

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EPILEPSIA EXPERIMENTAL E FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS: EFEITO NA
MEMÓRIA ESPACIAL E NA POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO
INDUZIDA *IN VITRO***

Michele Franzen Pedroso

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Neurociências,
da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, para a obtenção de Título de Mestre.

Porto Alegre

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Aos meus pais, Sônia e Juarez, e ao meu
Irmão, Juarez Filho**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Dr. Jaderson pela confiança, pelo exemplo de pesquisador, por ter acreditado que eu seria capaz de chegar até aqui, e pela visão segura que me deu autoconfiança e permitiu-me superar os percalços do caminho.

À Carmem Sílvia pelo incentivo e primeiro contato com a pesquisa.

Aos Colegas do Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS: Andrea, Affonso, Daniel, Daniela, Fabiana, Fernanda Noal, Gianina, Raquel, Ricardo, Simone, Vinícius, Zaquer, Dr. Alexandre e Dr. Ney pelo aprendizado de diversas técnicas de laboratório e pelo agradável ambiente de trabalho.

Às Colegas Carine, Cristiane e Fernanda Borba pela ajuda incondicional em todas as etapas da pesquisa.

Aos pesquisadores André e Martín pelas correções e sugestões no desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pelo incentivo a pesquisa.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos meus pais, Sônia e Juarez pelo Amor, dedicação, incentivo e pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Ao meu irmão, Juarez Filho, que apesar da distância, sempre esteve ao meu lado.

Aos meus tios, Ceura e Gilnei pelo incentivo a alcançar meus objetivos.

À toda a minha família, pelo carinho, tolerância e firmeza nos momentos cruciais.

Ao Gustavo, pelo Amor, pela tranquilidade em momentos difíceis e por estar ao meu lado acompanhando e participando do meu crescimento.

Às Amigas Marina e Regina pela amizade e constante apoio.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Epilepsia.....	1
1.1.1. Epilepsia do Lobo Temporal.....	2
1.2. Modelo Experimental.....	7
1.3. Potenciação de Longa Duração.....	9
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Animais.....	16
3.2. Delineamento Experimental.....	16
3.3. Modelo Experimental.....	17
3.4. Tratamento Crônico com Fármacos Antiepilépticos.....	20
3.5. Treinamento no Labirinto Aquático de Morris.....	20
3.6. Estudo Eletrofisiológico.....	22

4.	ANÁLISE DOS DADOS.....	32
5.	RESULTADOS.....	33
	5.1. Memória Espacial.....	33
	5.1.1. Efeito do tempo de SE sobre o desempenho na tarefa do LAM.....	33
	5.1.2. Efeito do tratamento crônico com FAEs (DE ₅₀) em ratos normais sobre o desempenho na tarefa do LAM.....	35
	5.1.3. Efeito do tratamento crônico com FAEs (DE ₅₀) em ratos epiléticos sobre o desempenho no LAM.....	37
	5.1.4. Efeito do tratamento crônico com elevadas doses de FAEs, em ratos epiléticos sobre o desempenho no LAM.....	39
	5.1.5. Médias das latências nos treinos no LAM de todos os grupos experimentais.....	41
	5.2. Estudo Eletrofisiológico.....	43
	5.2.1. Indução de LTP em fatias hipocampais de ratos epiléticos: efeito do tempo de SE.....	43
	5.2.2. Indução de LTP em fatias hipocampais de ratos normais tratados cronicamente com FAEs (DE ₅₀).....	47

5.2.3. Indução da LTP em fatias hipocampais de ratos epilépticos tratados cronicamente com FAEs (DE ₅₀).....	51
5.2.4. Indução da LTP em fatias hipocampais de ratos epilépticos tratados cronicamente com FAEs em doses elevadas.....	54
5.2.5. Média das variações de amplitude percentual dos PEPS de todos os grupos experimentais.....	57
5.2.6. Análise do <i>Slope</i>	58
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	67
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

RESUMO

JUSTIFICATIVA: A epilepsia do lobo temporal é foco de grande interesse devido sua alta prevalência e refratariedade ao tratamento medicamentoso. Embora o déficit cognitivo decorrente da epilepsia seja multifatorial, o tratamento com fármacos antiepilépticos (FAEs), importante para o controle das crises epiléticas, pode agravar as alterações cognitivas e comportamentais.

OBJETIVO: Avaliar a influência da epilepsia e de fármacos antiepilépticos na memória espacial e na indução do fenômeno de potenciação de longa duração (LTP) na região CA1 hipocampal, em ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina.

METODOLOGIA: Os animais foram divididos em grupos conforme o tempo que permaneceram em *status epilepticus* (SE): Pilocarpina A (15 minutos) e Pilocarpina B (90 minutos). Previamente a aplicação da pilocarpina (250mg/kg i.p.), os animais receberam metilescopolamina (1mg/kg i.p.) para minimizar os efeitos colinérgicos periféricos, decorrido o tempo de SE, receberam diazepam (4mg/kg) para atenuar as manifestações comportamentais. Após 24 horas da indução do SE, os animais que permaneceram 90 minutos em SE, iniciaram o tratamento crônico com FAEs (45 dias). Os FAEs escolhidos, a carbamazepina (CBZ) e o fenobarbital (FNB), amplamente utilizados no tratamento clínico das epilepsias, foram administrados em doses terapêutica e elevada (60 e 150mg/kg e 35 e 100mg/kg respectivamente). A memória espacial foi avaliada no labirinto aquático de Morris (LAM), seguindo o protocolo de 4 dias de treino (24 sessões) com a plataforma fixa e invisível. Posteriormente, foi realizado o estudo eletrofisiológico *in vitro* de LTP.

RESULTADOS: Verificamos a necessidade de um período longo de SE (90 minutos), para ocorrer repercussões na memória espacial, assim, encontramos diferença significativa entre o grupo que permaneceu longo período em SE e o controle, durante todos os dias de treinamento ($p < 0,05$ em ANOVA). Não houve diferença no desempenho dos ratos normais no LAM entre os grupos que receberam tratamento crônico com FAEs em dose terapêutica (DE_{50}). Também não encontramos diferença entre os ratos epiléticos que receberam tratamento crônico com FAEs e aqueles que receberam solução salina, porém diferiram significativamente do controle ($p < 0,05$ em ANOVA). O tratamento crônico em doses elevadas de FAEs não apresentou diferença entre os ratos epiléticos tratados com salina,

no entanto, houve diferença entre as diferentes doses de CBZ ($p=0,034$ em ANOVA). Com relação aos dados eletrofisiológicos, encontramos dificuldade na obtenção de LTP em fatias hipocâmpais de ratos submetidos a diferentes tempos de SE. O tratamento crônico com FAEs (DE_{50}), interferiu de forma significativa na indução da LTP em fatias hipocâmpais de ratos normais ($\chi^2=11,74$ Qui-quadrado, $p=0,01$ em Teste t), e dificultou a obtenção de LTP em fatias hipocâmpais de ratos epiléticos. O tratamento crônico de ratos epiléticos com FAEs em doses elevadas, impediu a indução de LTP, independente do fármaco.

CONCLUSÕES: O déficit cognitivo está diretamente relacionado com o tempo de duração do SE, sendo necessário 90 minutos para verificar repercussões no labirinto aquático de Morris. O tratamento crônico com FAEs (CBZ ou FNB), em DE_{50} , não interfere no aprendizado espacial de rato controle, nem de epilético, e em doses elevadas também não interfere no desempenho de ratos epiléticos. Com relação aos dados eletrofisiológicos, podemos inferir que a epilepsia induzida pelo modelo experimental da pilocarpina interfere na indução da LTP, independente do tempo de SE, porém, quanto maior a duração, maior a dificuldade na obtenção de LTP. O tratamento crônico com CBZ ou FNB (DE_{50}), interfere na indução da LTP, tanto em ratos controle, quanto em epiléticos, e em doses elevadas impedi a obtenção do fenômeno de LTP.

ABSTRACT

JUSTIFICATION: The study of temporal lobe epilepsy is of great interest since its prevalence is high and not all patients can achieve acceptable seizure control. Even if the cognitive deficit due to epilepsy is multifactorial, the use of antiepileptic drugs (AEDs), important in controlling the seizures, can aggravate cognitive and behavioral alterations.

OBJETIVE: To evaluate how epilepsy and antiepileptic drugs influence spatial memory and the induction of the long term potentiation (LTP) phenomenon, in the CA1 hippocampal region, in pilocarpine-treated epileptic rats.

METHODOLOGY: Animals were divided into groups according to the period of time in which they remained in *status epilepticus* (SE): Pilocarpine A (15minutes) and Pilocarpine B (90minutes). Previous to pilocarpine (250mg/kg i.p.), animals received methylescopolamine (1mg/kg i.p.) in order to attenuate peripheral cholinergic effects. Diazepan (4mg/kg) was administered 15 and 90 minutes after the SE onset to attenuate behavior manifestations. Animals that remained 90 minutes in SE started the chronic treatment with AEDs (45 days) 24 hours after SE induction. The drugs of choice were carbamazepine (CBZ) and Phenobarbital (PB), administered in both therapeutic and elevated doses (60mg/kg, 150mg/kg and 35mg/kg; 100mg/kg respectively). Learning and spatial memory were evaluated in the Morris Water Maze (MWM), according to the protocol of 4 training days (24 sessions). Later, the electrophysiological study of LTP was performed *in vitro*.

RESULTS: We noted a long period of SE (90 minutes) is necessary for repercussions in spatial memory to occur. We verified significant difference between the group that remained in SE for a long period of time and the control group, in every day of training ($p < 0,05$ ANOVA). There was no significant difference in the performance of control rats between the groups that received AEDs (ED_{50}). No significant difference was found between pilocarpine-treated rats receiving AEDs and those which received saline, but there was significant difference when compared to control animals ($p < 0,05$ ANOVA). No significant difference was found between chronic treatment epileptic and control animals, but there was a difference between the two doses of CBZ ($p = 0,034$ ANOVA). Concerning electrophysiological recordings, it was difficult to obtain LTP in hippocampal slices from

animals that underwent SE. Chronic treatment with AEDs (ED 50), significantly interfered in LTP induction in hippocampal slices from normal rats ($\chi^2 = 11,74$, $p = 0,01$ in t Test), and makes it difficult to obtain LTP in slices from epileptic animals. LTP could not be induced in slices from rats that underwent chronic treatment with AEDs in elevated doses.

CONCLUSIONS: Cognitive deficit is directly related to time of SE, 90 minutes of SE are necessary in order to note repercussion in MWM. AEDs (CBZ ou FNB), in ED₅₀, do not interfere in learning of control or epileptic rats, and in elevated dose does not interfere in the performance of epileptic animals. Pilocarpine-induced epilepsy interferes in induction of LTP, and the longer the time of SE the more difficult it is to obtain LTP. Chronic treatment with CBZ or PB (ED₅₀) interferes in LTP induction, for both control and pilocarpine-treated animals, and in elevated doses LTP cannot be obtained.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Posicionamento dos eletrodos para a indução da LTP.....	11
Figura 2: Delineamento experimental.....	17
Figura 3: Demonstração de animal em SE agudo (grau de Racine 5).....	18
Figura 4: Protocolo de aplicação da pilocarpina.....	19
Figura 5: Protocolo de fatiamento cerebral.....	23
Figura 6: Equipamentos utilizados para o registro eletrofisiológico.....	24
Figura 7: Diagrama demonstrando a organização dos equipamentos utilizados para os registros de PEPSC.....	25
Figura 8: Câmara de Registro e Micromanipuladores.....	26
Figura 9: Câmara de Registro Eletrofisiológico.....	27
Figura 10: Curva I/O representativa.....	28
Figura 11: Protocolo utilizado para indução de LTP.....	28
Figura 12: Exemplo da aferição da amplitude e do <i>slope</i> do PEPSC.....	30
Figura 13: Demonstração de um período estável (pré-estímulo) de um registro eletrofisiológico.....	31
Figura 14: Médias das latências de chegada à plataforma nas sessões de treino no LAM em ratos submetidos a diferentes tempos de SE.....	34
Figura 15: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos submetidos a diferentes tempos de SE.....	34
Figura 16: Médias das latências de chegada à plataforma nas sessões de treino no LAM de ratos normais tratados cronicamente com FAEs (DE ₅₀).....	36
Figura 17: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos normais tratados cronicamente com FAE (DE ₅₀).....	36
Figura 18: Médias das latências de chegada à plataforma nas sessões de treino no LAM de ratos epiléticos tratados cronicamente com FAE (DE ₅₀).....	38

Figura 19: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos epilépticos tratados cronicamente com FAE (DE ₅₀).....	38
Figura 20: Médias das latências de chegada à plataforma nas sessões de treino no LAM de ratos epilépticos tratados cronicamente com doses elevadas de FAE.....	40
Figura 21: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos epilépticos tratados cronicamente com doses elevadas de FAE.....	40
Figura 22: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos epilépticos tratados cronicamente com diferentes doses de CBZ.....	41
Figura 23: Demonstração da ocorrência de LTP em fatias hipocampais de ratos normais.....	44
Figura 24: Demonstração da não-indução de LTP e ocorrência de LTD em fatias hipocampais de ratos do grupo Pilocarpina A (SE=15 minutos).....	45
Figura 25: Demonstração da não-indução de LTP em fatias hipocampais de ratos do grupo Pilocarpina B (SE=90 minutos).....	46
Figura 26: Distribuição dos fenômenos de plasticidade sináptica, registrados em fatias hipocampais de ratos tratados cronicamente com CBZ (60mg/kg).....	48
Figura 27: Demonstração da dificuldade de indução de LTP em fatias hipocampais de ratos tratados cronicamente com FNB (35mg/kg).....	49
Figura 28: Distribuição dos fenômenos de plasticidade sináptica, registrados em fatias hipocampais de ratos tratados cronicamente com SAT.....	50
Figura 29: Demonstração da dificuldade de indução de LTP em fatias hipocampais de ratos epilépticos tratados cronicamente com CBZ (60mg/kg).....	52
Figura 30: Demonstração da não-indução de LTP em fatias hipocampais de ratos epilépticos tratados cronicamente com FNB (35mg/kg).....	53
Figura 31: Demonstração da dificuldade de indução de LTP em ratos epilépticos tratados cronicamente com CBZ (150mg/kg).....	55
Figura 32: Demonstração da não-indução de LTP em fatias hipocampais de ratos epilépticos tratados cronicamente com FNB (100mg/kg).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Comparação entre as médias das latências no LAM durante os dias de treinamento em todos os grupos.....41

Tabela II: Comparação entre médias das amplitudes do PEPS no 45º minuto pós-estímulo de alta frequência, em todos os grupos experimentais.....57

Tabela III: Alteração percentual no *Slope* do PEPSC nos diferentes grupos.....58

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
- AP5: Ácido 2-amino-5-fosfonoaléxico
- CA1: Região 1 do Corno de Amon, segundo Lorente de Nó
- CA2: Região 2 do Corno de Amon, segundo Lorente de Nó
- CA3: Região 3 do Corno de Amon, segundo Lorente de Nó
- CaMKII: Proteína cinase II dependente de cálcio e calmodulina
- CBZ: Carbamazepina
- CER: Crises Espontâneas Recorrentes
- CO: Monóxido de carbono
- DE₅₀: Dose eficaz em 50% dos animais
- DZ: Diazepan
- ELT: Epilepsia do Lobo Temporal
- EH: Esclerose Hipocampal
- PEPS: Potencial Excitatório Pós-sináptico
- PEPSC: Potencial Excitatório Pós-sináptico de Campo
- FAEs: Fármacos Antiepilépticos
- FNB: Fenobarbital
- GD: Giro Denteado
- HFS: Estimulação de alta frequência (*High Frequency Stimulation*)
- LAM: Labirinto Aquático de Morris
- LCRa: Líquido Cefalorraquidiano Artificial
- LTD: Depressão de Longa Duração (*Long Term Depression*)
- LTP: Potenciação de Longa Duração (*Long Term Potentiation*)
- MS: Metilescopolamina
- NI: Não-indução
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- PILO: Pilocarpina
- SAT: Twenn 80 a 3% de solução salina
- SE: *Status Epilepticus*
- SS: Solução Salina

1. INTRODUÇÃO

Apesar de inúmeros estudos sobre os mecanismos fisiopatogênicos relacionados à epilepsia, alguns fatores, ainda permanecem obscuros, dentre eles, as alterações cognitivas decorrentes da própria patologia ou influenciadas pelos tratamentos com fármacos antiepilépticos.

Assim, há necessidade de estudos que possam analisar tanto as manifestações comportamentais quanto os mecanismos celulares envolvidos nos circuitos epileptogênicos, além das possíveis influências dos fármacos nos processos cognitivos.

1.1. EPILEPSIA

A epilepsia é um tipo de disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações subjetivas ou comportamentais súbitas (crises epiléticas), decorrente de uma atividade elétrica anormal, de início súbito, que acomete uma ou várias áreas do córtex cerebral, com tendência a se repetir ao longo da vida (Guerreiro et al., 1993; Da Costa et al., 1998; Meldrum et al., 1999).

A incidência de crises epiléticas é maior na infância e na adolescência, quando comparada com a que ocorre na vida adulta, sendo que a maioria das epilepsias inicia durante as fases iniciais do desenvolvimento (Da Costa et al., 1998).

O termo *Status Epilepticus* (SE) é definido como “crises epiléticas suficientemente prolongadas, ou repetidas em intervalos curtos, que resultam num estado epilético contínuo e duradouro” (Gastaut, 1973). Estima-se que entre 1 a 8% dos pacientes

epilépticos apresentaram em algum período da sua doença, pelo menos um episódio de SE. O SE está associado com risco significativo de déficit cognitivo (Akman et al., 2003).

Estudos recentes na área de imagens têm demonstrado que as crises epilépticas podem causar uma atrofia progressiva no hipocampo e córtex cerebral e conseqüente declínio cognitivo (Majak et al., 2004). Em modelos experimentais o déficit de memória aumenta progressivamente com a frequência de crises espontâneas recorrentes (Kotloski et al., 2002).

Apesar dos inúmeros trabalhos científicos dedicados à elucidação dos fenômenos envolvidos na epilepsia e dos importantes avanços na área da epileptologia obtidos nos últimos anos, aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia refratária aos atuais tratamentos medicamentosos (Rogawski et al., 1990). Desta forma, é essencial a compreensão dos mecanismos envolvidos na epileptogênese para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que possibilitem melhor qualidade de vida a estes pacientes.

1.1.1. EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é entre os tipos de epilepsia a mais comum, sendo responsável por aproximadamente 40% a 60% das epilepsias nos adultos. Devido sua alta prevalência e refratariedade ao tratamento medicamentoso é uma das síndromes neurológicas mais estudadas (Elger et al., 2004; Hendriks et al, 2004). As crises manifestam-se no lobo temporal, principalmente na amígdala, hipocampo e giro hipocampal.

Clinicamente a ELT manifesta-se por crises parciais simples com desconforto e calor epigástrico ascendente associado a distúrbios comportamentais como o medo.

Ocorrem igualmente crises parciais complexas, nas quais existe perda de consciência associada a automatismos orofaciais e gestuais, podendo seguir generalizações secundárias (Wieser, 2000). Estas manifestações clínicas são causadas pelo disparo intenso, sincronizado e rítmico de populações neuronais no sistema nervoso central (Mcnamara, 1994).

Estudos com ressonância magnética têm sido de grande relevância, pois permitem a associação entre a severidade do dano estrutural no hipocampo, amígdala e córtex entorrinal com a duração da epilepsia, frequência e tipo de crise (Pitkanen & Sutula, 2002).

