44,6 (DP=5,7), Post1=42,8 (DP=16,7), Post2=41,4 (DP=17), Post3=48,5 (DP=20,1). A comparação dos valores prévios e posteriores à ECC não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 11 e Gráfico 9).

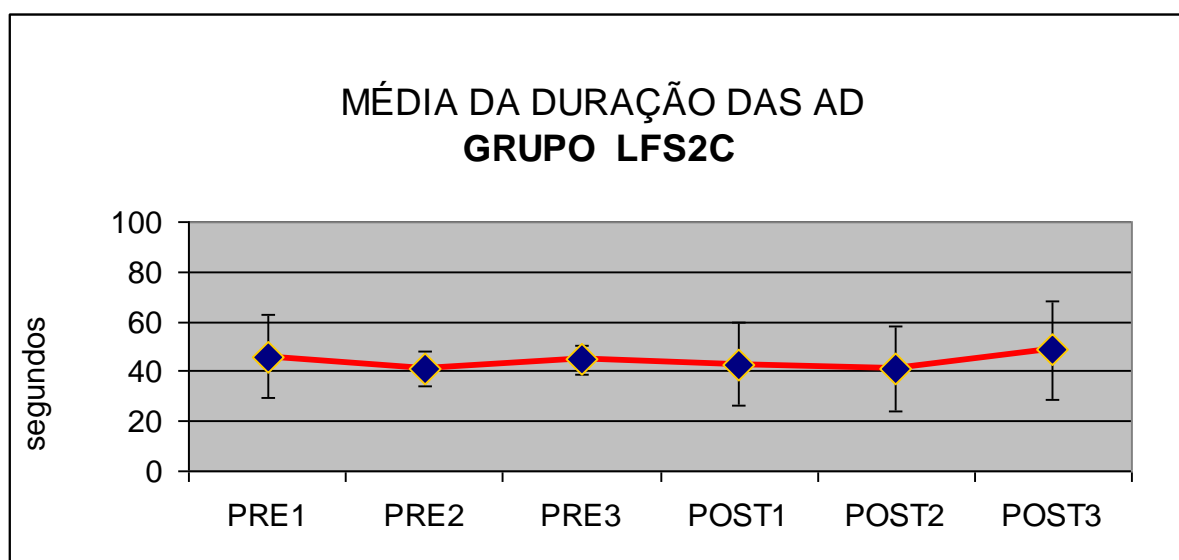
TABELA 11 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO LFS2C.

Grupo LFS2C	Pre1	Pre2	Pre3	Post1	Post2	Post3
Rato1	74		52	72	68	70
Rato2	38	39	40	26	44	74
Rato3	66	31	48	61	67	74
Rato4	51	43	51	41	32	32
Rato5	41	33	37	39	26	33
Rato6	44	49	47	44	28	33
Rato7	25	47	43	37	35	37
Rato8	30	46	39	22	31	35
<b>MÉDIA</b>	<b>46,1</b>	<b>41,1</b>	<b>44,6</b>	<b>42,8</b>	<b>41,4</b>	<b>48,5</b>
<b>DP</b>	<b>16,9</b>	<b>7,0</b>	<b>5,7</b>	<b>16,7</b>	<b>17,0</b>	<b>20,1</b>

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos.

GRÁFICO 9 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO LFS2C



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo LFS4C foi encontrado Pre1=39,9 (DP=12,1), Pre2=43,6 (DP=10,2), Pre3=41,3 (DP=6,9), Post1=34,7 (DP=5,6), Post2=30,9 (DP=8,2), Post3=28,8 (DP=10,1). Apenas a diferença entre os valores de Pre3 e Post3 foi estatisticamente significativa, havendo uma queda na duração em Post3 ( $p=0,043$ ) (Tabela 12 e Gráfico 10).

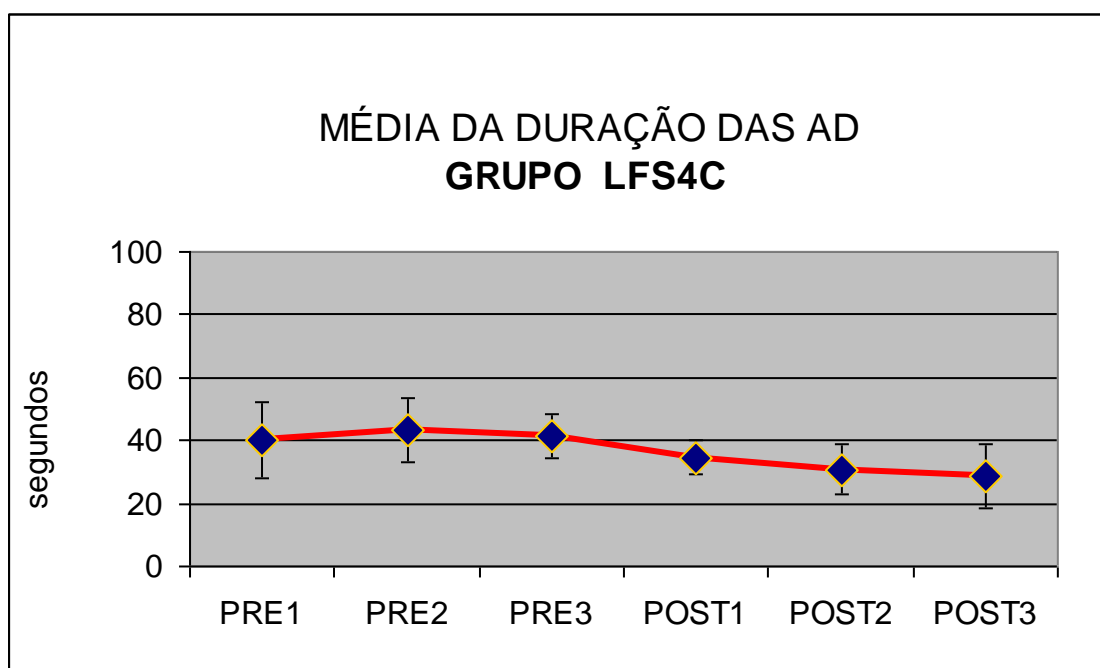
TABELA 12 – RELAÇÃO DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO LFS4C.