Estima-se que a etiologia da ELT, em 60 a 65% dos casos, seja a Esclerose Mesial Temporal, também conhecida como Esclerose Hipocampal (EH) (Guerreiro 1993). A epilepsia com EH é geralmente acompanhada de déficit de memória devido principalmente ao comprometimento do hipocampo e estruturas adjacentes (Portuguez et al., 1998).

Os indivíduos portadores de EH têm história clínica característica, observando-se presença de crises convulsivas prolongadas na infância, frequentemente associadas com hipertermia. Os danos neuronais evidenciados no hipocampo parecem ser decorrentes de uma liberação excessiva de glutamato no decorrer dos episódios comiciais, que produz um excessivo influxo de cálcio nos neurônios pós-sinápticos (Wieser, 2000; Costa et al., 2004).

Sendo assim, a principal característica histopatológica da ELT é a EH, representada por um padrão seletivo de morte neuronal que ocorre no Giro Denteado (GD) e nos subcampos 1 e 3 do Corno de Amon (CA1 e CA3), acompanhada de gliose reativa, observada tanto em animais como em humanos. Outra característica patológica da EH envolve o surgimento de terminais axonais aberrantes ricos em zinco, revelado por autometalografia de Neo-Timm, no *stratum moleculare* interno do GD. Há fortes

evidências de que fibras musgosas aberrantes possam gerar sinapses excitatórias recorrentes, capazes de deflagrar crises epilépticas e/ou alterar o funcionamento do GD, por modificações morfológicas e bioquímicas (Covolam et al., 2000; Klitgaard et al., 2002; Meldrum et al., 2002).

Estudos experimentais demonstram que as crises recorrentes, tanto duradouras como esporádicas, podem causar morte neuronal, principalmente no hipocampo (Pitkanen & Sutula, 2002). Com apenas uma crise o dano é pequeno, porém, com o aumento da frequência das crises o dano neuronal aumenta significativamente, podendo contribuir para um declínio cognitivo (Pitkanen & Sutula, 2002).

Alterações na memória são comumente encontradas em pacientes com ELT, especialmente na memória verbal (no aprendizado e na consolidação desta informação), podendo apresentar déficit mais severo com a alta frequência de crises (Hendriks et al., 2004).

Inúmeros estudos sugerem que crises breves podem alterar a morfologia dos dendritos, sugerindo que este remodelamento sináptico induzido pelas crises e a plasticidade estrutural envolvem tanto os componentes pré como os pós-sinápticos do circuito neural (Pitkanen et al., 2002).

A proliferação glial é proeminente na EH, tanto em humanos como em modelos animais, podendo causar diversas alterações na recaptção de neurotransmissores, no pH extracelular e na regulação do potássio, com importantes conseqüências na suscetibilidade às crises (Pitkanen & Sutula, 2002).

A severidade e a natureza das desordens cerebrais são altamente dependentes da idade em que ocorrem, o que pode relacionar-se com os mecanismos de plasticidade

neurônais, presentes em cada etapa do desenvolvimento cerebral e, conseqüentemente, com alterações nos mecanismos da memória e aprendizado (Mikaki et al., 1994).

Estudos recentes demonstraram a relação de desordens cerebrais em ratos imaturos e suas conseqüências no comportamento, na memória e principalmente no desenvolvimento cerebral (Holmes et al., 1998), além do aumento da suscetibilidade à subseqüentes comprometimentos cerebrais (Schmid et al., 1999).

Embora o déficit cognitivo seja multifatorial, há algumas características clínicas da epilepsia que estão relacionadas diretamente com este comprometimento, como: o tipo de epilepsia, a localização do foco epileptogênico, a freqüência das crises e efeitos adversos da medicação (Hendriks et al., 2004; Elger et al., 2004).

Estudos em modelos experimentais de epilepsia com abordagens integradas a nível molecular, eletrofisiológico e cognitivo são necessários para a melhor compreensão das alterações estruturais e funcionais associadas a esta patologia.

Embora os efeitos adversos dos FAEs sejam menores, em relação aos da epilepsia, há interesse especial, por ser a principal modalidade terapêutica para o controle das crises. O risco de dano cognitivo com o uso de FAEs aumenta com a politerapia e as altas dosagens. Em geral, os efeitos cognitivos dos FAEs são modestos, quando utilizados em monoterapia e com o controle dos níveis séricos dentro de taxas terapêuticas (Loring et al., 2001).

Porém, algumas vezes estes danos cognitivos podem ser clinicamente significativos. Os efeitos cognitivos mais comuns são: lentificação psicomotora, redução da vigilância, alteração no humor e prejuízo da memória (Loring et al., 2001; Drane et al., 2002; Montamedi et al., 2004).

Há algumas evidências experimentais que FAEs podem apresentar um efeito adicional neuroprotetor, além dos efeitos adversos na cognição (Pitkanen, 2002; Elger et al., 2004).

O modelo da pilocarpina é amplamente utilizado para testar FAEs, tanto na fase aguda, latente ou crônica (Leite et al., 2002). Há vários estudos durante a fase latente, devido à possibilidade da influência dos fármacos nas alterações plásticas que podem estacionar ou suprimir o desenvolvimento da epilepsia. Já na fase crônica, o principal foco de interesse é a supressão das crises espontâneas recorrentes (Leite et al., 2002).

Apesar da introdução de novos FAEs para o tratamento do paciente epilético, alguns fármacos “clássicos”, permanecem amplamente utilizados, em especial, a Carbamazepina, Fenitoína, Fenobarbital e Valproato (Cukiert, 2002).

Dos FAEs, o Fenobarbital, ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico, foi introduzido em 1912 e substituindo o brometo, o único FAE disponível nesta época, por ser mais eficaz e menos tóxico. Entre suas principais características estão o baixo custo, a segurança e a longa experiência clínica, podendo ser utilizado com uma farmacocinética previsível por via oral, intravenosa ou intramuscular (Pellock, 2002). Apresenta grande espectro de indicações, entre as quais, destacam-se crises neonatais, convulsões febris, crises parciais com generalização secundária, estado de mal epilético e uso durante a gestação (Yacubian, 2001).

O Fenobarbital atua aumentando a inibição mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). Também aumenta o limiar e diminui as pós-descargas desencadeadas por estímulo elétrico, por meio do prolongamento da abertura dos canais de cloreto, aumentando dessa maneira as correntes pós-sinápticas de receptores medicados pelo cloreto (Cukiert, 2002; Pellock, 2002).

A Carbamazepina foi sintetizada em conexão com o antidepressivo imipramina e os estudos iniciais como fármaco antiepiléptico começaram no final da década de 50.

É provável que a ação antiepiléptica da Carbamazepina se relacione a sua capacidade de bloquear a liberação de neurotransmissores por meio do bloqueio dos potenciais de ação e pós-sinápticamente por meio do bloqueio das descargas repetitivas de alta frequência e possivelmente pelo bloqueio de correntes nos receptores NMDA (Yacubian, 2001).

A Carbamazepina é indicada para tratamento de crises parciais, crises tônico-clônicas generalizadas, mas é ineficaz para o tratamento de crises de ausências.

Enquanto, FAEs têm o potencial de reduzir as crises, podem também agravar alterações cognitivas e comportamentais. Portanto, para um adequado tratamento de epilepsia, deve haver um equilíbrio entre o controle das crises e o mínimo de efeitos cognitivos dos FAEs. Além disso, a utilização de monoterapia, o acompanhamento dos níveis séricos dos FAEs e a dosagem específica para cada paciente, podem diminuir o risco de alterações cognitivas e comportamentais.

Como os FAEs podem ser um fator que aumente os riscos à alterações cognitivas e comportamentais, há necessidade de estudos que correlacionem a ação dos FAE tradicionais, como fenobarbital e carbamazepina, com o aprendizado e memória espacial, assim como a potenciação de longa duração.

1.2. MODELO EXPERIMENTAL

Os modelos experimentais de epilepsia têm contribuído de forma significativa para o entendimento dos mecanismos básicos envolvidos na epileptogênese, bem como dos

processos dinâmicos relacionados com a hiperexcitabilidade e refratariedade (Majak et al., 2004).

Para o estudo da Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), um dos modelos que melhor mimetiza as alterações funcionais e morfológicas desta patologia é o modelo da injeção sistêmica de Pilocarpina (Turski et al., 1989), um agonista colinérgico muscarínico, derivado das plantas sul-americanas *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*, descrito primeiramente por Turski et al (1983).

Este modelo experimental apresenta três fases: primeiro uma fase aguda, imediatamente após a injeção, onde o animal fica em *status epilepticus* (permanece em crise por no mínimo 30 minutos); uma fase latente, após aproximadamente 15 dias, em que não há presença de crises e, uma fase crônica, quando haverá crises espontâneas recorrentes, de origem límbica com ou sem generalizações com uma frequência constante ao longo dos meses (Cavalheiro et al., 1991; Lemos et al., 1996; Priel et al., 1996; Leite et al., 2002).

O desenvolvimento de crises está diretamente relacionado com a duração do SE, sendo necessário no mínimo 1 hora de SE para que o animal possa desenvolver crises espontâneas recorrentes. Assim, a severidade das alterações neuropatológicas aumenta com a maior duração do SE (Lemos et al., 1995).

Os eventos que ocorrem após o SE não são restritos apenas ao período agudo, podem ocorrer diversas alterações a longo prazo, incluindo principalmente reorganização sináptica em regiões específicas do hipocampo com importantes conseqüências no circuito neural (Ben-Ari, 2001; Pitkanen et al., 2002). Além, da alteração sináptica também pode ocorrer: aumento na mobilização de glutamato, morte neuronal e gliose (Costa et al., 2004; Ben-Ari Y, 2001). Recentes estudos sugerem que as alterações na homeostase do

glutamato, principalmente na região do hipocampo, possam ter um papel crítico na indução e manutenção da epilepsia no modelo da pilocarpina (Costa et al., 2004).

Há várias evidências que indicam a ocorrência de uma reorganização sináptica em resposta à lesão na formação hipocampal, tanto em modelos experimentais quanto em pacientes com ELT (Lemos et al., 1995). Esta reorganização é amplamente estudada com o método de Neo-Timm, para a verificação de sua influência sobre os mecanismos de epileptogênese (Lemos et al., 1996).

O brotamento neuronal ou *sprouting* das fibras musgosas envolve a formação de novos contatos sinápticos assimétricos entre os terminais das fibras musgosas e os dendritos das células granulares e interneurônios inibitórios na camada molecular (Isokawa et al., 1993; Tauck et al., 1985).

Vários autores destacam o papel das fibras musgosas com importante contribuição para a hiperexcitabilidade e para as crises, tanto em modelos experimentais como em pacientes com ELT (Babb et al., 1991; Lemos et al., 1995; Williams et al., 2002). Porém, outros autores questionam a importância das fibras musgosas na epileptogênese, pois quando utilizada ciclohexamida, inibidor da síntese protéica, no modelo da pilocarpina, os animais não apresentaram *sprouting* das fibras musgosas, no entanto, apresentaram crises espontâneas recorrentes (Longo et al., 1997; Longo et al., 2002; Longo et al., 2003).

1.3. POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO

O estudo das bases neurofisiológicas e neuroquímicas do aprendizado e da memória é um dos mais fascinantes temas em neurociências. Esta busca incessante estimula cada vez

mais pesquisas para a melhor compreensão de todos os mecanismos envolvidos no processo de formação e armazenamento da memória.

“Memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações” (Izquierdo et al., 2002). As memórias não são adquiridas imediatamente na sua forma final, e durante os primeiros minutos ou horas são suscetíveis à interferência por outras memórias, drogas ou tratamentos (Izquierdo et al., 2002). Os mecanismos que subjazem os processos de memória são objeto de estudo de pesquisadores há muito tempo. Porém, os mecanismos neurais envolvidos na aquisição, armazenamento e evocação das memórias, ainda não estão completamente elucidados.

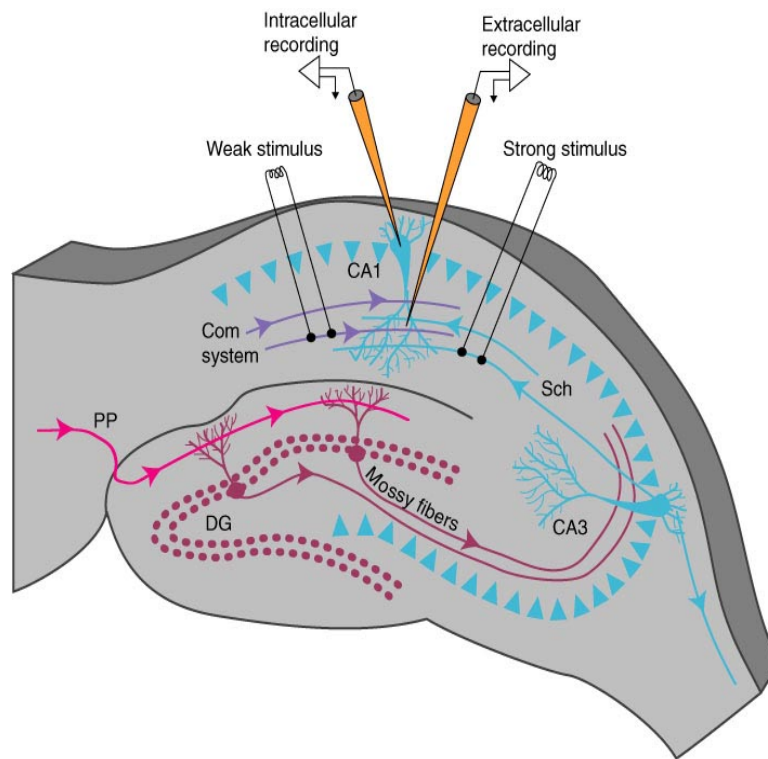
Memória e aprendizado resultam de alterações na representação neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre os neurônios (Dudai et al., 1989). Estes eventos plásticos podem incluir alterações na estrutura, na distribuição e número de sinapses e também alterações morfológicas (Rusakov et al., 1997; Woolf, 1998).

O hipocampo desempenha um papel fundamental na formação de memórias de curto e longo prazo (Izquierdo et al., 1998a), e diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com o hipocampo para regular a aquisição e o armazenamento de nova informação (Izquierdo et al., 1998b). Além disso, o hipocampo apresenta uma importante interação funcional com a amígdala basolateral na formação da memória emocional (McGaugh, 2002). Pouco se sabe, acerca do acoplamento funcional existente entre as áreas mencionadas e o hipocampo. A elucidação dessas interações teria óbvio benefício para o entendimento e o tratamento de diversas doenças do SNC.

O hipocampo tem um papel crucial no desempenho em testes espaciais e tem sido relacionado com a representação espacial (Nadel et al., 1999). Esta estrutura é particularmente plástica, podendo apresentar alterações morfológicas como sinaptogênese e

neurogênese no adulto (Ben-Arai et al., 1990; Derrick et al., 2000; Ramírez-Amaya et al., 2001).

Em 1973, Timothy Bliss e Terje Lømo estimularam uma via nervosa específica no hipocampo de coelhos, e fizeram uma notável descoberta. Um período breve de atividade elétrica de alta frequência (denominado tétano), aplicado a uma via hipocampal, produzia um aumento na efetividade sináptica, que durava por horas em um animal anestesiado e podia, quando repetida, durar dias ou mesmo semanas em um animal alerta e livre para mover-se. Esse tipo de facilitação é agora denominado facilitação de longa duração ou potenciação de longa duração (LTP, do inglês *Long Term Potentiation*) (Bliss et al., 1973; Squire et al., 2003) (Figura 1).



Copyright © 2002, Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Figura 1: Posicionamento dos eletrodos (registro e estímulo) para a indução da LTP (Adaptado de Zigmond et al., 2000).

Quase uma década após, Massao Ito e cols. (1982), estudando a plasticidade sináptica cerebelar, aplicaram breves estímulos elétricos nas fibras paralelas e nas fibras trepadeiras, ambas aferências das células de Purkinje. Após sucessivos estímulos condicionantes, observaram que a subsequente ativação exclusiva das fibras paralelas resultava numa resposta pós-sináptica menor na célula de Purkinje, fenômeno este que poderia durar pelo menos uma hora e ao qual denominaram depressão de longa duração (LTD – *Long Term Depression*).

Tais fenômenos envolvidos na eficiência da transmissão sináptica têm sido objetos de intensa investigação nos últimos anos, em função de se acreditar que sejam as chaves para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares, através dos quais as memórias são formadas e armazenadas (Bianchin et al., 1999; Teyler et al., 1984; Artola et al., 1987; Ito et al., 1989; Kuba & Kumamoto, 1990; Bear et al., 1994; Medina et al., 1995).

Inúmeros trabalhos eletrofisiológicos, farmacológicos e comportamentais sugerem que a LTP no hipocampo e talvez em outras regiões do encéfalo (amígdala e córtex cerebral) possam contribuir para certas formas de aprendizado e memória em mamíferos (Baudry et al., 1992; Bliss et al., 1993; Izquierdo, 1993; Izquierdo et al., 1995).

A LTP apresenta diversas características que a tornam uma candidata apropriada para ser um importante mecanismo do armazenamento de longa duração (Medina et al., 1995). Primeiro, ocorre em cada uma das três vias principais mediante as quais a informação flui no hipocampo: a via perforante, a via das fibras musgosas e a vias das colaterais de Schaffer. Segundo, é induzida rapidamente: uma única série de estímulos elétricos de alta frequência pode dobrar a efetividade de uma conexão sináptica. Terceiro, uma vez induzida, é estável por uma ou mais horas ou mesmo, por dias, dependendo do número de vezes que o tétano é repetido. (Squire et al., 2003).

A LTP e talvez a LTD são excelentes modelos eletrofisiológicos para o estudo de mecanismos envolvidos com a memória, facilitando a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos. Os mecanismos moleculares da LTP na região de CA1 do hipocampo são muito similares àqueles envolvidos no processamento de memórias aversivas. (Izquierdo et al., 2002; Bliss et al., 1993).

Alterações plásticas na morfologia e ou no número de espinhas dendríticas podem também contribuir para alterações na eficácia sináptica, podendo ser visualizado através da microscopia eletrônica. (Bliss et al., 1993; Marrone et al., 2002;).

O conceito de modulação do armazenamento de memória tem sido significativamente influenciado por diversos estudos, sendo reforçada a evidencia de que dois fatores são críticos para os efeitos da emoção na memória, a ativação β -adrenérgica (central e/ou periféricamente) e o complexo amigdalóide. Contudo, esta evidência também sugere que interações complexas permitem que vários hormônios e sistemas cerebrais regulem o armazenamento de memória de longa duração. (Cahill et al., 1996).

Estudos sugerem o envolvimento da amígdala na modulação do processo de armazenamento de memória de longa duração, porém não está envolvida na memória de trabalho e de curta duração. (Malenka et al., 1999).

A plasticidade neural parece ter uma importância fundamental para o estabelecimento de memórias permanentes. Porém, ainda há necessidade de inúmeros estudos sobre os processos celulares e moleculares, que estão envolvidos no armazenamento, consolidação e evocação de memórias.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da epilepsia e de fármacos antiepilépticos sobre a memória espacial e a indução de potenciação de longa duração (LTP) na região CA1 hipocampal, em ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Verificar as possíveis repercussões de diferentes tempos de *status epilepticus* na tarefa comportamental do labirinto aquático de Morris (LAM).

2.2.2. Analisar o efeito do tratamento crônico com FAEs em dose terapêutica (DE₅₀), em ratos normais e epiléticos, sobre o desempenho na tarefa do LAM.

2.2.3. Analisar o efeito do tratamento crônico com elevadas doses de FAEs, em ratos epiléticos sobre o desempenho na tarefa do LAM.

2.2.4. Avaliar os possíveis efeitos de diferentes tempos de *status epilepticus* sobre os mecanismos de potenciação de longa duração (LTP).

2.2.5. Avaliar a influência do tratamento crônico com FAEs (DE_{50}), em fatias hipocâmpais de ratos normais e epiléticos sobre os mecanismos da LTP.

2.2.6. Avaliar o efeito do tratamento crônico com elevadas doses de FAEs, em fatias hipocâmpais de ratos epiléticos sobre a indução da LTP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 106 ratos wistar machos de 30 dias de idade, pesando entre 90 e 120g. Os animais foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS e permaneceram até o momento de sua utilização alojados no Biotério do Instituto de pesquisas Biomédicas da PUCRS, sob ciclo claro e escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*.

3.2.DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos ao modelo da pilocarpina e permaneceram em diferentes tempos de *status epilepticus* (SE), o grupo Pilocarpina A permaneceu 15 minutos e o grupo Pilocarpina B, 90 minutos. Após 24 horas, tanto os animais epiléticos que permaneceram 90 minutos em SE quanto os normais receberam tratamento crônico com carbamazepina (CBZ) ou fenobarbital (FNB) durante 45 dias. O déficit cognitivo foi avaliado no labirinto aquático de Morris (LAM) entre o 34º e 39º dia após a injeção da pilocarpina, e posteriormente, estes animais foram sacrificados para o registro eletrofisiológico *in vitro* (Figura 2).

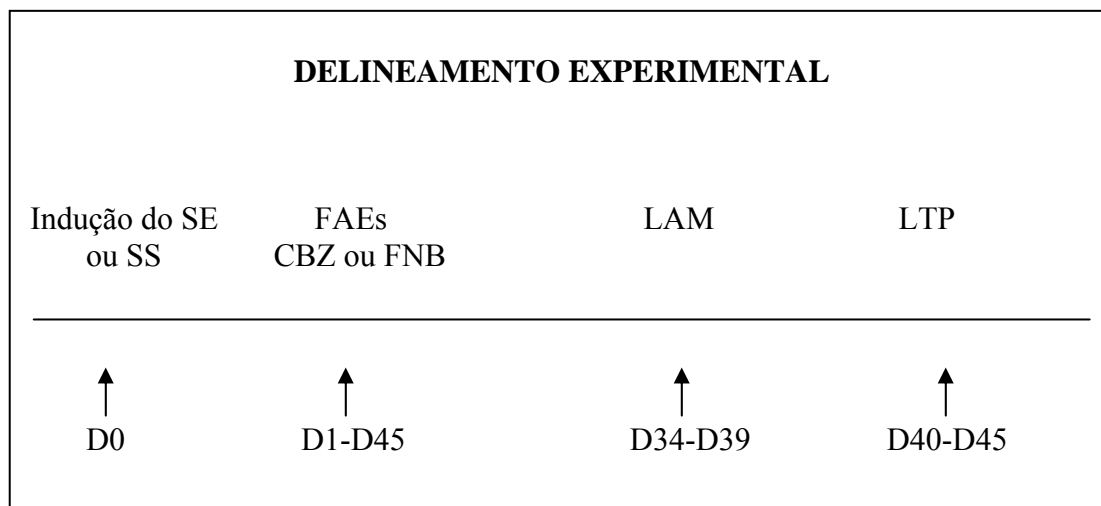


Figura 2: Delineamento experimental. SE: *Status Epilepticus*, SS: Solução Salina, FAEs: Fármacos Antiepilépticos, CBZ: Carbamazepina, FNB: Fenobarbital, LAM: Labirinto Aquático de Morris, LTP: Potenciação de Longa Duração.

3.3. MODELO EXPERIMENTAL

Foi utilizado o protocolo de indução de epilepsia pelo modelo experimental de pilocarpina (PILO), um agonista muscarínico (Cavalheiro 1991).

Previamente à aplicação intraperitoneal (i.p.) de PILO na dose de 250mg/kg, os animais receberam uma injeção i.p. de metilescopolamina (antagonista colinérgico), na dose de 1mg/kg, com o objetivo de minimizar os efeitos colinérgicos periféricos. Após, os animais foram colocados em caixas de acrílico transparentes, para a observação das manifestações comportamentais produzidas pela droga. Poucos minutos após a injeção da PILO, os animais apresentaram comportamentos estereotipados, como movimentos mastigatórios, hipocinesia, salivação e clonias. Estas observações foram acompanhadas por

observadores experientes e classificadas de acordo com a Escala de Racine (Racine, 1972), sendo aceito apenas animais que atingiram o grau 5 nesta escala (Figura 3).

A Escala de Racine foi determinada conforme as alterações comportamentais que os animais apresentaram logo após a administração da PILO. Sendo considerado: Grau 0: imobilidade; Grau 1: automatismos faciais; Grau 2: mioclonias de cabeça e pescoço; Grau 3: clonias de patas anteriores; Grau 4: clonias de patas posteriores; Grau 5: elevação e queda.



Figura 3: Demonstração de animal em SE (grau de Racine 5)

Os animais foram divididos em 2 grupos conforme o tempo de SE: o grupo Pilocarpina A permaneceu 15 minutos, e o Pilocarpina B, 90 minutos. Após, receberam injeção i.p. de diazepam (4mg/kg), para minimizar as manifestações comportamentais. Foram recolocados em gaiolas e receberam cuidados especiais nos dois dias seguintes, com

oferecimento de água via oral e reposição de potássio pela alimentação acrescida de banana.

Após 24 horas da injeção de pilocarpina, os animais que permaneceram 90 minutos em SE e os normais receberam tratamento crônico com FAEs (CBZ ou FNB) nos 45 dias seguintes.

Decorrido esta fase aguda o animal passa por um período chamado período latente, o qual dura de 10 a 15 dias em que o animal não apresenta crises recorrentes. Transcorrido este período, inicia-se o período crônico, em que ocorre o aparecimento das crises espontâneas recorrentes. Para os animais dos grupos controle, foi seguido o mesmo protocolo, porém, receberam injeção i.p. de solução salina (Figura 4).

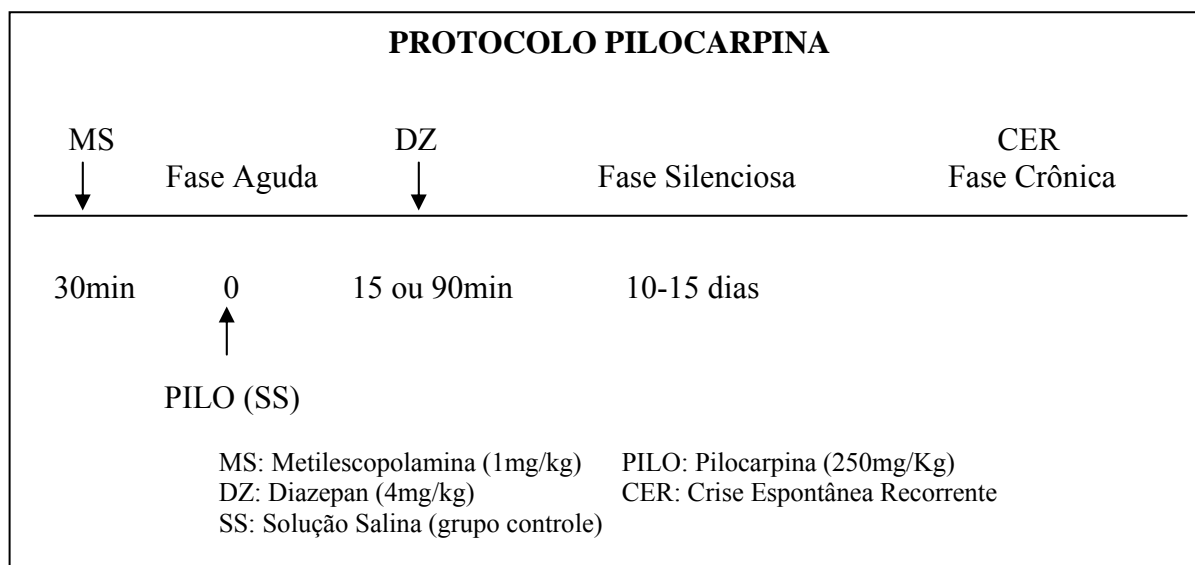


Figura 4: Protocolo da Pilocarpina

3.4. TRATAMENTO CRÔNICO COM FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS

Decorrido 24 horas, após a injeção de PILO (SE=90minutos) ou solução salina, os animais iniciaram tratamento crônico com fármaco antiepiléptico (FAE) durante os 45 dias. Os FAEs escolhidos, a carbamazepina (CBZ) e o fenobarbital (FNB), amplamente utilizados no tratamento clínico das epilepsias, foram administrados intraperitonealmente em doses terapêutica e elevada (60 e 150mg/kg e 35 e 100mg/kg respectivamente) (Farghal-Hassan et al., 1976; Craig et al., 1971). Define-se como dose terapêutica ou eficaz DE_{50} , a dose em que 50% da população desenvolve o efeito esperado, sem apresentar os efeitos adversos comuns ao fármaco (Levy et al., 1995).

A CBZ (Sigma) foi diluída em solução aquosa Tween 80 a 3% em solução salina na concentração final de 30mg/ml, e o FNB (Cristália: Fenocris®) em solução salina na concentração final de 20mg/ml. Para descartar qualquer possível efeito próprio do solvente da CBZ, um grupo adicional de controle recebeu Tween 80 (a 3% de solução salina), seguindo o mesmo protocolo de tratamento crônico da CBZ (i.p., duas vezes ao dia).

3.5. TREINAMENTO NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Os labirintos são amplamente utilizados em estudos de aprendizagem em animais. Dentre os diversos procedimentos desenvolvidos para avaliar o desempenho cognitivo de animais, os testes de aprendizagem espacial têm se destacado, ajudando a compreender os mecanismos envolvidos na neurobiologia da memória.

O Labirinto Aquático de Morris é um teste que oferece vantagens em relação a outros, pois não é necessário privação ou recompensa com alimentos para a motivação dos animais durante o procedimento de aprendizado espacial (Morris et al., 1982; Morris et al., 1984).

Consiste de um tanque com 1,80m de diâmetro e 0,60m de altura, preenchido com 25cm de água à temperatura de 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). A sala apresenta iluminação indireta sobre o tanque e pistas distais nas paredes. Quatro pontos no perímetro do tanque (norte, leste, sul e oeste) dividiam o tanque em quatro quadrantes, e uma plataforma de acrílico transparente, com altura de 24cm e diâmetro de 9cm, encontrava-se submersa aproximadamente 1cm na água, localizava-se sempre no centro do quadrante 3.

O treinamento dos animais no LAM iniciava-se no 34º dia após a injeção da pilocarpina. Um dia antes do início do treinamento, os animais eram colocados no tanque durante 60 segundos sem a presença da plataforma, apenas para a habituação. O treinamento consistia de 24 treinos (6 treinos de 60 seg/dia durante 4 dias).

A posição da plataforma permanecia a mesma, porém, o ponto de “largada” do animal variava a cada treino. A latência desde a “largada” no tanque até que o animal localize e suba na plataforma era registrada para posterior análise. No último dia os animais eram submetidos a uma prova, sendo colocados no tanque sem a plataforma durante 60 segundos, quando era avaliado o tempo dispendido no quadrante em que, antes, estava a plataforma.

3.6. ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

Entre o 40° e 45° dia após a injeção da PILO, os animais foram anestesiados com Tiopental (40mg/kg i.p.), e decapitados para a abertura do crânio e retirada do encéfalo. Posteriormente, o encéfalo foi colocado submerso em Líquido Cefalorraquidiano Artificial (LCRa) do tipo dissecação, com oxigenação e a uma temperatura de 4°C. O LCRa é composto por: NaCl: 130mM; KCl: 3.5mM; NaH₂PO₄: 1.3mM; MgSO₄: 5mM; CaCl₂: 0.2mM; NaHCO₃: 24mM; D- Glicose: 10mM, com o pH de 7.4.

Foram realizados cortes axiais de 400µm com auxílio de um vibrátomo (Vibroslice modelo 1752 M – *Campden Instrumensts*, EUA). As fatias permaneceram em descanso por 1 hora antes do registro eletrofisiológico, no LCRa do tipo normal, composto por: NaCl: 130mM; KCl: 3.5mM; NaH₂PO₄: 1.3mM; MgSO₄: 2mM; CaCl₂: 2mM; NaHCO₃: 27mM; D- Glicose: 10mM, com o pH de 7.4. Posteriormente, foram levadas à cuba de registro eletrofisiológico, sob oxigenação e temperatura controlada (34°C) (Salamoni et al., 2005) (Figura 5).

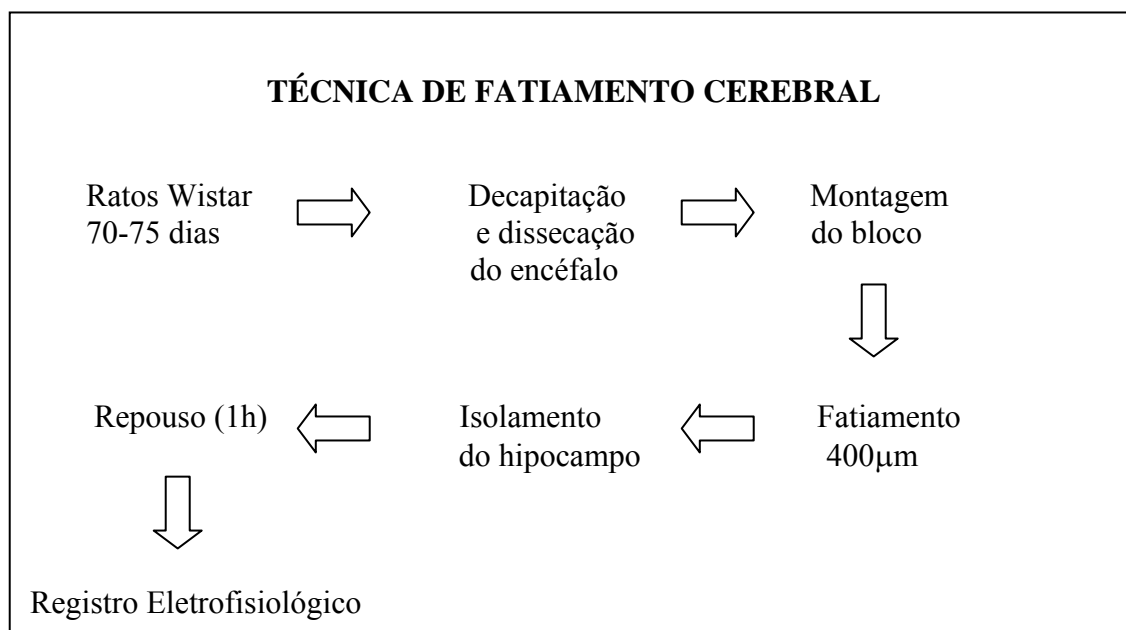


Figura 5: Protocolo de Fatiamento Cerebral

Para a realização do estudo eletrofisiológico utilizou-se: câmara de perfusão e registro, onde era posicionada a fatia; micromanipuladores do tipo manual e motorizado MP285 (*Sutter Instrument Company*) para o adequado posicionamento dos eletrodos de registro e de estímulo; um gerador de pulso programável Master 8 (*A.M.P. Instruments Ltd.*, EUA); pré-amplificador diferencial (*Headstage, Axon Instruments Inc.*, EUA); condicionador de sinais CyberAmp 320 (*Axon Instruments Inc.*, EUA); fixador de corrente AxonClamp 2B (*Axon Instruments Inc.*, EUA); conversor analógico digital Digidata 1322A (*Axon Instruments*); computador com o Software AxoScope9 para o registro do sinal obtido; Software *Clampfit 9* para a análise da resposta e o Software *Origin* versão 5.0 (*Microcal Software*, EUA) para a análise estatística dos dados e construção dos gráficos (Figura 6 e 7).

Para a adequada visualização da fatia hipocampal e suas regiões utilizou-se sobre a cuba um microscópio de mesa (UM m 19 D.F. Vasconcellos). E com o objetivo de impedir a ocorrência de ruídos eletromagnéticos de 60Hz, foi realizado o isolamento com a gaiola de Faraday, bem como, a utilização de uma mesa com sistema antivibracional para evitar a trepidação durante o registro.

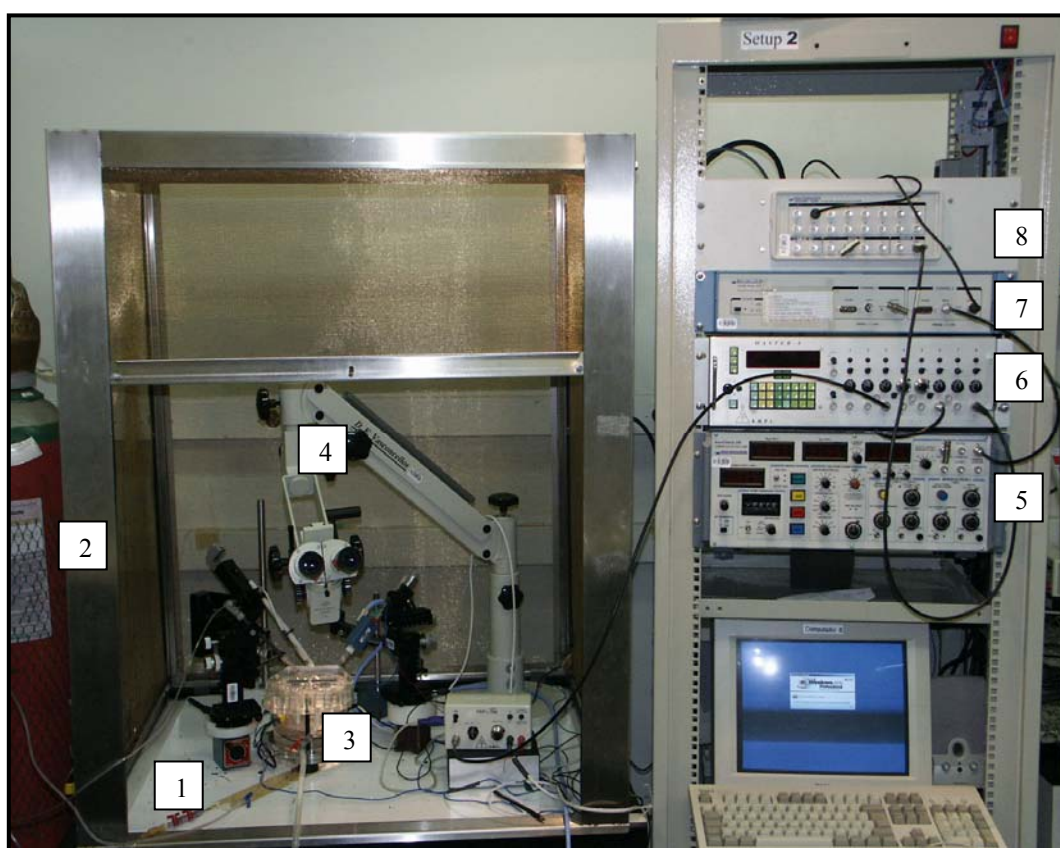


Figura 6: Equipamentos para o registro eletrofisiológico: (1) mesa antivibracional, (2) gaiola de Faraday, (3) câmara de registro, (4) microscópio de mesa, (5) amplificador Axoclamp 2B, (6) Master 8, (7) CyberAmp 320, (8) Digidata 1322 A