Grupo LFS4C	Pre1	Pre2	Pre3	Post1	Post2	Post3
Rato1	59	54	37	32	20	12
Rato2	41	46	49	30	26	22
Rato3	51	59	52	37	34	38
Rato4	29	31	38		44	38
Rato5	24	40	42	36	26	31
Rato6	36	34	38	44	28	32
Rato7	39	41	33	29	38	
<b>MÉDIA</b>	<b>39,9</b>	<b>43,6</b>	<b>41,3</b>	<b>34,7</b>	<b>30,9</b>	<b>28,8</b>
<b>DP</b>	<b>12,1</b>	<b>10,2</b>	<b>6,9</b>	<b>5,6</b>	<b>8,2</b>	<b>10,1</b>

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos.

GRÁFICO 10– MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS AD ENCONTRADAS NO GRUPO LFS4C



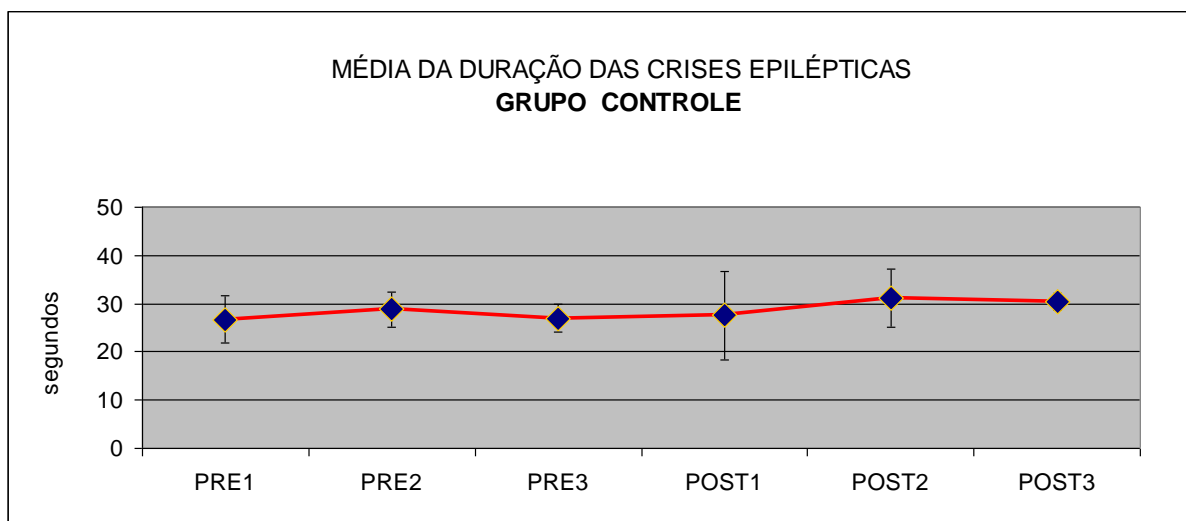
FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

#### 4.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Não foram observadas alterações comportamentais nos grupos de animais durante a aplicação da ECC. A média dos valores encontrados referentes à duração das crises epilépticas (em segundos) no grupo Controle foi de Pre1=26,7 (DP=4,9), Pre2=28,8 (DP=3,7), Pre3=27,0 (DP=2,8), Post1=27,6 (DP=9,2), Post2=31,2 (DP=6,1), Post3=30,4 (DP=1,8). A comparação dos valores prévios e posteriores à ECC não apresentou diferença estatisticamente significativa (Gráfico 11).

GRÁFICO 11 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO CONTROLE

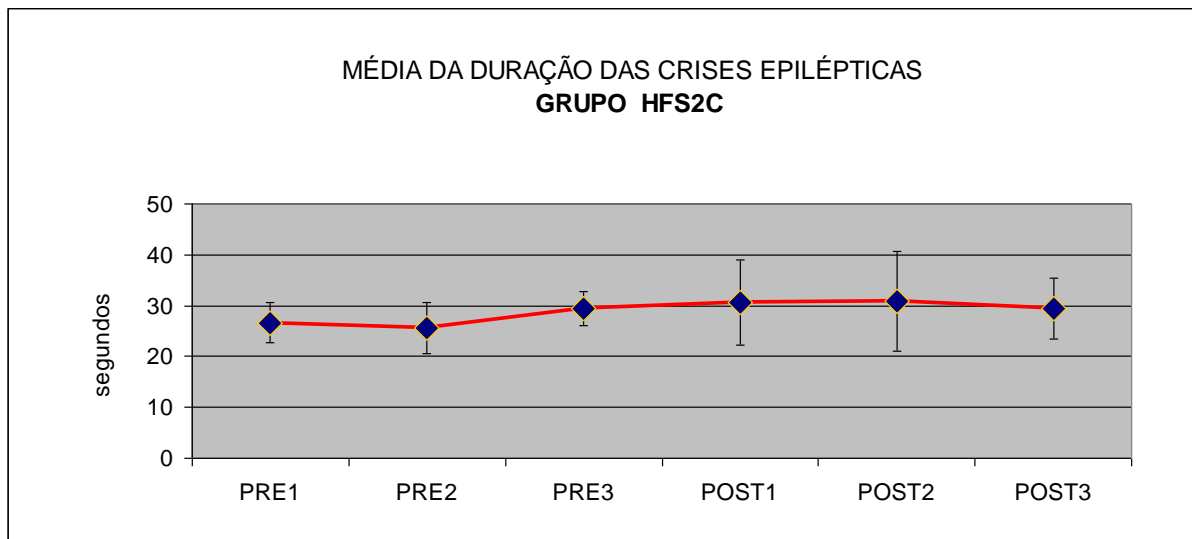


FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo HFS2C foi encontrado Pre1=26,7 (DP=3,9), Pre2=25,7 (DP=5,0), Pre3=29,4 (DP=3,4), Post1=30,7 (DP=8,4), Post2=30,8 (DP=9,9), Post3=29,5 (DP=6,0). A comparação dos valores prévios e posteriores à ECC não apresentou diferença estatisticamente significativa (Gráfico 12).