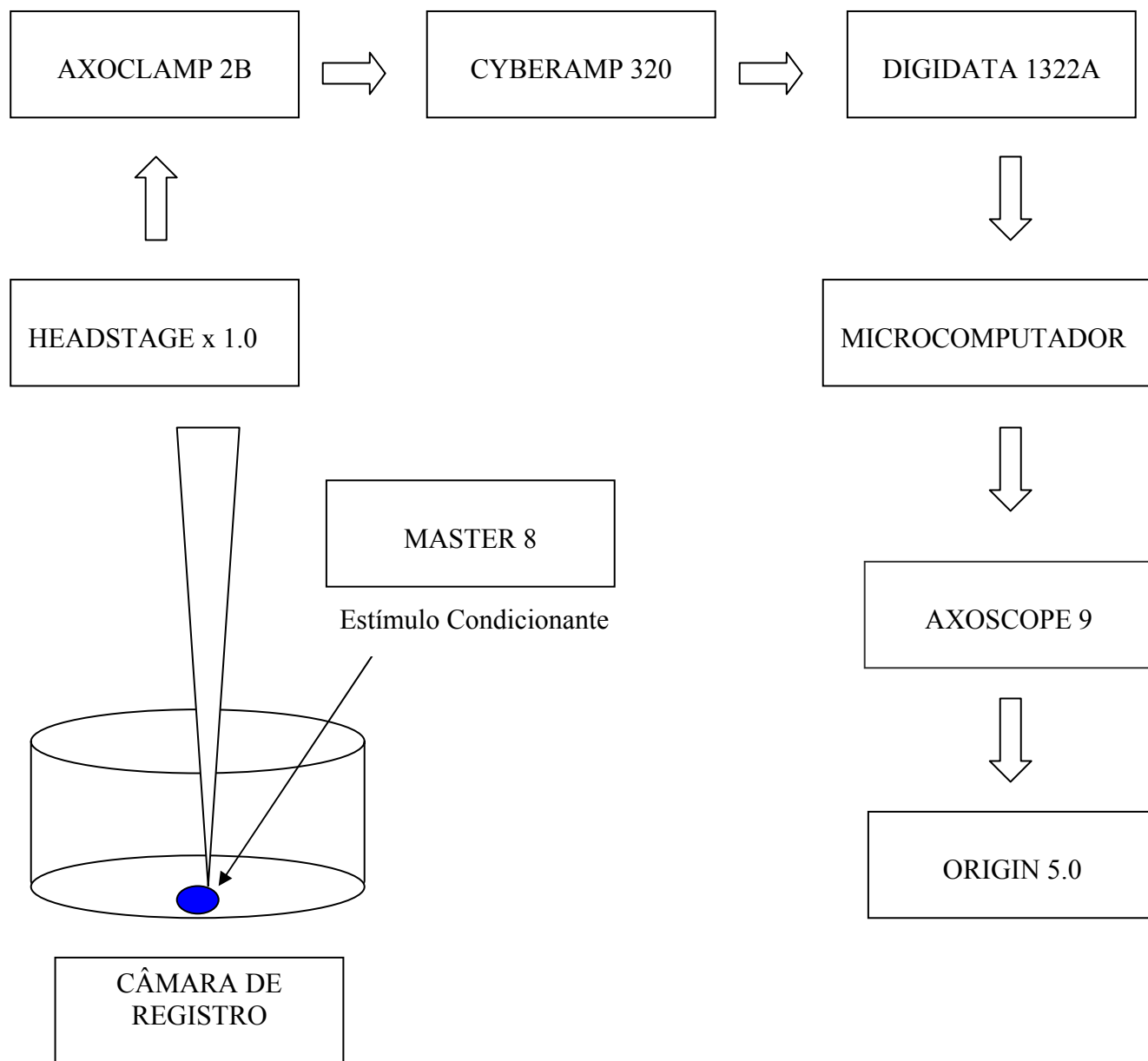


Figura 7: Equipamentos utilizados para a obtenção do registro eletrofisiológico dos PEPSC e indução da LTP em ordem de utilização. Sobre a fatia hipocampal (em azul), são dados estímulos elétricos a partir de um gerador de pulso programável (Master 8). O sinal obtido pela micropipeta, na câmara de registro, é amplificado pelo pré-amplificador diferencial Headstage, com ganho unitário, sendo a corrente fixada pelo Axoclamp 2B. Através do CyberAmp 320, os sinais são condicionados para serem convertidos do sistema analógico para o sistema digital pelo Digidata 1322A. A partir daí, estes são identificados pelo microcomputador e apresentados e mensurados através do software Axoscope 9. Para a construção dos gráficos referentes ao tempo total de registro utilizamos o software Origin 5.0.

Para a realização do protocolo de indução de LTP, o eletrodo de estímulo, um microeletrodo bipolar de platina-irídio (diâmetro interno de $75\mu\text{m}$ e externo de $140\mu\text{m}$) foi posicionado na colateral de Schaffer. A micropipeta de registro posicionada na região do *stratum radiatum* de CA1 do hipocampo foi confeccionada com a utilização do estirador de micropipetas MP-87 (*Sutter Instruments Company*), a partir de um capilar de boro-silicato com diâmetro externo de 1.5mm e interno de 1.12mm e posteriormente preenchida com LCR normal (Figura 8 e 9). A resistência das micropipetas situa-se entre 0.1 e $10\text{M}\Omega$.

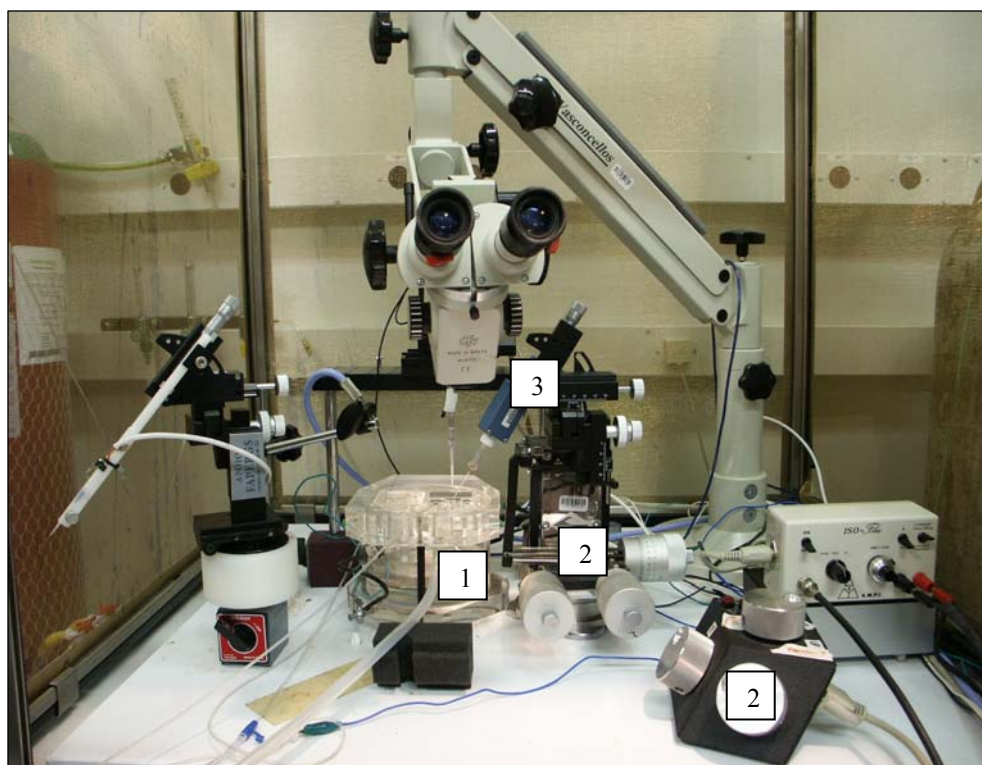


Figura 8: Câmara de registro e micromanipuladores: (1) câmara de registro eletrofisiológico, (2) micromanipuladores, (3) circuito microamplificador (*headstage*).

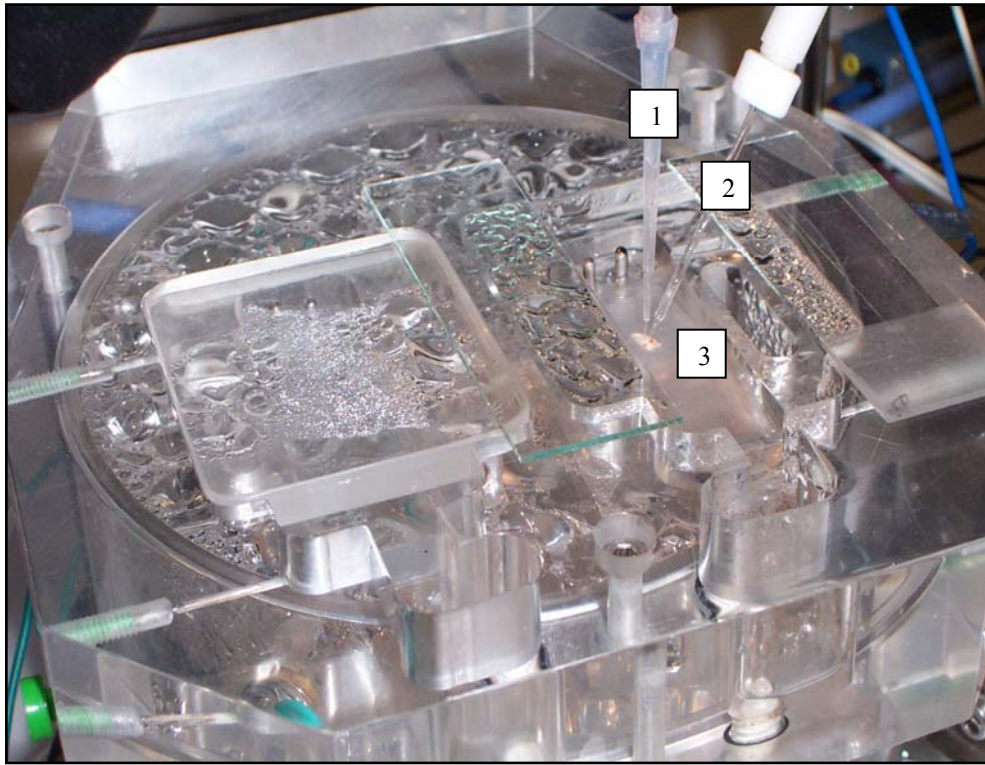


Figura 9: Câmara de registro eletrofisiológico: (1) eletrodo de estímulo, (2) eletrodo de registro e (3) fatia hipocampal de rato.

Após o adequado posicionamento dos microeletrodos, foi produzida uma curva de amplitude de resposta pós-sináptica evocada (mV), em função da intensidade de estímulo (μA), a qual denominamos Curva I/O. De acordo com a resposta máxima obtida, foi determinado o estímulo de base (50 a 60% da amplitude máxima). Após o término do registro, repetia-se a curva para verificar a viabilidade da resposta (Dalbem et al., 2005) (Figura 10).

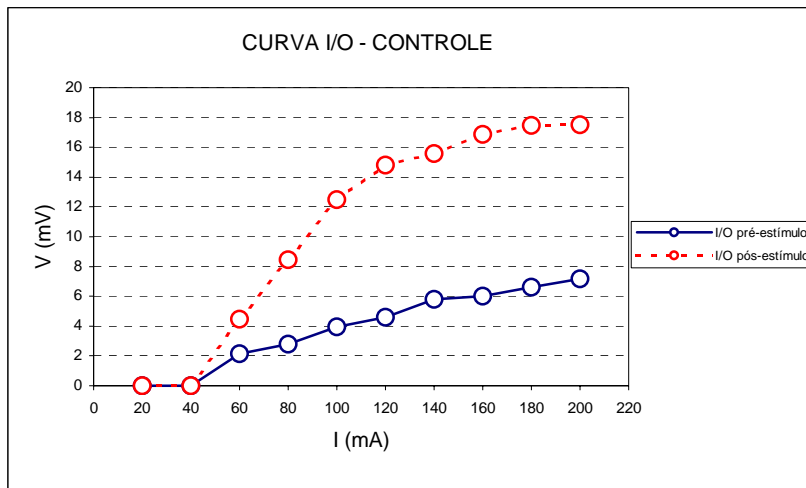


Figura 10: Curva I/O representativa (pré e pós-estímulo de alta frequência)

O estímulo de base foi aplicado durante 20 minutos, com 0,2 msec de duração cada pulso, a cada 20 seg. Após este período foi aplicado o seguinte estímulo condicionante de alta frequência (HFS): 4 trens de estímulo com 1 seg de duração cada, 100 Hz de frequência, em intervalos de 10 seg (Dalbem et al., 2005; Frison et al., 2005; Alvares et al., 2005). Posteriormente, retornava-se ao protocolo de estímulo de base, o qual permanecia por pelo menos 60 minutos (Figura 11).

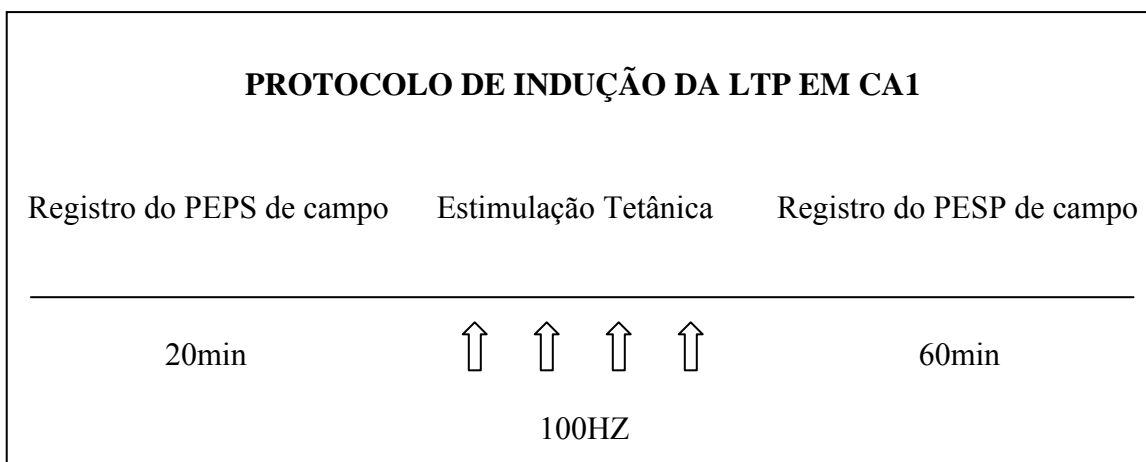


Figura 11: Protocolo utilizado para a indução da LTP

Considerou-se LTP a situação em que a resposta aumentava 40% no 45º minuto (comparada aos 10 minutos anteriores ao estímulo de alta frequência), e LTD, quando a resposta decrescia 40%. Quando, após o estímulo condicionante, a média percentual das amplitudes dos PEPS medidos nos 45ºminuto não apresentava variação de 40%, a situação era denominada de Não-indução (NI).

Foi realizada a análise das seguintes medidas referentes aos PEPS: amplitude do EPSP e o *slope* (inclinação da resposta obtida) pelo Software *Clampfit 9*.

Define-se como amplitude do PEPS a distância vertical, em milivolts (mV), existente entre a linha de base da resposta previamente ao estímulo e o pico mais negativo após o estímulo). *Slope* do PEPS foi definido como a inclinação máxima entre a linha de base e o pico mais negativo da resposta (Figura 12) (Sarihi et al., 2002). Para a obtenção dos *slopes* aplicou-se a seguinte fórmula: $Y2-Y1/X2-X1$.

Considerou-se $Y2-Y1$ como a variação entre as amplitudes (inicial e final) de um mesmo PEPS, em mV, e $X2-X1$, o curso de tempo em milissegundos (ms) entre o início e o final da inclinação máxima do PEPS. Para que a medida do *slope* fosse o mais precisa possível também contou-se com o auxílio dos softwares Axoscope 9 e Clampfit 9.

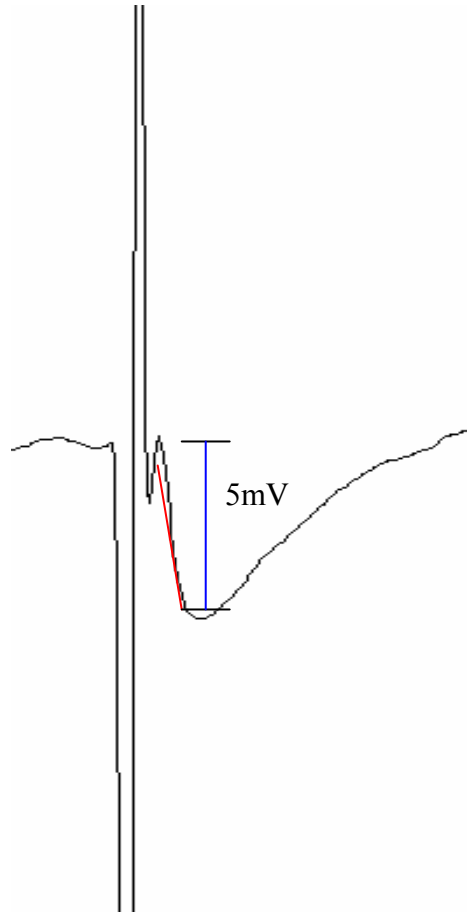


Figura 12: Exemplo da aferição da amplitude (em azul) e do *slope* do PEPSC (em vermelho). O resultado final da medida do *slope* é dado pela aplicação da fórmula acima descrita. Amplitude de 5mV.

Para todos os registros deste estudo, a totalidade dos dados quantitativos referentes à expressão da LTP após o estímulo de alta frequência, foi representada nos gráficos como porcentagem do controle, sendo este determinado como média das respostas registradas durante o período estável (10 minutos), previamente ao estímulo (Figura 13). Define-se como período estável, quando a amplitude do PEPS permanece constante ao longo do tempo.

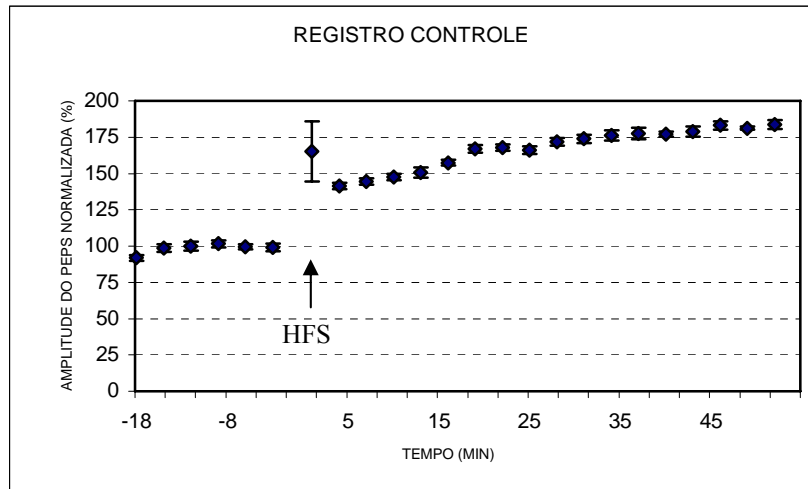


Figura 13: Demonstração de um período estável (pré-estímulo de alta frequência) de um registro eletrofisiológico. A seta indica o local de aplicação do estímulo de alta frequência e a barra representa o período estável (a amplitude do PEPSC permanece constante).

4. ANÁLISE DOS DADOS

4.1. REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO

O critério de indução da LTP era atingido quando a resposta aumentava, no mínimo, 40%, no 45° minuto pós-estímulo em relação à média dos 10 minutos de base (pré-estímulo). Considerando-se que a média pré-estímulo é definida como o PEPS-controle (100%), os valores foram expressos em percentagem. Assim, foi considerada-se LTP quando o valor era maior que 140%, e LTD, quando o valor era inferior a 60% no 45° minuto pós-estímulo.

Para a análise dos dados eletrofisiológicos foram utilizados os seguintes programas: Axoscope 9, Clampfit 9, Origin 5.0 (*Microcal Software*, EUA) e para a análise estatística, o Qui-quadrado e o Teste t, com $p < 0.05$.

4.2. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Para a análise do desempenho dos animais no LAM foi empregada a análise de variância (ANOVA) de duas vias ordenadas, seguida pelo teste de Bonferroni com $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. MEMÓRIA ESPACIAL

5.1.1. Efeito do tempo de SE sobre o desempenho na tarefa do LAM

Na tarefa do LAM duas variáveis foram estudadas: a latência durante o treino e o tempo que o animal permaneceu no quadrante-alvo no dia da prova. Para a análise do desempenho dos animais foi empregada a análise de variância (ANOVA) de duas vias ordenadas, seguida pelo teste de Bonferroni com $p < 0.05$.

Com o treinamento dos animais no LAM não encontramos diferença significativa entre o grupo controle e o Pilocarpina A (SE=15minutos), em nenhum dos dias de treinamento. Porém, quando comparamos controle e Pilocarpina B (SE=90minutos) encontramos diferença significativa entre o 2º, 3º e 4º dia de treinamento (respectivamente, $p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, por ANOVA seguido de Bonferroni) (Figura 14).

Também encontramos diferença significativa entre o desempenho dos animais dos grupos Pilocarpina A e Pilocarpina B em todos os dias do treinamento (respectivamente, $p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, por ANOVA seguido de Bonferroni).

Na análise do tempo de permanência do animal no quadrante-alvo, encontramos uma tendência entre o grupo controle e o Pilocarpina A ($p = 0,053$), e diferença significativa entre os grupos controle e Pilocarpina B ($p = 0,001$) e os grupos Pilocarpina A e Pilocarpina B ($p = 0,001$) (Figura 15).

Assim, verificamos que o tempo de SE influencia de maneira significativa o desempenho no LAM nas duas variáveis analisadas.

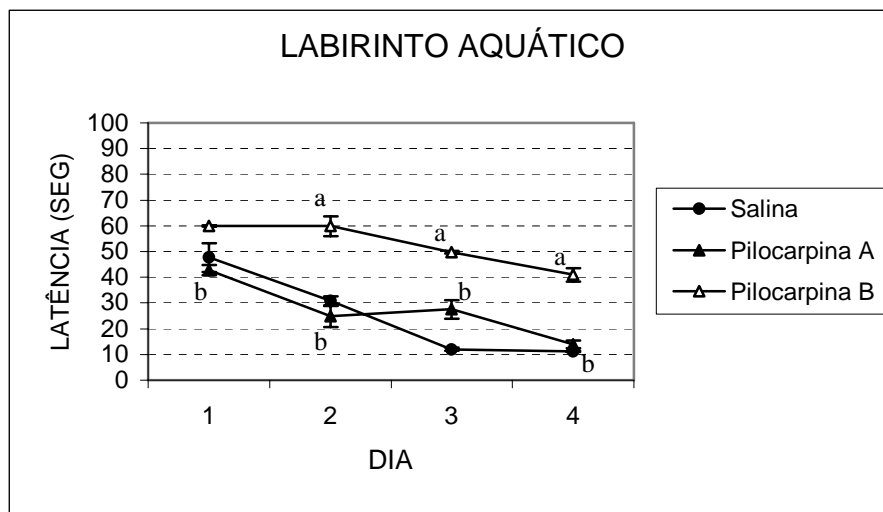


Figura 14: Médias das latências de chegada à plataforma nas sessões de treino no LAM em ratos submetidos a diferentes tempos de SE. Salina (n=5), Pilocarpina A (n=15) e Pilocarpina B (n=4). (a) Diferença significativa entre Pilocarpina B e controle ($p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,001$) e (b) Diferença significativa entre Pilocarpina B e Pilocarpina A ($p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) (ANOVA seguido de Bonferroni).

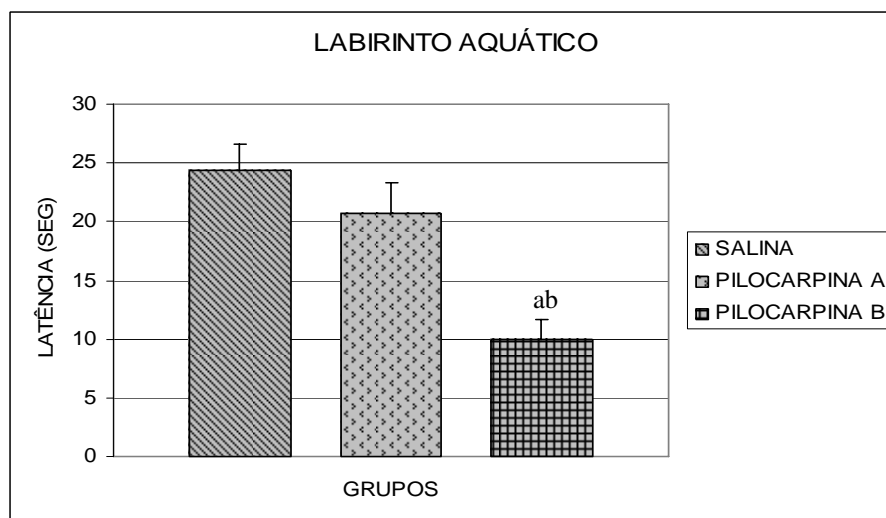


Figura 15: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos submetidos a diferentes tempos de SE. Salina (n=5), Pilocarpina A (n=15) e Pilocarpina B (n=4). (a) Diferença significativa entre o Pilocarpina B e controle ($p = 0,001$) e (b) Diferença significativa entre Pilocarpina B e Pilocarpina A ($p = 0,001$).

5.1.2. Efeito do Tratamento Crônico com FAE (DE₅₀) em ratos sobre o desempenho na tarefa do LAM

Na análise do desempenho dos animais foram analisadas duas variáveis: latência durante o treino e tempo dispendido no quadrante-alvo, utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias ordenadas, seguida pelo teste de Bonferroni com $p < 0.05$.

Com o treinamento no LAM de ratos normais tratados cronicamente com FAEs (DE₅₀), durante 45 dias, não encontramos diferença significativa entre os grupos em nenhum dos dias de treinamento ($p > 0,05$ por ANOVA seguido de Bonferroni) (Figura 16).

Quanto a influência de FAEs no tempo de permanência dos animais no quadrante alvo, encontramos diferença significativa apenas entre o controle e o grupo SAT ($p = 0,019$) (Figura 17).

O tratamento crônico com CBZ ou FNB em DE₅₀ não influencia o desempenho no LAM, porém o grupo SAT (Tween 80 a 3% em solução salina) apresentou diminuição significativa no tempo dispendido no quadrante-alvo no dia da prova, quando comparado com o grupo controle.

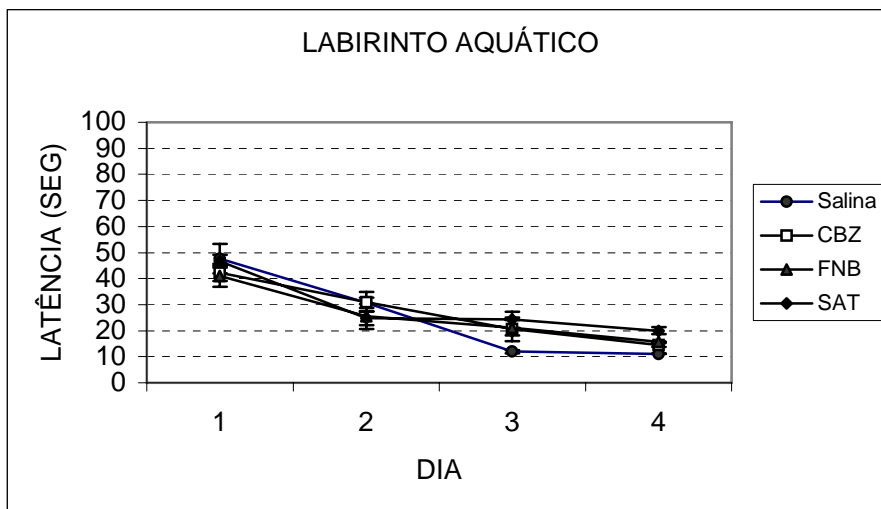


Figura 16: Médias das latências de chegada à plataforma nas sessões de treino no LAM de ratos normais tratados cronicamente com FAEs (DE_{50}). Salina (n=5), CBZ (n=21), FNB (n=20) e SAT (n=21) (ANOVA seguido de Bonferroni).

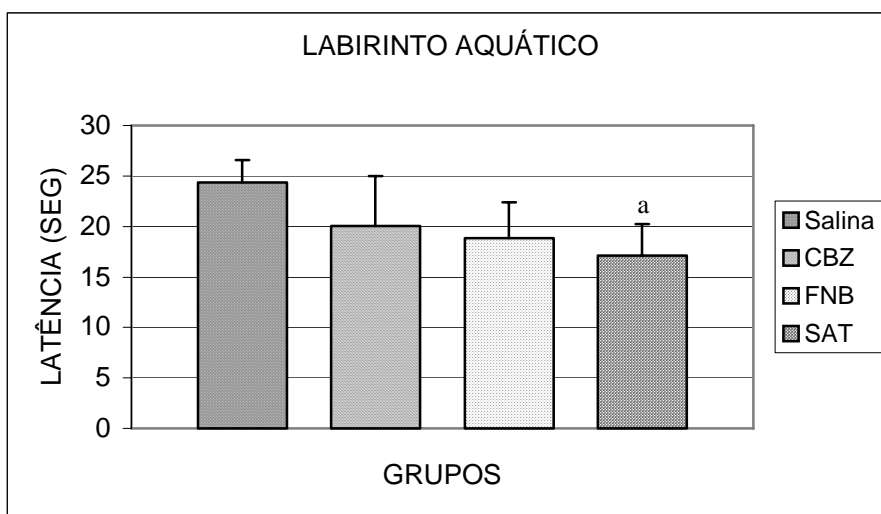


Figura 17: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos normais tratados cronicamente com FAE (DE_{50}). Salina (n=5), CBZ (n=21), FNB (n=20) e SAT (n=21). (a) Diferença significativa entre o controle e o grupo SAT ($p=0,01$).

5.1.3. Efeito do Tratamento Crônico com FAEs (DE₅₀) em ratos epiléticos sobre o desempenho no LAM

Utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias ordenadas, seguida pelo teste de Bonferroni com $p < 0.05$, analisamos as seguintes variáveis: latência durante o treino e o tempo que o animal permaneceu no quadrante-alvo no dia da prova.

Observamos que o desempenho no LAM de ratos epiléticos tratados cronicamente com FAEs (DE₅₀) apresentou diferenças significativas quando comparamos com o controle. Entre os grupos controle e Pilocarpina+CBZ houve diferença no 3º e 4º dia (respectivamente: $p < 0,01$ e $p < 0,001$), e entre o controle e Pilocarpina+FNB no dia 3º e 4º dia de treinamento ($p < 0,01$) (ANOVA seguido de Bonferroni) (Figura 18). Quando comparamos o desempenho dos ratos epiléticos que receberam apenas solução salina (Pilocarpina B, SE=90 minutos) com o dos ratos epiléticos que receberam tratamento crônico com FAEs, não verificamos diferença.

Na análise do tempo de permanência no quadrante-alvo, houve diferença significativa com os grupos de ratos epiléticos, quanto comparamos com o controle ($p < 0,001$). Não verificamos diferença significativa entre os ratos epiléticos tratados com FAEs e aqueles que receberam solução salina (Pilocarpina B, SE=90 minutos), porém, encontramos uma tendência entre os grupos: Pilocarpina+CBZ e Pilocarpina+FNB ($p = 0,057$) (Figura 19).

Constatamos que o tratamento crônico com FAEs (CBZ ou FNB) não modifica o desempenho dos animais no LAM durante o treino, porém, apresenta uma tendência no tempo dispendido no quadrante-alvo no dia da prova entre os fármacos.

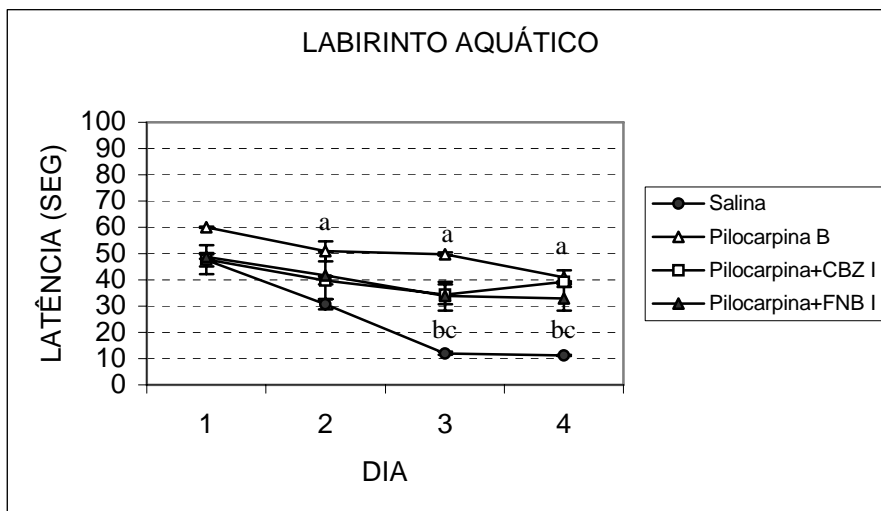


Figura 18: Médias das latências de chegada à plataforma nas sessões de treino no LAM de ratos epiléticos tratados cronicamente com FAE (DE₅₀). Salina (n=5), Pilocarpina B (n=4), Pilocarpina+CBZ (n=5) e Pilocarpina+FNB (n=4). (a) Diferença significativa entre Pilocarpina B e controle ($p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,001$), (b) Diferença significativa entre o Pilocarpina+CBZ e controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) e (c) Diferença significativa entre o Pilocarpina+FNB e controle ($p < 0,01$) (em ANOVA seguido de Bonferroni).

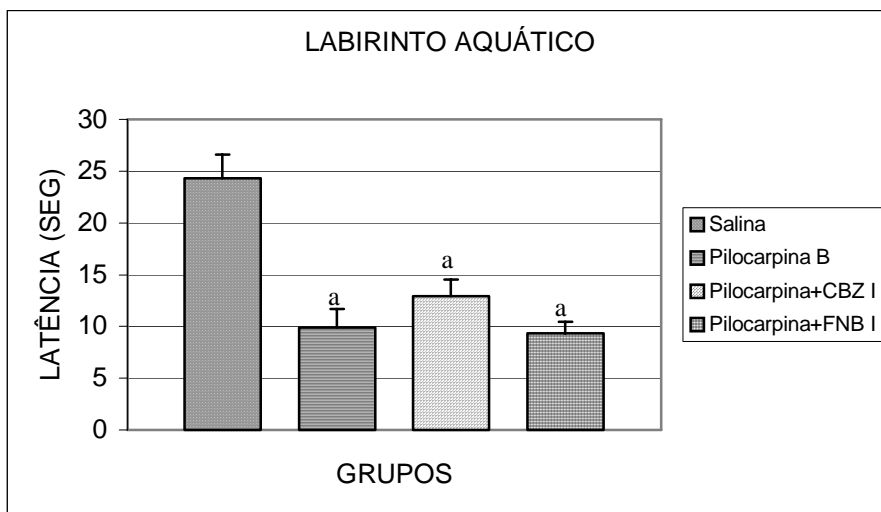


Figura 19: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos epiléticos tratados cronicamente com FAE (DE₅₀). Salina (n=5), Pilocarpina B (n=4), Pilocarpina+CBZ (n=5) e Pilocarpina+FNB (n=4). (a) Diferença significativa com relação ao grupo controle ($p = 0,001$).

5.1.4. Efeito do Tratamento Crônico com elevadas doses de FAEs, em ratos epilépticos sobre o desempenho no LAM

A latência durante o treino e o tempo dispendido no quadrante-alvo no dia da prova foram estudados através do teste estatístico de análise de variância (ANOVA) de duas vias ordenadas, seguida pelo teste de Bonferroni com $p < 0.05$.

O desempenho dos ratos epilépticos tratados cronicamente com doses elevadas tanto de CBZ quanto de FNB, foi significativamente diferente no 3º e 4º dia de treinamento, quando comparados com o controle (respectivamente: $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,01$ e $p < 0,01$ em ANOVA seguido de Bonferroni). No entanto, não verificamos diferença em relação aos ratos epilépticos que receberam apenas solução salina (Pilocarpina B, SE=90 minutos) (Figura 20).

Quando analisamos o tempo de permanência no quadrante-alvo, encontramos diferença significativa entre o controle e todos os grupos de ratos epilépticos ($p < 0,001$).

Não houve diferença entre os ratos tratados cronicamente com FAEs e aqueles que receberam solução salina (Pilocarpina B, SE=90 minutos), porém, encontramos diferença entre as diferentes doses de CBZ ($p = 0,034$) (Figura 21 e 22).

O tratamento crônico com doses elevadas de FAE (CBZ ou FNB) não modificou o desempenho dos animais no LAM, durante o treino, quando comparado com doses terapêuticas. Porém, houve diferença significativa no tempo dispendido no quadrante-alvo no dia da prova com as diferentes doses de CBZ.

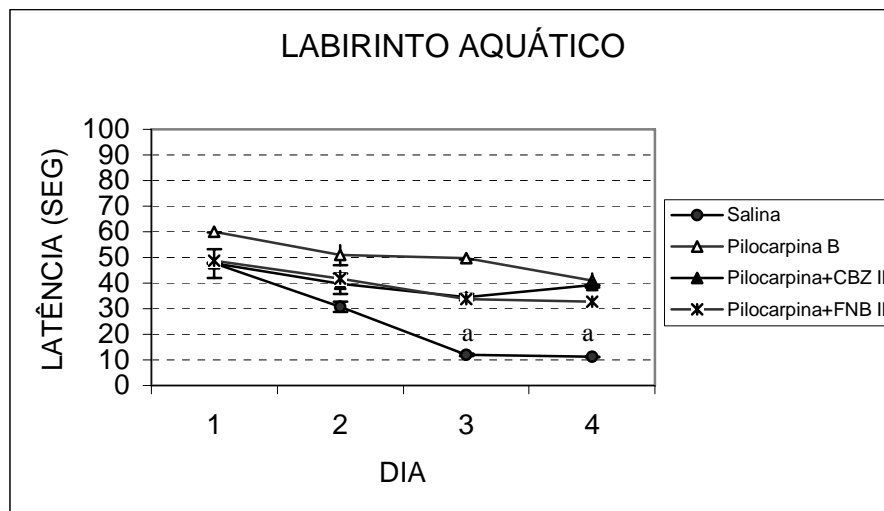


Figura 20: Médias das latências de chegada à plataforma nas sessões de treino no LAM de ratos epiléticos tratados cronicamente com doses elevadas de FAE. Salina (n=5), Pilocarpina B (n=4), Pilocarpina+CBZ II (n=3) e Pilocarpina+FNB II (n=8). (a) Diferença significativa com relação ao controle ($p < 0,01$ em ANOVA seguido de Bonferroni).