GRÁFICO 12 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO HFS2C

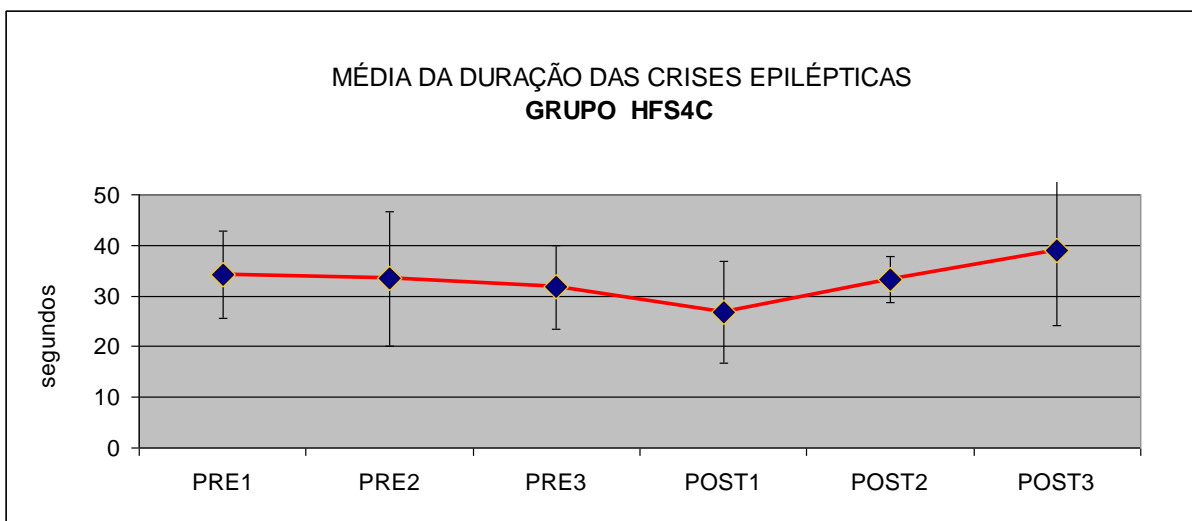


FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo HFS4C foi encontrado Pre1=34,1 (DP=8,6), Pre2=33,4 (DP=13,4), Pre3=31,7 (DP=8,2), Post1=26,8 (DP=10,0), Post2=33,3 (DP=4,6), Post3=39,0 (DP=14,9). A comparação dos valores prévios e posteriores à ECC não apresentou diferença estatisticamente significativa (Gráfico 13).

GRÁFICO 13 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO HFS4C

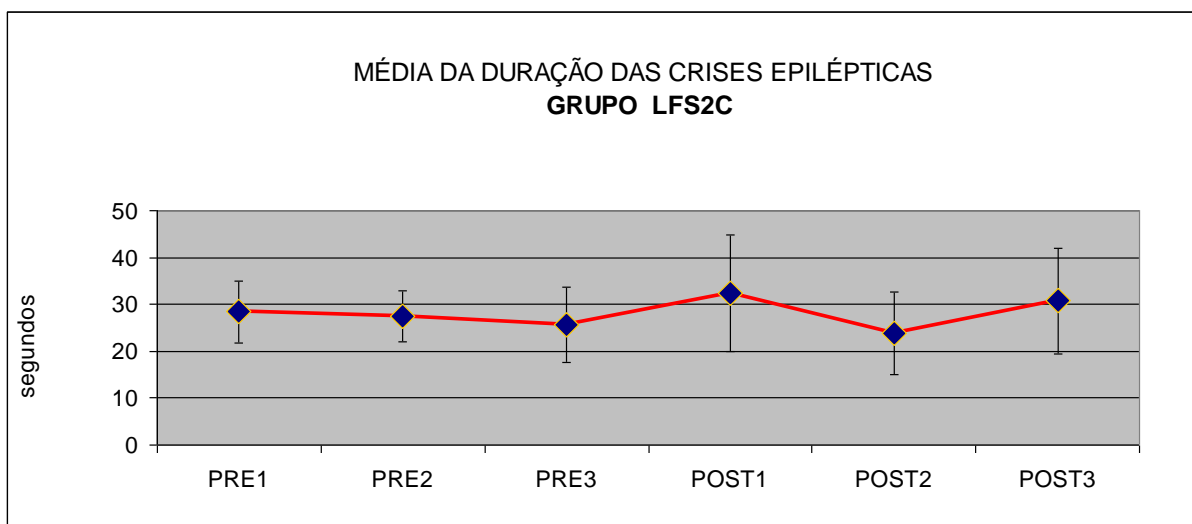


FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo LFS2C foi encontrado Pre1=28,4 (DP=6,6), Pre2=27,5 (DP=5,5), Pre3=25,6 (DP=8), Post1=32,4 (DP=12,4), Post2=23,9 (DP=8,7), Post3=30,7 (DP=11,2). A comparação dos valores prévios e posteriores à ECC não apresentou diferença estatisticamente significativa (Gráfico 14).