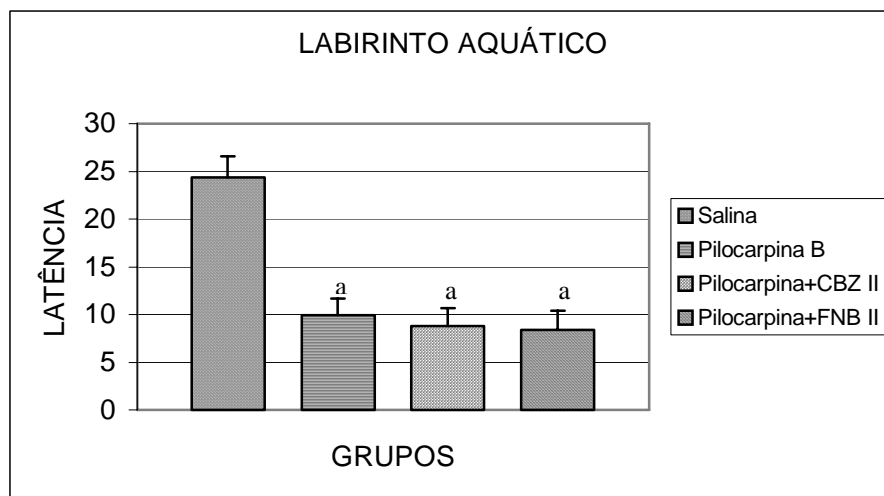


Figura 21: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos epiléticos tratados cronicamente com doses elevadas de FAE. Salina (n=5), Pilocarpina B (n=4), Pilocarpina+CBZ II (n=3) e Pilocarpina+FNB II (n=8). (a) Diferença significativa com relação ao grupo controle ($p = 0,001$).

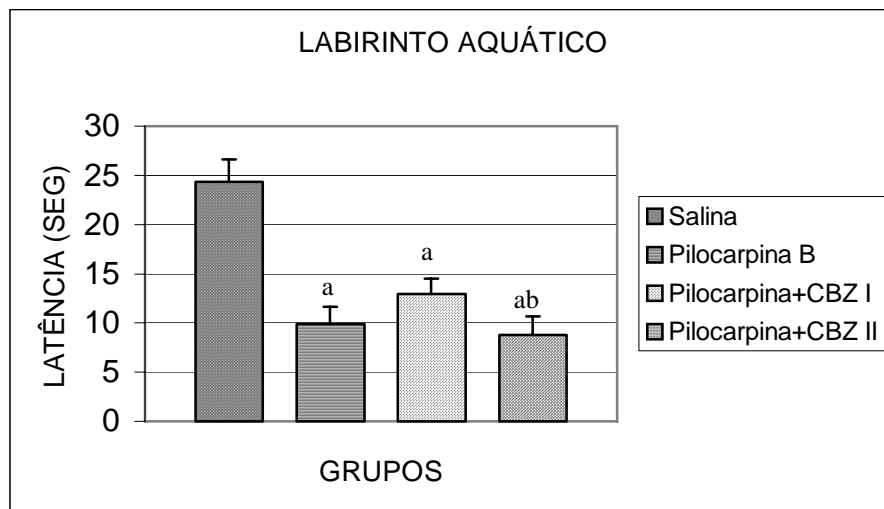


Figura 22: Tempo de permanência no quadrante-alvo no LAM de ratos epiléticos tratados cronicamente com diferentes doses de CBZ. Salina (n=5), Pilocarpina+CBZ I (n=5) e Pilocarpina+CBZ II (n=3), (a) Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e (b) Diferença significativa entre as diferentes doses de CBZ ($p = 0,034$).

5.1.5. Médias das latências nos treinos no LAM de todos os grupos experimentais

Embora já tenhamos apresentado, de maneira gráfica, as médias das latências nos treinos no LAM, achamos oportuno resumir os dados na tabela sinóptica abaixo, onde estão listados todos os grupos experimentais com as correspondentes médias \pm erros padrão, resultante da análise multivariada.

Quando agrupamos as médias das latências no LAM de todos os grupos durante o treinamento, obtivemos o seguinte resultado, expresso na tabela I:

Tabela I: Comparação entre as médias das latências no LAM durante os dias de treinamento nos diferentes grupos.

Grupos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Salina	47,66±5,58	30,74±1,97	12,00±0,61	11,16±0,20
Pilocarpina A	42,77±2,01 ^b	24,90±4,24 ^b	27,51±3,54 ^b	13,93±1,44 ^b
Pilocarpina B	60,00±0,20	50,89±3,81 ^a	49,77±0,60 ^a	41,00±2,65 ^a
CBZ	42,35±3,36	31,07±3,88	20,56±4,49	14,39±0,75
FNB	40,94±4,11	25,46±4,82	21,07±3,00	15,69±0,52
SAT	46,67±2,39	24,90±2,70	24,30±3,06	19,98±1,42
Pilocarpina+CBZ	47,73±2,59	39,79±1,49	34,49±3,88 ^c	39,20±0,48 ^c
Pilocarpina+FNB	48,83±0,81	41,79±9,01	33,83±5,44 ^d	32,83±4,55 ^d
Pilocarpina+CBZ II	47,73±0,30	39,76±3,96	34,51±1,27 ^e	39,20±0,17 ^e
Pilocarpina+FNB II	48,83±0,47	41,49±2,91	33,83±0,43 ^f	32,83±0,92 ^f

Os valores correspondem à média da latência (seg) ± erro padrão. Salina (n=5), Pilocarpina A (n=15), Pilocarpina B (n=4), CBZ (n=21), FNB (n=20) e SAT (n=21), Pilocarpina+CBZ (n=5) e Pilocarpina+FNB (n=4), Pilocarpina+CBZ II (n=3) e Pilocarpina+FNB II (n=8). ANOVA seguida de Bonferroni, com p<0.05. Sendo que: (a): Diferença significativa entre Pilocarpina B e controle (p<0,05, p<0,001, p<0,001), (b): Pilocarpina A e Pilocarpina B (p<0,05, p<0,001, p<0,01, p<0,001), (c): Pilocarpina+CBZ e controle (p<0,01 e p<0,001), (d): Pilocarpina+FNB e controle (p<0,01), (e): Pilocarpina+CBZ II e controle (p<0,01, p<0,001), (g): Pilocarpina+FNB II e controle (p<0,01 e p<0,01).

5.2. ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO

5.2.1. Indução de LTP em fatias hipocâmpais de ratos epilépticos: efeito do tempo de SE

Os dados foram expressos em percentual de fatias em que foi possível induzir LTP, e entre parênteses a média percentual da amplitude do PEPS em relação ao controle (100%) \pm erro padrão, e o número de fatias (n). Na análise estatística foi empregado o Teste t, para comparar as amplitudes dos PEPS no 45º minuto.

Encontramos diferença significativa na indução da LTP entre os ratos epilépticos e o grupo controle. Houve indução de LTP em 70% de fatias hipocâmpais do grupo controle (160,04 \pm 0,09 e n=10) e não-indução (NI) em 30% das fatias (97,32 \pm 0,15 e n=3). No grupo Pilocarpina A (n=10 fatias) houve 80% de NI (109,88 \pm 0,22) e 20% de LTD (51,34 \pm 0,06), e no grupo Pilocarpina B houve apenas NI (103,34 \pm 0,07 e n=6 fatias) (Figura 23, 24 e 25).

A estimulação de alta frequência de fatias hipocâmpais de ratos epilépticos, submetidos a diferentes tempos de SE, produziu dificuldade na obtenção de LTP, no entanto houve LTD em duas fatias hipocâmpais de ratos epilépticos do grupo Pilocarpina A (SE=15 minutos).

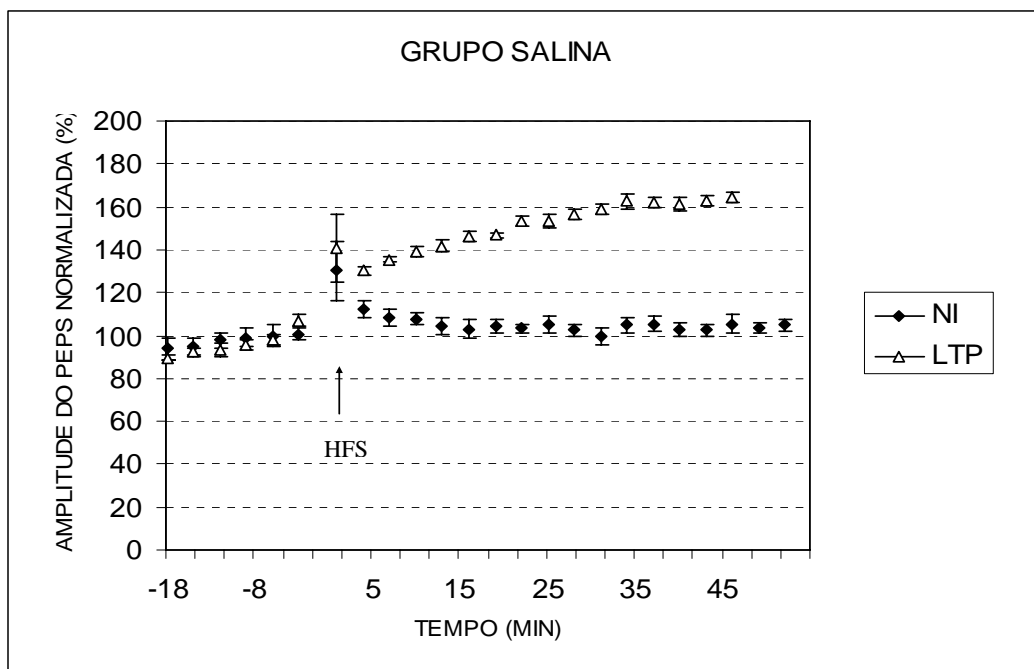


Figura 23: Demonstração da ocorrência de LTP em fatias hipocâmpais de ratos normais, com a aplicação do estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). Não induzido (NI, n=3 fatias) e LTP (n=7 fatias).

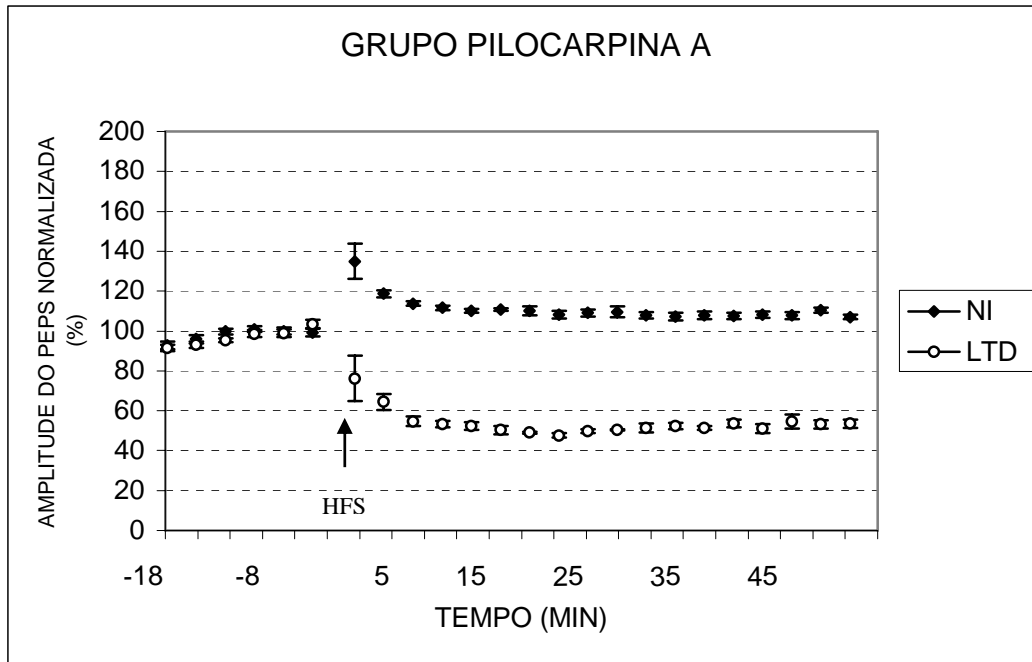


Figura 24: Distribuição dos fenômenos de plasticidade sináptica, determinados pela aplicação do estímulo de alta frequência (seta), registrados em fatias hipocâmpais de ratos do grupo Pilocarpina A (SE=15 minutos). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=8 fatias) e LTD (n=2 fatias).

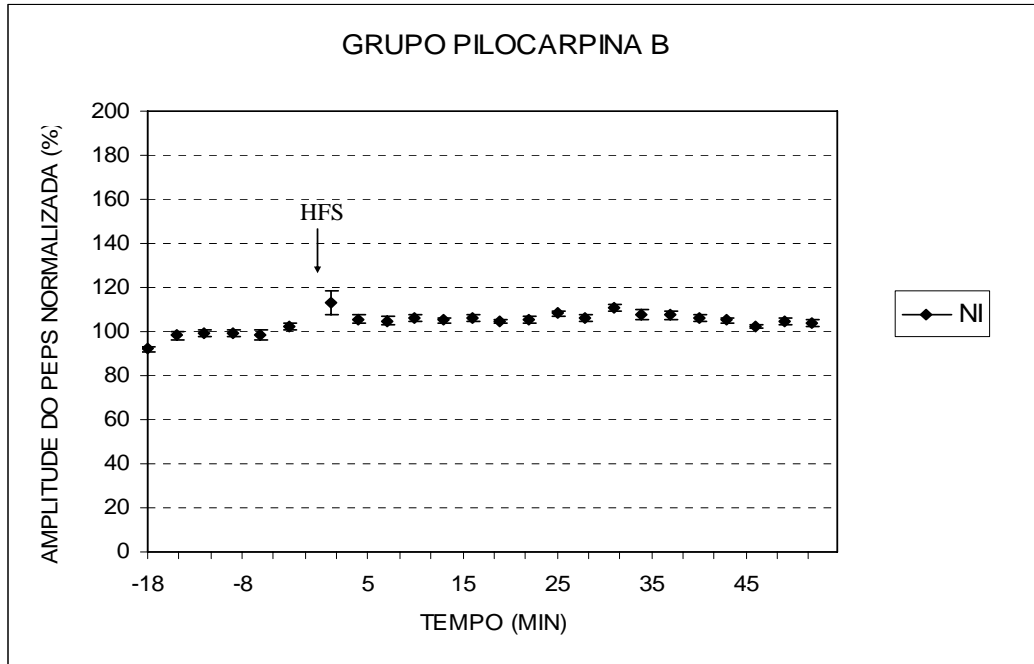


Figura 25: Demonstração da dificuldade de indução de LTP em fatias hipocâmpais de ratos do grupo Pilocarpina B (SE=90 minutos), com aplicação de estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=6 fatias).

5.2.2. Indução de LTP em fatias hipocâmpais de ratos normais tratados cronicamente com FAEs (DE₅₀)

Nossos resultados foram expressos em percentual de fatias em que foi possível induzir LTP, e entre parênteses a média percentual da amplitude do PEPS em relação ao controle (100%) \pm erro padrão, e o número de fatias (n). Na análise estatística foi empregados o Teste t e o Qui-quadrado, para comparar as amplitudes dos PEPS no 45º minuto pós-estímulo.

Quando aplicamos o estímulo de alta frequência em fatias hipocâmpais de ratos normais tratados cronicamente com FAEs em DE₅₀, obtivemos dificuldade na indução da LTP, considerando a média das amplitudes dos PEPS.

Assim, observamos que FAEs habitualmente utilizados no tratamento das epilepsias (CBZ e FNB), em DE₅₀, interferem de forma significativa na indução da LTP (Qui-quadrado $\chi^2 = 11,74$, Teste t p=0,01). No grupo CBZ ocorreu indução de LTP em apenas 10% das fatias (n=20 fatias), no FNB ocorreu indução em 26,6% (n=15 fatias) e no grupo SAT em 16,6% (n=13 fatias) (Figura 26, 27 e 28).

Nos grupos analisados observamos a ocorrência de três desfechos diferentes, NI, LTD e LTP, distribuídos da seguinte forma: grupo CBZ (NI:112, 72 \pm 0,17 e n= 17, LTD: 59,23 \pm 0,43 e n=1 e LTP:160,32 \pm 0,38 e n=2); grupo FNB (NI:105,70 \pm 0,10 e n= 11 e LTP: 182,93 \pm 0,09 e n= 4,); e grupo SAT (NI: 111,70 \pm 0,1 e n=6, LTD: 48,09 \pm 0,19 e n=2, LTP: 183,89 \pm 0,08 e n=5).

Porém, considerando-se a média das amplitudes dos PEPS no 45° minuto pós-estímulo de alta frequência entre fatias hipocampais de ratos normais tratados com CBZ ou FNB, não encontramos diferença significativa.

Assim, constatamos que o tratamento crônico de ratos normais com CBZ ou FNB em doses terapêuticas interfere na indução da LTP, e facilita a ocorrência de LTD.

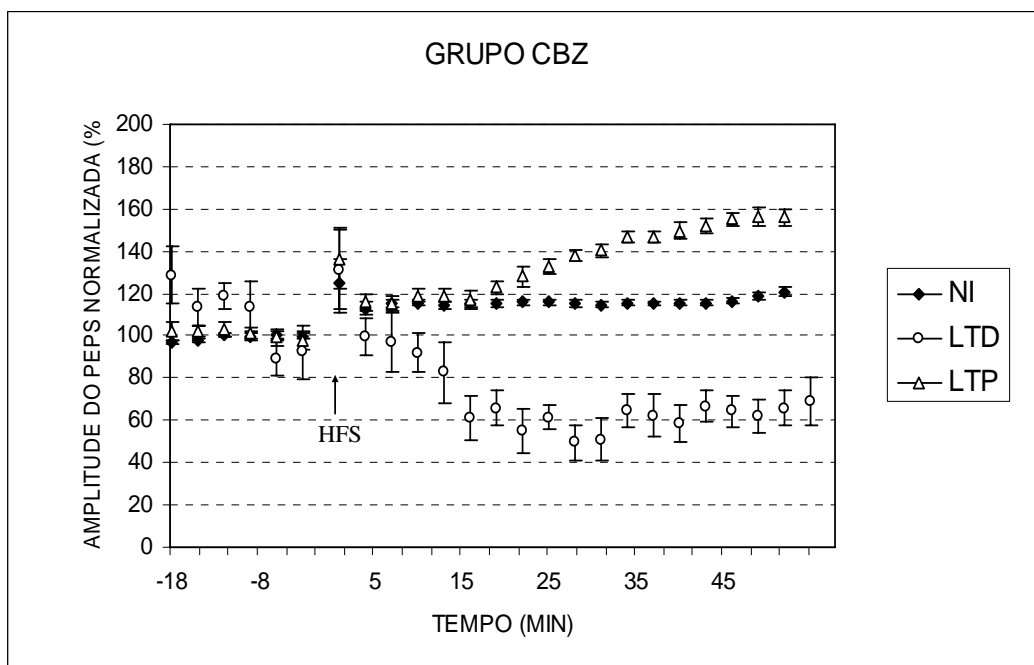


Figura 26: Distribuição dos fenômenos de plasticidade sináptica, determinados pela aplicação do estímulo de alta frequência (seta), registrados em fatias hipocampais de ratos normais tratados cronicamente com CBZ (60mg/kg). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=17 fatias), LTD (n=1 fatia) e LTP (n=2 fatias).