GRÁFICO 14 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO LFS2C

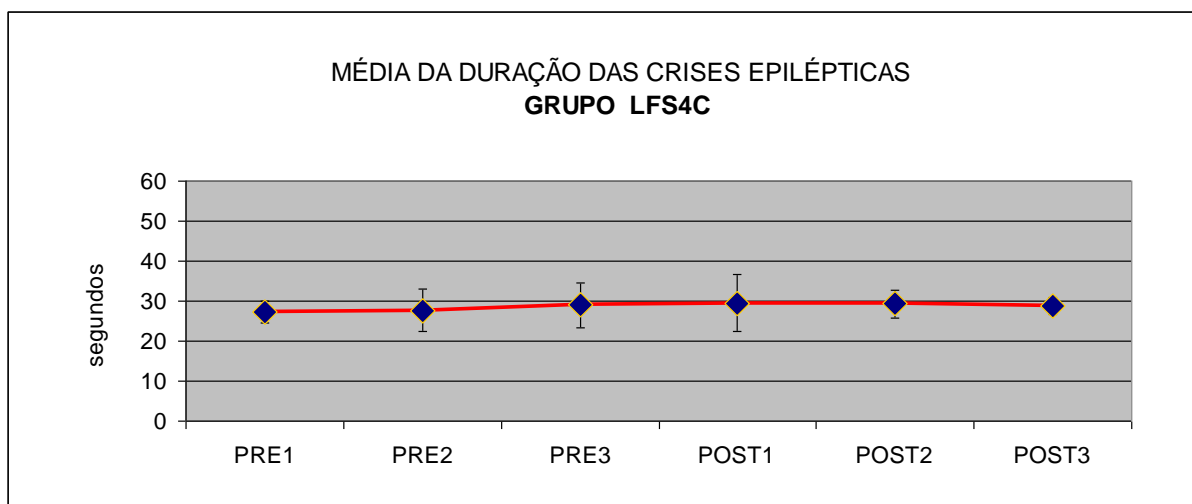


FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

No grupo LFS4C foi encontrado Pre1=27,2 (DP=2,7), Pre2=27,7 (DP=5,4), Pre3=29,0 (DP=5,6), Post1=29,5 (DP=7,1), Post2=29,3 (DP=3,5), Post3=28,8 (DP=2,1). A comparação dos valores prévios e posteriores à ECC não apresentou diferença estatisticamente significativa (Gráfico 15).

GRÁFICO 15 – MÉDIAS DA DURAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS NO GRUPO LFS4C



FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados expressos em segundos. Médias com barras sinalizando um desvio padrão acima e um abaixo da média.

## 5 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; SEMAH et al., 1998; VOLCY GÓMEZ, 2004). 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 et al., 1989; VOLCY GÓMEZ, 2004). Na busca de modalidades terapêuticas menos invasivas, de maior eficácia e com ampla indicação, formas alternativas têm sido pesquisadas.

### 5.1 DISCUSSÃO DOS ACHADOS REFERENTES À AQUISIÇÃO DO *KINDLING* HIPOCAMPAL

#### 5.1.1 Registro eletrofisiológico

Os animais selecionados para compor o estudo apresentaram nos traçados de LFP do início do processo o padrão eletroencefalográfico típico do modelo de *kindling* hipocampal. A saber, pós-descarga primária com início precoce e de alta amplitude, um intervalo relativamente silencioso, um rebote com ondas lentas de alta amplitude (pós-descarga secundária), bem como a presença de WDS entremeadas nos períodos descritos. (MCINTYRE; KELLY, 1993; LERNER-NATOLI et al., 1983).

Em 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 registro invasivo proveniente do hipocampo de pacientes epiléticos. BRAGIN descreve que a ocorrência

destes descargas (*ripples*) está restrita ao hipocampo que recebeu a injeção de kainato (BRAGIN et al., 1999). Os *ripples* presentes no experimento descrito nesta tese foram encontrados não somente no hipocampo estimulado, como também no hipocampo contralateral.

### 5.1.2 Padrão comportamental.

Foram registrados, neste experimento, os padrões comportamentais conhecidos referentes ao modelo de *kindling* hipocampal. Os animais apresentaram os estágios motores classificados por Racine e desenvolveram durante a grande maioria das crises epiléticas a típica sequência 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 (RACINE, ROSE e BURNHAM, 1972).

## 5.2 DISCUSSÃO DOS ACHADOS REFERENTES À ECC

### 5.2.1 Análise da ECC de alta frequência

As técnicas de estimulação elétrica utilizadas com o intuito de modular a excitabilidade neuronal presente de indivíduos epiléticos podem influenciar tanto sinapses quanto correntes elétricas celulares intrínsecas. Em ambas as formas, a ECC leva a uma permanentemente elevada atividade sináptica que conduz a uma diminuição progressiva da transmissão sináptica e a uma adaptação das correntes intrínsecas celulares. Isto leva a uma importante característica da aplicação da ECC, a capacidade de modular a atividade celular, sem impedir o funcionamento básico do circuito neuronal como um todo (TURRIGIANO e NELSON, 2004; VAN WELIE et al., 2004).

A utilização da HFS almejando-se à supressão da atividade epiléptica é justificada, pois a HFS pode induzir a plasticidade sináptica na forma de depressão de curta duração, longa duração ou ambas (CONTZEN e WITTE, 1994; DUDEK e BEAR, 1993; SHENG e KIM, 2002; STEVENS e TSUJIMOTO, 1995; ZUCKER e REGEHR, 2002). Foi descrito que a HFS pode potencializar a ação da ácido glutâmico descarboxilase e minimiza a atividade da proteína quinase cálcio-calmodulina dependente II, levando à inibição da rede neural do local estimulado (LIANG et al., 1996). Dados obtidos com pesquisas em modelos animais revelaram que a excitabilidade da rede neuronal pode ser modulada pela estimulação cerebral de alta e baixa frequências. CUELLAR-HERRERA et al. aplicou HFS bilateral a 130Hz em ratos durante uma hora após cada sessão de *kindling* hipocampal. Em seu estudo observou-se que a estimulação interferiu na epileptogênese prevenindo a aquisição plena do *kindling* hipocampal e aumentando a refratariedade do período pós-ictal à repetida estimulação desencadeante (CUELLAR-HERRERA et al., 2009). WYCKHUYS et al. aplicou continuamente HFS em ratos submetidos ao modelo de *kindling* hipocampal durante uma semana. A ECC foi capaz de modular as características da AD, elevando seu limiar e reduzindo sua duração (WYCKHUYS et al., 2007). Tais modificações foram principalmente observadas quando a ECC foi mantida durante a estimulação desencadeante utilizada nas determinações do ADT. No experimento desta tese os efeitos inibitórios da atividade epiléptica promovido pela estimulação dessincronizante foi observado não somente logo após a interrupção da mesma, como também por pelo menos dois dias após.

Mais recentemente, Wyckhuys et al. reportaram maior eficácia da HFS em comparação à LFS na modulação da excitabilidade em ratos submetidos ao modelo de *kindling* hipocampal rápido de dias alternados (WYCKHUYS et al., 2010). Neste estudo relatou-se um aumento do ADT quando as ADs foram desencadeadas durante a aplicação de HFS contínua, no entanto a duração das ADs não foi influenciada de forma relevante. No mesmo estudo, a LFS contínua não afetou o ADT e a duração das ADs de forma significativa. Estes achados diferem dos nossos em que a LFS aumentou o ADT e a HFS

reduziu a duração das ADs . Estas diferenças podem ser devido a detalhes nos modelos empregados, bem como nas técnicas de estimulação adotadas em cada estudo. Em nosso experimento, optou-se pelo *kindling* padrão, onde os animais desenvolvem a primeira crise comportamental generalizada 40,5 dias (DP = 18,5) após o início do processo, enquanto que no outro modelo, o foco epiléptico foi induzido após quatro dias de estimulação. Além disso, a distância entre pontas dos eletrodos utilizados para criar o foco ictal foi dez vezes maior em nosso experimento. Quanto aos paradigmas de estimulação, os estímulos foram entregues de forma rotatória incluindo os contatos usados para a indução do kindling. Como resultado, amplitudes consideravelmente maiores puderam ser aplicadas, o que pode ter levado a um maior recrutamento e sincronização neuronal, contribuindo para a redução da excitabilidade em nosso experimento. Estes achados reforçam a hipótese de que modo de aplicação, amplitude e frequência do estímulo podem desempenhar papéis relevantes na modulação da excitabilidade no modelo animal de *kindling*.

Teorias correntes vêm a explicar os possíveis mecanismos de funcionamento da estimulação cerebral profunda por influência não somente local na atividade neuronal:

- (1) HFS pode induzir um bloqueio dos canais iônicos voltagem-dependente de membrana adjacentes à área estimulada (**bloqueio por despolarização**) (BEURRIER et al., 2001).
- (2) Inibição mediada por sinapses pode ocorrer através de ativação antidrômica de aferências neuronais, associada à liberação de GABA (**inibição GABAérgica**) (DOSTROVSKY et al., 2000; FEUERSTEIN et al., 2011).
- (3) Postula-se que a excitação ortodrômica de axônios eferentes pode levar à inibição da transmissão sináptica em áreas de projeção por exaustão das reservas de neurotransmissores (**depressão sináptica**) (ZUCKER e REGEHR, 2002).
- (4) A atividade neuronal pode ainda ser mascarada pelo sinal não fisiológico de alta frequência causando uma inibição funcionamento do neurônio (**“jamming” neuronal**) (MONTGOMERY e BAKER, 2000).

### 5.2.2 Análise da ECC de baixa frequência

Baseado nos estudos de *long term depression* (LTD) *in vitro*, a investigação da LFS foi estendida para modelos animais de epilepsia temporal (CHRISTIE et al., 1994; LINDEN, 1994), onde se mostrou, também, capaz de modular a excitabilidade neuronal. A aplicação diária de LFS por 15 minutos pelos eletrodos utilizados para a indução do *kindling* foi descrita como “*quenching phenomenon*”. O *quenching* foi capaz de bloquear o desenvolvimento e progressão da AD, no modelo de *kindling* amigdaliano em ratos, bem como, induzir supressão das crises epilépticas em ratos após a aquisição plena do *kindling*. (WEISS et al., 1995, 1998).

Os dados obtidos através da LFS em outras áreas que a amígdala reforçam a importância desta modalidade de estimulação. MOHAMMAD-ZADEH et al. reportou o potencial efeito antiepileptogênico da LFS quando aplicada no *tractus perforans* através da inibição da transmissão sináptica no giro denteado (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2007). GOODMAN et al. descreveu que a utilização de LFS durante os 30 segundos prévios ao estímulo desencadeante foi capaz de reduzir a frequência de crises epilépticas em ratos com plena aquisição do *kindling* amigdaliano. (GOODMAN et al., 2005). CARRINGTON et al. comparou o efeito antiepileptogênico da LFS aplicada nos eletrodos utilizados para o *kindling* amigdaliano com a estimulação de uma área mais ampla. Para a estimulação de uma área mais ampla um eletrodo bipolar com ampla separação entre as pontas foi utilizado. A amígdala foi selecionada para este experimento devido à organização unilateral de sua rede neural epiléptica. Rede esta que, no hipocampo, tende à bilateralidade devido à otimizada conexão com o hipocampo contralateral, levando a um recrutamento contralateral quase que imediato nos eventos ictais. Animais com plena aquisição do *kindling* receberam LFS durante 30 a 90 segundos antes do estímulo desencadeante. A LFS aplicada através dos eletrodos do *kindling* foi capaz de elevar o limiar de AD de forma significativa. A estimulação mais ampla foi capaz de induzir um discreto aumento no limiar de AD, porém significativamente inferior ao obtido na primeira modalidade descrita. O