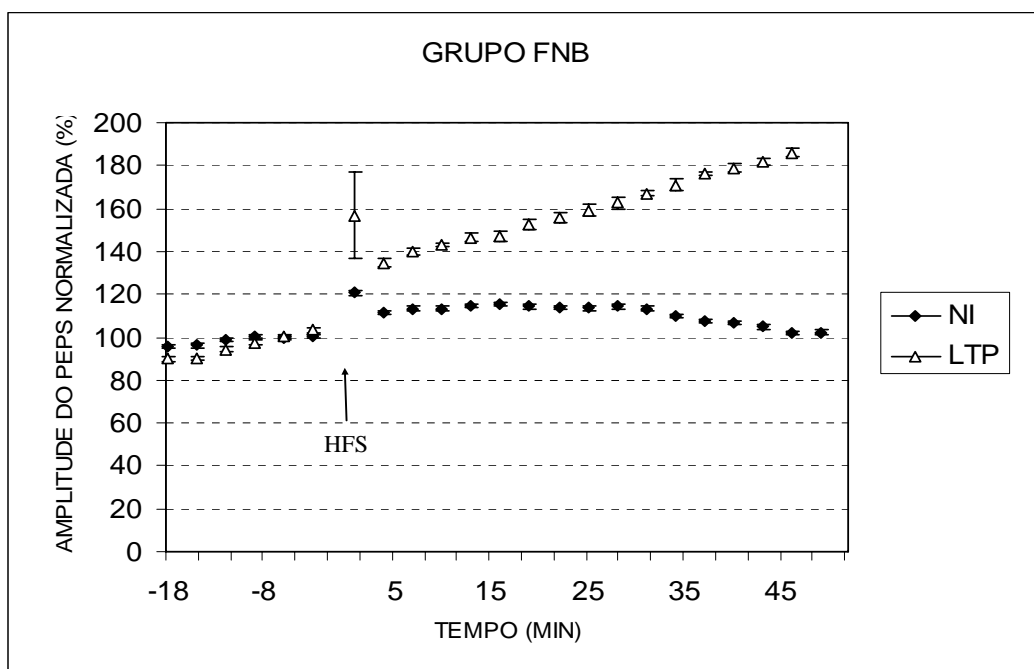


Figura 27: Demonstração da dificuldade de indução da LTP em fatias hipocâmpais de ratos normais tratados cronicamente com FNB (35mg/kg), com aplicação do estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=11 fatias) e LTP (n=4 fatias).

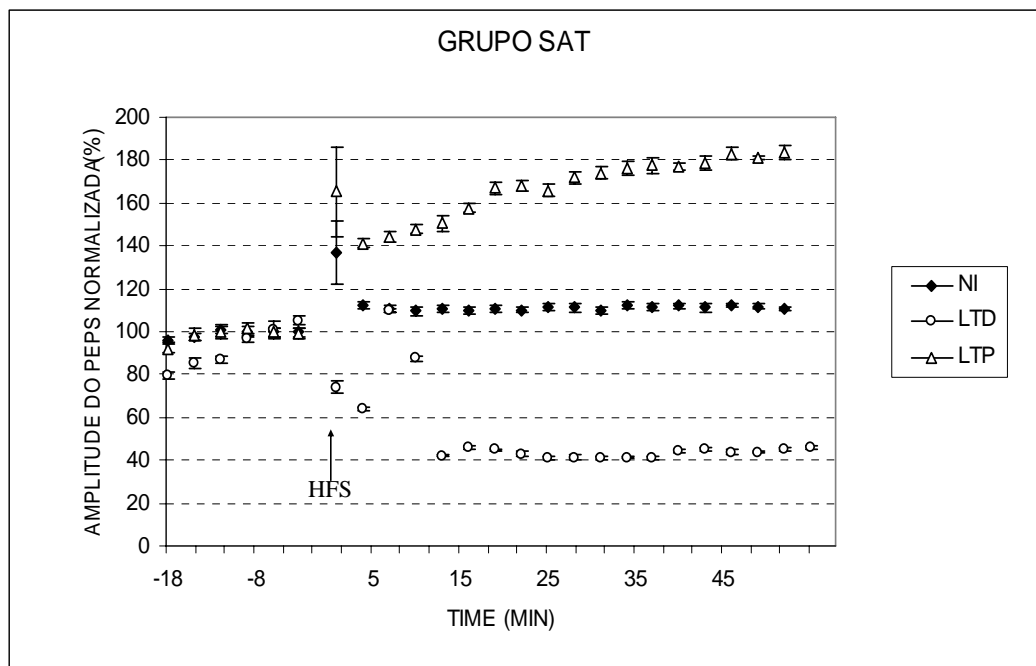


Figura 28: Distribuição dos fenômenos de plasticidade sináptica, determinados pela aplicação do estímulo de alta frequência (seta), registrados em fatias hipocâmpais de ratos normais tratados cronicamente com SAT. Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=8 fatias), LTD (n=2 fatias) e LTP (n=5 fatias).

5.2.3. Indução da LTP em fatias hipocâmpais de ratos epilépticos tratados cronicamente com FAEs (DE₅₀)

Os resultados foram apresentados da seguinte maneira: percentual de fatias em que foi possível induzir LTP, e entre parênteses a média percentual da amplitude do PEPS em relação ao controle (100%) \pm erro padrão, e o número de fatias (n). Para comparar as amplitudes dos PEPS no 45º minuto utilizamos o Teste t.

O grupo Pilocarpina+CBZ apresentou 80% de NI (94,06 \pm 0,10 e n=4 fatias) e 20% de induções de LTP (205,17 \pm 0,07 e n=1 fatia), já o grupo Pilocarpina+FNB apresentou apenas NI (104,67 \pm 0,17 e n=7 fatias) (Figura 29 e 30).

Não encontramos diferença significativa na amplitude do PEPS no 45º minuto pós-tetânico entre ratos epilépticos tratados com CBZ ou FNB (Teste t, p>0,05).

A estimulação de alta frequência de fatias hipocâmpais de ratos epilépticos tratados cronicamente com FAEs (CBZ ou FNB), em DE₅₀, causou dificuldades na indução da LTP. Porém, quando comparamos com o grupo Pilocarpina B (SE=90 minutos), o qual apresentou apenas NI, verificamos que o tratamento crônico com CBZ permitiu a ocorrência de LTP em uma fatia hipocâmpal. Já, o tratamento crônico com FNB apresenta apenas NI, semelhante ao grupo Pilocarpina B.

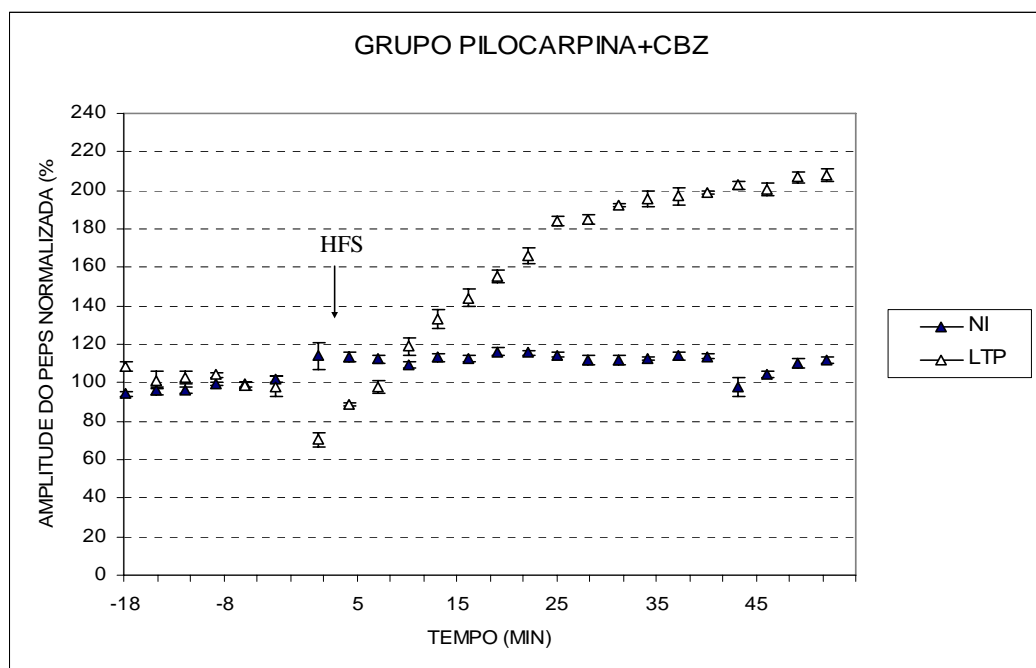


Figura 29: Demonstração da dificuldade de indução da LTP em fatias hipocâmpais de ratos epiléticos tratados cronicamente com CBZ (60mg/kg), com aplicação de estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=4 fatias) e LTP (n=1 fatia).

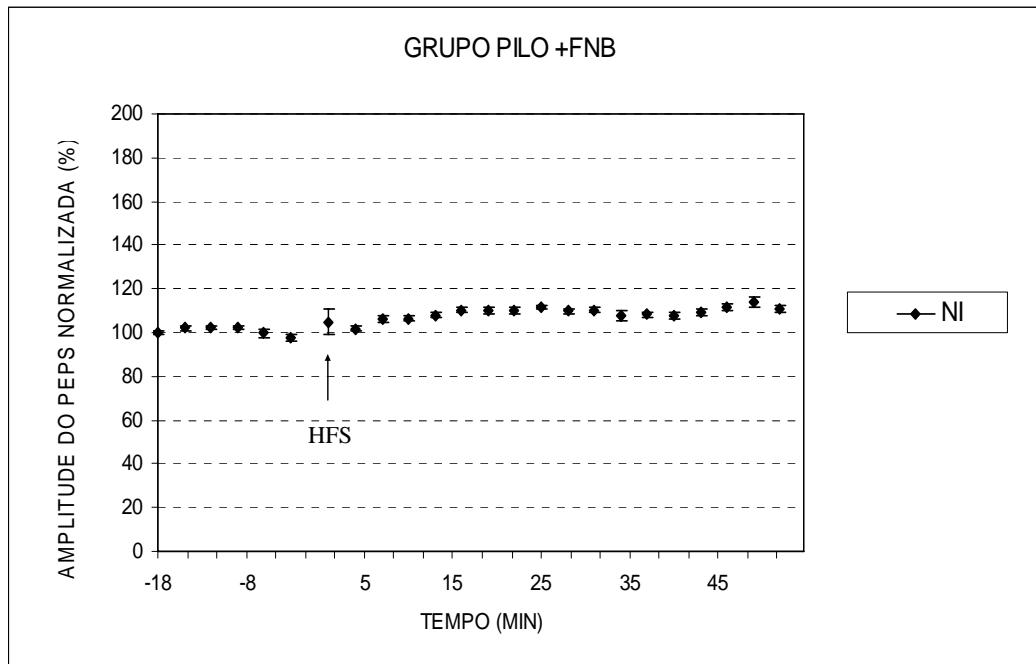


Figura 30: Demonstração da não indução de LTP em fatias hipocampais de ratos epiléticos tratados cronicamente com FNB (35mg/kg), com aplicação do estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=7 fatias).

5.2.4. Indução da LTP em fatias hipocâmpais de ratos epilépticos tratados cronicamente com FAEs em doses elevadas

Os dados foram expressos em percentual de fatias em que foi possível induzir LTP, e entre parênteses a média percentual da amplitude do PEPS em relação ao controle (100%) \pm erro padrão, e o número de fatias (n). Para comparar as amplitudes dos PEPS no 45º minuto pós-estímulo utilizamos o Teste t.

A estimulação de alta frequência em fatias hipocâmpais de ratos epilépticos submetidos ao tratamento com doses elevadas de FAEs, produziu dificuldade na obtenção de LTP em todas as fatias. Foram encontrados os seguintes desfechos nos grupos: grupo Pilocarpina+CBZ II (NI: $78,015 \pm 0,15$ e $n=5$ e LTD: $52,94 \pm 0,36$ e $n=1$) e o Pilocarpina+FNB II (NI: $113,96 \pm 0,21$ e $n=3$) (Figura 31 e 32).

Analisando as amplitudes dos PEPS no 45º minuto pós-tetânico, observamos que não há diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p > 0,05$).

O tratamento crônico de ratos epilépticos com CBZ ou FNB em elevadas doses interfere na obtenção da LTP. E quando comparamos com o grupo Pilocarpina B (SE=90 minutos), verificamos que o tratamento com CBZ permite a ocorrência do fenômeno de LTD em uma fatia hipocâmpal, e o FNB apresenta apenas NI.

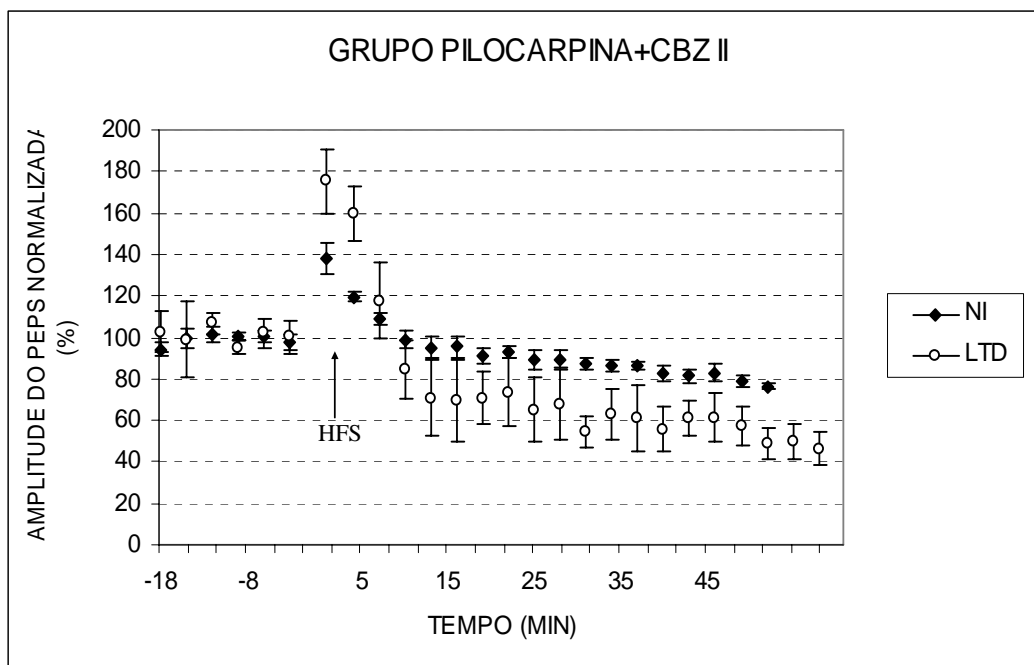


Figura 31: Demonstração da dificuldade de indução de LTP em fatias hipocâmpais de ratos epilépticos tratados cronicamente com CBZ (150mg/kg), com aplicação do estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=5 fatias) e LTD (n=1 fatia).

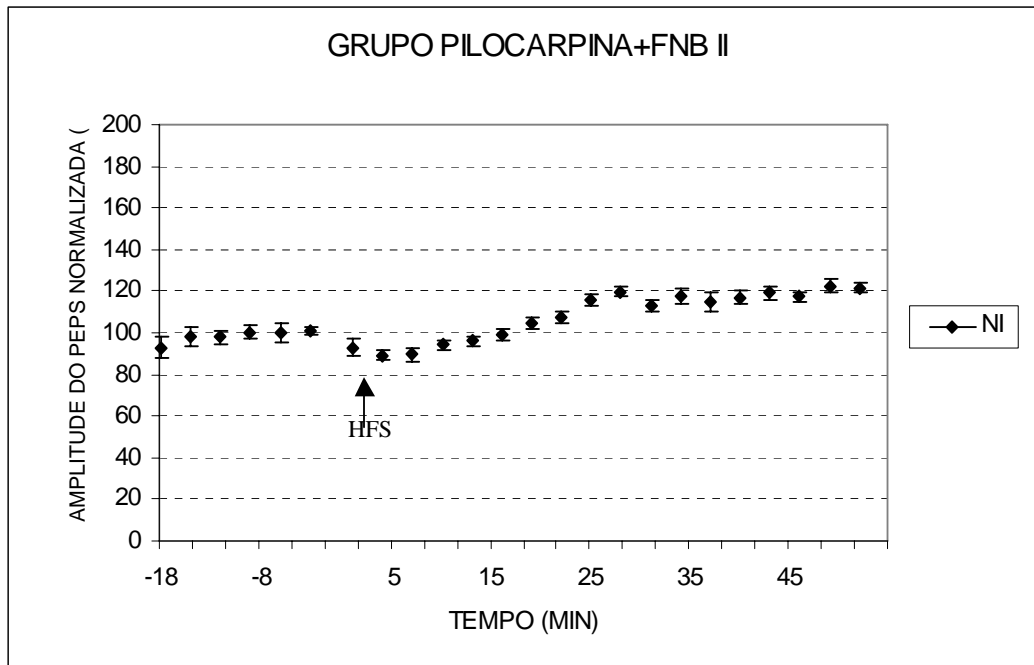


Figura 32: Demonstração da não indução de LTP em fatias hipocampais de ratos epiléticos tratados cronicamente com FNB (100mg/kg), com aplicação do estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em 3 minutos \pm erro padrão). NI (n=3 fatias).

5.2.5. Média das variações de amplitude percentual dos PEPS de todos os grupos experimentais

Embora já apresentamos de maneira gráfica as médias das latências nos treinos no LAM, achamos oportuno resumir os dados na tabela abaixo, onde estão listados todos os grupos experimentais com a corresponde média \pm erro padrão e o valor de p resultante da análise multivariada, onde a notação literal e maiúscula corresponde às comparações realizadas. Quando agrupamos a média das amplitudes percentuais do PEPS no 45° minuto pós-estímulo de alta frequência, dos grupos e com os 3 desfechos possíveis, obtivemos o seguinte resultado (Tabela II):

Tabela II: Comparação entre as médias das amplitudes do PEPS no 45° minuto pós-estímulo de alta frequência, nos diferentes grupos.

Grupos	NI	LTD	LTP
Salina	97,32 \pm 0,15 (n=3)	-	160,04 \pm 0,09 (n=7)
Pilocarpina A	109,88 \pm 00,22 (n=8)	51,34 \pm 0,06 (n=2)	-
Pilocarpina B	103,34 \pm 0,07 (n=6)	-	-
CBZ	112,72 \pm 0,17 (n=17)	59,23 \pm 0,43 (n=1)	160,32 \pm 0,38 (n=2)
FNB	105,70 \pm 0,10 (n=11)	-	182,93 \pm 0,09 (n=4)
SAT	111,70 \pm 0,1(n=8)	48,09 \pm 0,19 (n=2)	183,89 \pm 0,08 (n=5)
Pilocarpina+CBZ	94,06 \pm 0,10 (n=4)	-	205,17 \pm 0,07 (n=1)
Pilocarpina+FNB	104,67 \pm 0,17 (n=7)	-	-
Pilocarpina+CBZ II	78,01 \pm 0,15 (n=5)	52,94 \pm 0,36 (n=1)	-
Pilocarpina+FNB II	113,96 \pm 0,21 (n=3)	-	-

Amplitude normalizada (%) no 45° minuto pós-estímulo tetânico \pm erro padrão e entreparênteses o n de fatias utilizadas.

5.2.6. Análise do *Slope*

A análise do *slope* ou inclinação do PEPSC foi realizada apenas nas fatias em que foi obtida a indução de LTP. Analisando as alterações percentuais no *slope* do PEPSC no 45º minuto após a estimulação tetânica, em relação ao *slope* basal (10 minutos pré-estímulo), observamos diferença significativa entre os grupos: Salina versus Drogas ($p=0,0157$) e Salina versus Salina+FNB ($p=0,027$) (Tabela III).

Tabela III: Alteração percentual no *Slope* do PEPSC nos diferentes grupos

Grupos	Alteração percentual no <i>slope</i> do PEPSC
Salina	112,01±31,94
CBZ	147,96±15,24
FNB	270,34±84,70 ^a
SAT	145,53±80,59
Pilocarpina+CBZ	144,08

Amplitude normalizada (%). Foi realizada a análise do *slope* apenas nas fatias em que houve indução da LTP. Número de fatias que apresentaram LTP por grupo: Salina (n=7), CBZ (n=2), FNB (n=4), SAT (n=5), Pilocarpina A (n=1) e Pilocarpina+CBZ (n=1). A comparação do *slope*, via Teste t, foi realizada no 45º pós-estímulo de alta frequência. (a) Diferença significativa entre controle e tratamento crônico com FNB.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da epilepsia e de fármacos antiepilépticos sobre a memória espacial e a indução de potenciação de longa duração (LTP) na região CA1 hipocampal, em ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina.