cérebro dos animais deste estudo foi submetido ao estudo neuropatológico e nenhuma anomalia relevante foi detectada. Com este estudo pôde-se concluir que a LFS aplicada diretamente à rede neural onde o *kindling* é induzido apresenta propriedades antiepileptogênicas mais intensas que quando aplicada a uma área menos especificamente relacionada. Especula-se que a obtenção do mesmo efeito quando da estimulação de uma área mais ampla poderia ser alcançada com a estimulação em maior intensidade e/ou eletrodos com contatos de maior superfície (CARRINGTON et al.; 2007). No experimento descrito nesta tese, foi utilizada uma amplitude de estimulação cerca de seis vezes superior e isto não foi capaz de induzir elevação significativa no ADT do grupo onde a estimulação não incluiu os eletrodos através dos quais o *kindling* foi realizado (grupo LFS2C). Este dado reforça a importância da estimulação precisa do foco ictal quando na busca da supressão da atividade epileptogênica. Bem como nos resultados obtidos através da estimulação do foco ictal induzido pelo *kindling* amigdaliano, a LFS foi capaz em nosso experimento de elevar o ADT quando aplicada ao modelo de *kindling* hipocampal. Interessante é ressaltar que a elevação do ADT no grupo de animais onde a LFS foi aplicada de forma alternada e incluiu os eletrodos utilizados para a indução do *kindling* - grupo LFS4C - perdurou por pelo menos 2 dias após sua interrupção. Estes achados reforçam o papel da LFS na busca da supressão do foco epiléptico no modelo de *kindling* hipocampal e sugerem seu potencial benefício em outros modelos de epilepsia temporal.

YAMAMOTO et al. relatou em seu estudo a aplicação subdural da LFS em pacientes com ELT mesial refratária. Neste estudo ele comparou o efeito de diferentes intensidades de estimulação. Ao se utilizar 0.5 mA de intensidade observou-se uma redução do número de descargas interictais desencadeadas. Com a aplicação de intensidades de 2,0 mA e 7,5 mA, auras epilépticas foram desencadeadas e pós-descargas foram visualizadas nos registros eletroencefalográficos. Estes achados demonstraram que a LFS foi capaz de produzir efeito inibitório da atividade epileptogênica e que é necessário cautela em sua aplicação cortical devido ao risco de se desencadear atividade epileptogênica com maiores

intensidades de estimulação (YAMAMOTO et al., 2002). No experimento descrito nesta tese a LFS aplicada no grupo LFS4C foi testada até o limite máximo de sua utilização sem haver desencadeado atividade epileptiforme ou modificação comportamental. Este dado sugere haver uma maior tolerabilidade e portanto maior segurança na aplicação da LFS hipocampal quando comparada à LFS cortical.

As razões pelas quais o efeito antiepiléptico foi mais evidente com o uso da estimulação dessincronizante pode ser devido à menor distância entre o estímulo e o foco ictal. Embora a estimulação com dois contatos abrangesse o foco ictal, a distância entre ambos foi maior em comparação com aquela modalidade. Outro aspecto relevante sobre estimulação aplicada por quatro contatos é o fato de os pares de contatos serem estimulados alternadamente com um intervalo fixo entre cada par. Uma vez que os pares de contatos são estimulados de forma alternada, a atividade da população neuronal é sincronizada a tempos diferentes, criando subpopulações funcionais e dessincronizando o sistema como um todo. Este paradigma de estimulação foi desenvolvido baseado nos experimentos teóricos com modelos de estimulação cerebral dessincronizante e seu efeito inibidor do *kindling*. Este mecanismo foi descrito como *resetting techniques* supostamente capazes de interferir nas ondas epilépticas de modelos neuronais (HAUPTMANN et al., 2005; TASS e MAJTANIK, 2006).

Os mecanismos envolvidos na elevação do limiar de AD em animais tratados com LFS contínua necessitam ser mais bem compreendidos. Ressalta-se a importância de se acessar os efeitos da LFS na liberação local de neurotransmissores, mudanças nas propriedades de ligação de receptores e na densidades dos neurotransmissores, bem como modificações na expressão gênica associadas ao relativamente duradouro aumento do limiar de AD. Experimentos futuros deverão determinar a eficácia da LFS contínua em diferentes modelos de epilepsia, bem como testar o efeito de paradigmas de LFS contínua cíclica ou intermitente.

## 6. CONCLUSÕES

Com este estudo concluiu-se que:

- A) O sistema computacional *Spike2* é adequado para a análise do efeito da EEC no modelo de *kindling* hipocampal em ratos Wistar, sendo capaz de registrar simultaneamente o traçado de LFP e o padrão comportamental e oferecer ferramentas analíticas pertinentes ao modelo.
  
- B) O sistema computacional *Matlab 6.5* é adequado para a análise do efeito da EEC no conteúdo de frequência do traçado de LFP obtido através do modelo de *kindling* hipocampal em ratos Wistar.
  
- C) A estimulação elétrica do foco ictal no modelo de *kindling* hipocampal em ratos Wistar modificou a atividade epiléptica do sistema neural, sendo a LFS rotatória capaz de elevar o limiar de AD por pelo menos 2 dias após a interrupção da estimulação e a HFS rotatória capaz de reduzir a duração das ADs.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BEAR, M.F.; ABRAHAM WC. Long-term depression in hippocampus. **Annu. Rev. Neurosci**, v.19, p. 19437-462, 1996.

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.

BEURRIER, C; BIOULAC, B.; AUDIN, J.; HAMMOND, C. High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. **J Neurophysiol**, v. 85(4), p. 1351-1356, 2001.

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 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.

CARRINGTON, C.A.; GILBY, K.L.; MCINTYRE, D.C. Effect of focal low-frequency stimulation on amygdala-kindled afterdischarge thresholds and seizure profiles in fast- and slow-kindling rat strains. **Epilepsia**, v. 48(8), p.1604-1613, 2007.

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.

CHEN W.R.; LEE S.; KATO K.; SPENCER D.D.; SHEPHERD G.M.; WILLIAMSON A. Long-term modifications of synaptic efficacy in the human inferior and middle temporal cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.**, v. 15, p. 8011-15, 1996.

CHRISTIE BR, ABRAHAM WC. L-type voltage-sensitive calcium channel antagonists block heterosynaptic long-term depression in the dentate gyrus of anaesthetized rats. **Neurosci. Lett.** V. 167, p. 4145, 1994.

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.

CONTZEN R.; WITTE O.W. Epileptic activity can induce both long lasting potentiation and long-lasting depression. **Brain Res**, v. 653, p. 340 –344, 1994.

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

CORDEIRO, J.G.; CAPURRO, A.; AERTSEN, A.; CORDEIRO, K.K.; ARAÚJO, J.C.; SCHULZE-BONHAGE A. Improvement in hippocampal kindling analysis through computational processing data. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 67(3A), p. 677-683, 2009.

CUELLAR-HERRERA M.; NERI-BAZAN L.; ROCHA L.L. Behavioral effects of high frequency electrical stimulation of the hippocampus on electrical kindling in rats. **Epilepsy Res**, v. 72(1), p. 10-17, 2006.

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 aktueller Muster in einer EEGI-Datenbank für die Entwicklung und Evaluation von Algorithmen zur automatisierten Detektion von Anfallsmustern. **Klin Neurophysiol**, v.34, p. A8, 2003.

DOSTROVSKY, J.O.; LEVY, R.; WU, J.P.; HUTCHISON, W.D.; TASKER, R.R.; LOZANO, AM. Microstimulation-induced inhibition of neuronal firing in human globus pallidus. **J Neurophysiol**, v. 84(1), p. 570-574, 2000.

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

DUDEK S.M.; BEAR M.F. Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. **J Neurosci**, v. 13, p. 2910 –18, 1993.

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.

FEUERSTEIN, T.J.; KAMMERER, M.; LÜCKING, C.H.; MOSER, A. Selective GABA release as a mechanistic basis of high-frequency stimulation used for the treatment of neuropsychiatric diseases. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 384(1), p. 1-20, Jul 2011 .

FISHER, R.; SALANOVA, V.; WITT, T. et al. Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 51, p. 899-908, 2010.

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.; DIESMANN, 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.

GOODMAN, J.H.; BERGER, R.E.; TCHENG, T.K. Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. **Epilepsia**, v. 46(1), p.1-7, 2005.

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.

KINOSHITA M.; IKEDA A.; MATSUHASHI M.; et al. Electric cortical stimulation suppresses epileptic and background activities in neocortical epilepsy and mesial temporal lobe epilepsy. **Clin Neurophysiol**, v. 116(6), p. 1291-1299, 2005.

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.

LADO F.A.; VELISEK L.; MOSHE S.L. The effect of stimulation of the subthalamic nucleus on seizures is frequency dependent. **Epilepsia**, v. 44, p. 157-64, 2003.

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

LIANG F.; ISACKSON P.J.; JONES E.G. Stimulus-dependent reciprocal up- and down regulation of glutamic acid decarboxylase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II gene expression in rat cerebral cortex. **Exp Brain Res**, v. 110, p. 163–174, 1996.

LINDEN, D.J. Long-term synaptic depression in the mammalian brain. **Neuron**, v. 12, p. 457–472, 1994.

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.

LÓPEZ-MERAZ M.L.; NERI-BAZÁN L.; ROCHA L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. **Epilepsy Res**, v. 59(2-3), p. 95-105, 2004.

LOTHMAN, E.W. The neurobiology of epileptiform discharges. *Am J EEG 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.

MIRSKI M.; FISHER R. Electrical stimulation of the mamillary nuclei increases seizure threshold to pentyleneetetrazol in rats. **Epilepsia**, v. 35, p. 1309–16, 1994.

MIRSKI M.A.; ROSELL L.A.; TERRY J.B.; FISHER R.S. Anticonvulsant effect of anterior thalamic high frequency electrical stimulation in the rat. **Epilepsy Rev**, v. 28, p. 89 –100, 1997.

MOHAMMAD-ZADEH, M.; MIRNAJAFI-ZADEH, J.; FATHOLLAHI, Y.; JAVAN, M.; GHORBANI, P.; SADEGH, M.; NOORBAKHSI, S.M. Effect of low frequency stimulation of perforant path on kindling rate and synaptic transmission in the dentate gyrus during kindling acquisition in rats. **Epilepsy Res**, v. 75, p.154-161, 2007.

MONTGOMERY, E.B.; BAKER, K.B. Mechanisms of deep brain stimulation and future technical developments. **Neurol Res**, v. 22(3), p. 259-266, 2000.

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.

MORRELL, M.J. Responsive cortical stimulation for the treatment of medically intractable partial epilepsy. **Neurology**, v. 77, p. 1295-1304, 2011.

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

NORONHA, A.L.A. et al. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. **Epilepsia**, v. 48(5), p.880–885, Mai 2007.

OSORIO I.; FREI M.G.; SUNDERAM S.; et al. Automated seizure abatement in humans using electrical stimulation. **Ann. Neurol**, v. 57(2), p. 258-268, 2005.

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

- PAXINOS, G. The rat nervous system. San Diego: **Academic Press**, 2004, p.443-486.
- 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.
- 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.
- SCHRADER L.M. Low frequency electrical stimulation through subdural electrodes in a case of refractory status epilepticus **Clinical Neurophysiology**, v. 117, p. 781–788, 2006.
- SCHULZE-BONHAGE, A. Deep brain stimulation: a new approach to the treatment of epilepsy. **Deutsches Ärzteblatt**, v. 106, p. 407-412, 2009.
- SEIDENBECHER, T.; STAAK, R.; PAPE, H.C. Relations between cortical and thalamic cellular activities during absence seizures in rats. **Eur J Neurosci**, v. 10, p. 1103–1112, 1998.
- 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.
- SHENG M.; KIM M.J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. **Science**, v. 298, p. 776 –780, 2002.
- 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
- SOLGER J.; WOZNY C.; MANAHAN-VAUGHAN D.; BEHR J. Distinct mechanisms of bidirectional activity-dependent synaptic plasticity in superficial and deep layers of rat entorhinal cortex. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 2003–2007, 2004.
- STEVENS C.F.; TSUJIMOTO T. Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 846–849, 1995.

TASS P.A.; MAJTANIK M. Long-term anti-kindling effects of desynchronizing brain stimulation: a theoretical study. **Biol Cybern**, v. 94(1) , p. 58-66, 2006.

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

TOMASULO, R.; RAMIREZ, J.; STEWARD, O. Synaptic inhibition regulates associative interactions between afferents during the induction of long-term potentiation and long term depression. **Proc. Natl. Acad Sci**. v. 90, p. 11578-82, 1993.

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.

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.

TURRIGIANO G.G.; NELSON S.B. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 97– 107, 2004.

VAN WELIE I.; VAN HOOFT J.A.; WADMAN W.J. Homeostatic scaling of neuronal excitability by synaptic modulation of somatic hyperpolarization-activated I-h channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, p. 5123–5128, 2004.

VELASCO A.L.; VELASCO F.; VELASCO M.; TREJO D.; CASTRO G.; CARRILLO-RUIZ J.D. Electrical stimulation of the hippocampal epileptic foci for seizure control: a double-blind; long-term follow-up study. **Epilepsia**, v. 48, p. 1895-903, 2007.

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

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.

WEISS, S.R.; Eidsath A; LI XL; Heynen T; Post RM. Quenching revisited: low level direct current inhibits amygdala-kindled seizures. **Exp. Neurol**, v. 154(1), p.185-192, 1998.

WEISS, S.R.; LI, X.L.; ROSEN, J.B.; LI, H.; HEYNEN, T.; POST, R.M. Quenching: inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low frequency stimulation. **Neuroreport**, v. 13(6), p. 2171-2176, 1995.

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.

WYCKHUYS T.; DE SMEDT T.; CLAEYS P. et al. High frequency deep brain stimulation in the hippocampus modifies seizure characteristics in kindled rats. **Epilepsia**, v. 48(8), p. 1543-1550, 2007.

WYCKHUYS, T.; RAEDT, R.; VONCK, K.; WADMAN, W.; BOON, P. Comparison of hippocampal Deep Brain Stimulation with high (130Hz) and low frequency (5Hz) on afterdischarges in kindled rats. **Epilepsy Res**, v. 88(2-3), p. 239-246, 2010.

YAMAMOTO J.; IKEDA A.; SATOW T.; et al. Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, p. 491-5, 2002

ZHANG D.X., LEVY W.B. Bicuculline permits the induction of long-term depression by heterosynaptic, translaminar conditioning in the hippocampal dentate gyrus. **Brain Res**. V. 6, p. 13:309-12, 1993.

ZUCKER R.S.; REGEHR W.G. Short-term synaptic plasticity. **Annu Rev Physiol**, v. 64, p. 355- 405, 2002.

ZUCKER, R.S.; REGEHR, W.G. Short-term synaptic plasticity. **Annu Rev Physiol**, v. 64, p. 355- 405, 2002.

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

### JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 27, 2012

---

---

This is a License Agreement between joacir cordeiro ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2837150075355
License date	Jan 27, 2012
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	Epilepsia
Licensed content title	Deep Brain Stimulation in Patients with Refractory Temporal Lobe Epilepsy
Licensed content author	Paul Boon,Kristl Vonck,Veerle De Herdt,Annelies Van Dycke,Maarten Goethals,Lut Goossens,Michel Van Zandijcke,Tim De Smedt,Isabelle Dewaele,Rik Achten,Wytse Wadman,Frank Dewaele,Jacques Caemaert,Dirk Van Roost
Licensed content date	Aug 1, 2007
Start page	1551
End page	1560
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Number of extracts	
Original Wiley figure/table number(s)	Figure A and B
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Portuguese

## ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGENS

### JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 27, 2012

---

---

This is a License Agreement between joacir cordeiro ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2837161183506
License date	Jan 27, 2012
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	Epilepsia
Licensed content title	Chronic High-Frequency Deep Brain Stimulation of the STN/SNr for Progressive Myoclonic Epilepsy
Licensed content author	Jan Vesper, Bernhard Steinhoff, Sabine Rona, Christian Wille, Sonja Bilic, Guido Nikkhah, Christoph Ostertag
Licensed content date	Oct 1, 2007
Start page	1984
End page	1989
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Number of extracts	
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Portuguese

## ANEXO 3 – AUTORIZAÇÃO PARA A REPRODUÇÃO DE IMAGENS



Dear Dr. Cordeiro,

We hereby grant you permission to reprint the material below 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. This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. 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

Laura Pritchard

Senior Rights Associate | ELSEVIER | The Boulevard | Langford Lane | Kidlington | Oxford OX5 1GB |

Tel: +44 1865 843517 Fax: +44 1865 853333

[l.pritchard@elsevier.com](mailto:l.pritchard@elsevier.com)

#### **ANEXO 4 - SUPORTE FINANCEIRO**

O projeto foi desenvolvido na *Uniklinik-Freiburg* (Universidade de *Freiburg*, Alemanha) em cooperação com a Universidade Federal do Paraná pelo autor desta, sob a supervisão do Prof. Dr. Andreas Schulze-Bonhage (chefe do departamento de epilepsia da *Uniklinik-Freiburg*) e Prof. Dr. Ad Aertsen (*Freiburger Bernstein Center for Computational Neuroscience-FBCCN*) e orientação do Prof. Dr. João Cândido Araújo. O experimento foi financiado pelo *Bundesministerium für Bildung und Forschung* - BMBF (Grant BMBF-01GQ0420 para BCCN *Freiburg*, BMBF-01GQ0830 para BFNT *Freiburg/Tübingen*).