Em nosso estudo encontramos diferença significativa nos desempenhos dos animais no labirinto aquático de Morris (LAM) em diferentes tempos de *status epilepticus* (SE). Quando comparamos o grupo Pilocarpina A (SE=15 minutos) com o controle, não encontramos diferença durante o treino, porém houve uma tendência durante a prova. O desempenho dos animais do grupo Pilocarpina B (SE=90 minutos) foi significativamente diferente do controle no 2º, 3º e 4º dia de treino, e também na prova (Figuras 14 e 15).

Também encontramos diferença significativa entre o desempenho dos animais dos grupos Pilocarpina A e Pilocarpina B em todos os dias do treinamento, e no tempo dispendido no quadrante alvo no dia da prova (Figura 15).

A atividade epiléptica é responsável no hipocampo pela morte celular e brotamento das fibras musgosas. Em animais em desenvolvimento interfere com a neurogênese e com a atividade sináptica. Assim, tem sido relatada a diminuição na neurotransmissão excitatória com redução na densidade das espinhas dendríticas e redução na expressão dos receptores NMDA (Lynch et al., 2000; Zhang et al., 2004).

Estudos experimentais de Pitkanen et al (2002) demonstram que crises recorrentes, tanto duradouras quanto esporádicas, podem causar morte neuronal principalmente na região hipocampal, porém o dano é menor quando ocorre apenas uma crise, e pode aumentar com a maior frequência das crises, contribuindo para o declínio cognitivo. Assim,

podemos inferir que quanto maior o tempo em SE, maior a possibilidade de desenvolvimento de crises espontâneas recorrentes e conseqüentemente dano neuronal.

Não encontramos estudos na literatura que avaliassem as repercussões de tempos diferentes de SE na memória espacial. Porém, podemos comparar nossos resultados ao estudo de Wu et al (2001) em que buscou-se investigar os efeitos cognitivos e morfológicos a longo prazo em animais epiléticos imaturos no modelo experimental de Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) através da injeção sistêmica de lítio-pilocarpina. Neste estudo observou-se tanto déficit na memória espacial quanto de trabalho, sendo que os animais haviam permanecido em SE, por um longo período, de várias horas.

Também no modelo de lítio-pilocarpina, Julien et al. (2005) demonstrou que ratos adultos que permaneceram 2 horas em SE apresentaram déficits no LAM e no labirinto de oito braços, decorrente de perda neuronal predominante em hipocampo, córtex entorrinal e amígdala.

Animais em desenvolvimento submetidos ao modelo lítio-pilocarpina apresentam determinada lesão no núcleo médio lateral do tálamo, estrutura crítica na relação do prosencéfalo basal e o córtex pré-frontal determinando importantes alterações de memória (Kubota et al., 2001).

O tratamento crônico com fármacos antiepiléticos (FAEs) na dose terapêutica (DE_{50}), não promoveu diferença significativa no desempenho dos animais no LAM, quando comparamos os ratos normais que receberam carbamazepina (CBZ) ou fenobarbital (FNB) com o controle. Porém, na análise do tempo de permanência no quadrante-alvo, encontramos diferença significativa entre o grupo controle e o SAT (tween 80 a 3% de solução salina) (Figuras 16 e 17).

Habitualmente na epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, a conduta adequada quando falha um fármaco antiepiléptico no controle das crises é de buscar a dose máxima tolerada (Da Costa et al., 1998). Assim, procurando mimetizar esta situação estabelecemos um protocolo de uma segunda dose de FAEs (CBZ e FNB), com o objetivo de verificar se esta abordagem terapêutica recomendada pela probabilidade de aumentar o número de indivíduos controlados, pudesse ter efeito deletério na sua performance no LAM.

Nossos resultados estão de acordo com Bernardi et al (2004), que demonstraram que a CBZ não compromete e nem melhora o aprendizado de animais normais nos diferentes testes de memória. Sudha et al (1995) também verificou que o tratamento crônico com CBZ em doses entre 5 e 80mg/kg, não alterou o aprendizado e a memória de animais normais no labirinto em T e na esquiwa passiva.

Estudos com FNB demonstraram que os ratos normais submetidos a tratamento crônico apresentaram desempenho em testes comportamentais semelhantes ao controle (Mikati et al., 1994; McBride et al., 1985).

Com o treinamento dos animais no LAM não encontramos diferença entre os grupos epiléticos tratados com salina e os epiléticos tratados cronicamente com FAEs (CBZ e FNB) em DE₅₀, demonstrando que, nesta dose, o tratamento crônico com estes fármacos não influenciou a memória espacial (Figuras 18 e 19).

Nossos resultados estão consistentes com achados em humanos:

- Modadori e Classen (1984 e 1989) avaliaram o efeito da CBZ sobre a alteração da memória provocada por eletrochoque, e observaram uma diminuição significativa dos efeitos amnésicos, porém este é um modelo agudo e não crônico, como o da pilocarpina empregado por nós.

- Estudo publicado por Engelberts (2002), mostrou que pacientes com epilepsia parcial crônica controlada mediante tratamento com CBZ não apresentavam déficits importantes na memória e demais funções cognitivas analisadas.

- Riva e Devoti (1999) analisaram a performance cognitiva de 6 crianças durante o uso e um ano após a descontinuação da CBZ, verificando que, em nenhuma das situações, o uso de CBZ afetou as funções intelectuais, a memória ou a atenção.

No modelo experimental do ácido caínico (intra-hipocampal) o tratamento crônico com FNB promoveu prejuízo na memória espacial e no controle das crises recorrentes, bem como não modificou as lesões histológicas, presentes nas áreas CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo (Bolaños et al., 1998). Porém, este pré-tratamento previne o prejuízo na aquisição da memória induzido pelo ácido caínico (Brown-Croyts et al., 2000). Isto também coincide com achados como o de Mikati et al (1994), que demonstrou que o tratamento crônico com FNB durante o desenvolvimento não diminui o número de crises espontâneas, e pode mesmo exacerbar o dano cognitivo no modelo do ácido caínico.

Consistente com isso, não encontramos diferença no desempenho no LAM dos animais com epilepsia e não tratados quando comparados com aqueles tratados cronicamente com FAEs em doses elevadas; entretanto houve diferença significativa quando comparadas as diferentes doses de CBZ, com prejuízo do aprendizado e memória nas altas doses (Figuras 20e 21).

O grupo de animais que permaneceu em SE prolongado (90 minutos) inicialmente era composto por 75 animais (5 grupos de 15), mas apresentou alta mortalidade (68%), o que está de acordo com a literatura, mas foi maior do que esperávamos ($\pm 30-40\%$). Este resultado pode estar relacionado com a época do ano que foi realizado, pois tivemos temperaturas mais elevadas do que o esperado. Provavelmente a temperatura elevada,

presente no período entre a injeção e a interrupção do SE, possa ter agravado o estado neurológico e influenciado esta alta mortalidade (Shorvon et al., 1994; Lemos et al., 1996; Priel et al., 1996).

Com relação aos dados dos registros eletrofisiológicos verificamos a ocorrência de LTP em 70% do grupo controle, este dado está de acordo com a literatura (Frison et al 2005). Já, em fatias hipocâmpais de ratos epiléticos constatamos a total ausência deste fenômeno, independente do tempo de SE. No entanto, o grupo Pilocarpina A, que permaneceu menor tempo em SE, apresentou LTD em duas fatias hipocâmpais (Figuras 23, 24 e 25).

O protocolo utilizado (estímulo de alta frequência) é próprio para indução de LTP, entretanto apenas em 2 fatias hipocâmpais de ratos epiléticos (Pilocarpina A, SE=15 minutos), observamos a indução de LTD. Isto provavelmente se relaciona com a morte seletiva de agrupamentos neuronais e/ou *dowregulation* de receptores glutamatérgicos, hipótese que não aprofundamos neste trabalho.

Outra importante questão referente ao nível de despolarização do neurônio pós-sináptico, com o conseqüente maior ou menor aumento na $[Ca^{2+}]_i$ parece ser de crucial importância na “direcionalidade” do fenômeno plástico (depressão ou potenciação) (Nishiyama et al., 2000)

Steele e Mauk (1999) demonstraram, no hipocampo, que a hiperatividade de receptores GABA_A amplia a faixa de frequências capazes de induzir LTD, ao passo que sob bloqueio de tais receptores pela picrotoxina, LTDs só foram obtidas com frequências de estimulação extremamente baixas (0,25-0,5 Hz).

Trabalho realizado em nosso laboratório (Dalbem et al., 2005) observou efeito similar no estriado de animais com distonia induzida por ácido 3-nitropropiónico, sendo encontrados tanto LTP quanto LTD após estímulo de alta frequência.

Nossos resultados também estão de acordo com estudo de Frison et al (2005), que demonstrou que em 70 a 80% dos ratos-controle foi possível induzir LTP (no caso, medindo a variação de amplitude percentual no 30° minuto pós-estímulo tetânico), em comparação com 30 a 40% dos animais epiléticos (SE=90 minutos). A chance de ocorrência de indução de LTP em ratos-controle foi de 4 a 10 vezes maior do que a encontrada em animais epiléticos.

O modelo de ELT induzido pela pilocarpina interfere de maneira negativa na indução da LTP. Podemos inferir que as células sofrem modificações desfavoráveis que dificultam a indução de LTP nos ratos epiléticos, devido a um prejuízo na integridade hipocampal decorrente do modelo experimental. A área lesionada neste modelo seria justamente aquela essencial para a manutenção da integridade do tecido para posterior indução da LTP (Frison et al., 2005).

Estudos eletrofisiológicos, em hipocampo de roedores epiléticos, demonstraram que a atividade repetida de crises tem importante efeito deletério na LTP (Reide et al., 1997), modificando os mecanismos básicos utilizados para sua geração e expressão (Palizvan et al., 2005).

Quanto à ação dos FAEs nos mecanismos relacionados com a plasticidade sináptica, encontramos dificuldades na obtenção de LTP em fatias hipocampais de ratos normais tratados cronicamente (DE₅₀), tanto com CBZ quanto FNB; foi, porém, possível induzir LTD em uma fatia hipocampal do grupo CBZ e em duas do grupo SAT (Figuras 26, 27 e 28).

Convergindo com nossos achados, Kubota et al (1994) demonstrou o bloqueio da indução da LTP em coelhos tratados cronicamente com CBZ, sugerindo uma possível ação inibitória da CBZ nos receptores NMDA. Este bloqueio pode resultar do bloqueio dos receptores NMDA na membrana pós-sináptica de células granulares e do giro denteado (Lampe et al., 1990; Kubota et al., 1994), e também do bloqueio de canais de sódio e potássio (Macdonald et al., 1989 Rogawski et al., 2004). Porém, Kubota et al. (1992) verificou facilitação do fenômeno de LTP em coelhos submetidos ao efeito agudo da CBZ.

Em concentrações terapêuticas, o FNB aumenta a probabilidade de abertura dos canais gabaérgicos, podendo atuar também em canais de sódio e cálcio, contribuindo para sua atividade terapêutica. O efeito do FNB em receptores GABA_A é provavelmente o mais importante na atividade epileptiforme (Rogawski et al., 2004).

Consistente com nossos resultados, Lee et al (1996) demonstram que a perfusão com FNB bloqueia a LTP mediada por NMDA, efeito pode ocorrer diretamente ou indiretamente no sistema gabaérgico.

Em nosso estudo encontramos dificuldade na obtenção de LTP em fatias hipocâmpais de ratos epiléticos tratados cronicamente com FAEs (DE₅₀), independente do fármaco. O tratamento com CBZ possibilitou a indução em apenas uma fatia hipocâmpal, e o FNB impediu totalmente a ocorrência de LTP (Figuras 29 e 30).

Não houve diferença significativa na amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) pós-estímulo tetânico, entre os ratos epiléticos tratados cronicamente com CBZ ou FNB (DE₅₀), sugerindo que estes fármacos, nas doses utilizadas, não alteraram os mecanismos de geração dos PEPS.

O estudo de nosso laboratório (Janish, 2003) demonstrou uma tendência a uma maior facilidade na obtenção de LTP em fatias hipocâmpais de ratos epiléticos sob o

efeito agudo de CBZ, mediante perfusão. A importância da ação exercida pela CBZ, em concentrações terapêuticas, em correntes de potássio pode representar um mecanismo crítico para o controle da excitabilidade neocortical e da geração de atividade epileptiforme (Zona et al., 1990).

O tratamento crônico com elevadas doses de FAEs, impediu totalmente a indução de LTP, tanto com CBZ quanto FNB. Porém, em uma fatia hipocampal do grupo de ratos epiléticos tratados com CBZ, ocorreu o fenômeno de LTD (Figuras 31 e 32).

Com os resultados deste trabalho podemos inferir que o déficit cognitivo está diretamente relacionado com o tempo de duração do SE, sendo necessário 90 minutos para verificar repercussões no LAM. O tratamento crônico com FAEs (CBZ ou FNB), em DE_{50} , não interfere no aprendizado espacial de ratos controle, nem epiléticos, e em doses elevadas também não interfere no desempenho de ratos epiléticos.

Com relação aos dados eletrofisiológicos, podemos concluir que a epilepsia induzida pelo modelo experimental da pilocarpina interfere na indução da LTP, independente do tempo de SE. O tratamento crônico com CBZ ou FNB (DE_{50}) interfere na indução da LTP, tanto em ratos controle, quanto em epiléticos, e em doses elevadas impede a indução da LTP.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho investigamos as repercussões do modelo experimental de ELT induzido pela pilocarpina diante de diferentes tratamentos crônicos com FAEs, tanto sobre o desempenho no labirinto aquático de Morris, quanto sobre a indução de potenciação de longa duração em fatias de hipocampo.

Nosso estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1. O déficit cognitivo está diretamente relacionado com o tempo de duração do *status epilepticus*, sendo necessário 90 minutos para detectar repercussões no labirinto aquático de Morris.
2. O tratamento crônico com FAEs (CBZ ou FNB), em dose terapêutica (DE₅₀), não interfere no aprendizado espacial de ratos controle, nem de epiléticos.
3. O tratamento crônico com doses elevadas de FAEs (CBZ ou FNB) não interfere no aprendizado espacial de ratos epiléticos.
4. A epilepsia induzida pelo modelo experimental da pilocarpina interfere na indução da LTP, proporcionalmente ao tempo de *status epilepticus*, quanto maior a duração, maior a dificuldade na obtenção de LTP.
5. O tratamento crônico com FAEs (CBZ ou FNB) em DE₅₀, interfere na indução da LTP em fatias hipocâmpais tanto de ratos controle, quanto de epiléticos.
6. O tratamento crônico com doses elevadas de FAEs (CBZ ou FNB) interfere nos mecanismos do fenômeno de LTP em fatias hipocâmpais de ratos epiléticos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Constitui-se em um projeto futuro o aprofundamento de nossos achados sobre a epilepsia, LTP e FAEs, mantendo esta mesma linha de pesquisa. Planejamos avaliar a estrutura do hipocampo, tanto na quantificação do brotamento axonal (*sprouting*), quanto na mensuração da perda neuronal decorrente deste modelo experimental.

Quanto aos FAEs, pretendemos realizar estudo *in vitro* com a perfusão destes fármacos para compararmos com os dados de tratamento crônico. Também planejamos avaliar o efeito agudo do tratamento com FAEs utilizando outros testes comportamentais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akman CI, Hu Y, Fu D, Holmes GL. The influence of cognitive reserve on seizure-induced injury. *Epilepsy & Behavior* 2003; 4:435-440.
2. Alvares LO, Genro BP, Breda RV, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA. AM251 a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Research*, in press.
3. Arai AC, Xia Y, Suzuli E. Modulation of AMPA receptor kinetics differentially influences synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* 2004; 123(4): 1011-1024.
4. Artola A, Singer W. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 1987; 330: 649-652.
5. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentate. *Neuroscience* 1991; 42: 351-363.
6. Baudry M, Massicotte G. Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and memory. *Concept Neurosci* 1992; 3:79-88.
7. Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiology* 1994; 4: 389-399.
8. Ben-Ari Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* 2001; 42(3): 5-7.
9. Ben-Arai Y, Represa A. Brief seizures episodes induce long-term potentiation and mossy fiber sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 1990; 13:312-318.
10. Bernardi RB, Barros MT. Carbamazepine enhances discriminative memory in rat model of epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45(11): 1443-1447.
11. Bianchin M, Souza TM, Medina JH, Izquierdo I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short term memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 1999; 71: 127-131.

12. Bliss TVP, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol* 1973; 232: 331-356.
13. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361:31-39.
14. Bolaños AR, Sarkisian M, Yang Y, Hori A, Helmers SL, Mikaki M, Tandon P, Strafstrom CE, Holmes GL. Comparison of Valproate and Phenobarbital treatment after status epilepticus in rats. *Neurology* 1998; 51: 41-47.
15. Brandeis R, Brandys Y, Yehuda. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Intern J Neuroscience* 1989; 48:29-69.
16. Brown-Croyts LM, Caton PW, Radecki DT, McPherson SL. Phenobarbital pre-treatment prevents kainic acid-induced impairments in acquisition learning. *Life Sci* 2000; 67(6): 643-50.
17. Burwell RD, Saddoris MP, Bucci DJ, Wiig KA. Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci* 2004; 24(15): 3826-3836.
18. Buzsaki G; Haas HL; Anderson EG. Long-term potentiation induced by physiologically relevant stimulus patterns. *Brain Research* 1987; 435: 331-333.
19. Cahill L, McGaugh JL. Modulation of memory storage. *Current Opinion in Neurobiology* 1996; 6: 237-242.
20. Calabresi P, Picconi B, Saulle, Centonze D, Hainsworth AH, Bernardi G. Is pharmacological neuroprotection dependent on reduced glutamate release? *Stroke* 2000b; 31: 766-772.
21. Capella HM, Lemos T. Effect on Epileptogenesis of Carbamazepine treatment during the silent period of the Pilocarpine Model of Epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43(5): 110-111.
22. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski I. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 1991; 32 (6):778-782.
23. Contzen R, Witte OW. Epileptic activity can induce both long-lasting potentiation and long-lasting depression. *Brain Research* 1994; 653: 340-344.

24. Costa MS, Funke MG, Meis L, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG. Status epilepticus induced by pilocarpine and Ca^{2+} transport by microsome in the hippocampus of rats. *Neuroscience Letters* 2004; 366:292-296.
25. Costa MS, Rocha JBT, Perosa SR, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG. Pilocarpine-induced status epilepticus increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. *Neuroscience Letters* 2004; 356:41-44.
26. Coutinho LMB, Hilbig A, Calcagnotto MA, Paglioli E, Paglioli N, Da Costa JC, Palmini A, De Paula EC. Neuropatologia das epilepsias de difícil controle. *Arq Neuropsiquiatria* 1999; 57(2B): 401-405.
27. Covolan L, Ribeiro LT. Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus* 2000; 10(2): 169-180.
28. Craig CR, Shideman DE. Metabolism and anticonvulsant properties of mephobarbital and phenobarbital in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 176: 35-42.
29. Cukiert A. Tratamento Clínico e Cirúrgico das epilepsias de difícil controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2002. p. 41-48.
30. Da Costa JC, Palmini A, Yacubian EMT, Cavalheiro EA. Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias: Aspectos Clínicos e Cirúrgicos. São Paulo: Lemos Editorial, 1998. p. 33-35.
31. Dalbem A, Silveira CV, Pedroso MF, Breda RV, Baes CVW, Bartmann, Da Costa JC. Altered distribution of striatal activity-dependent synaptic plasticity in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Research* 2005; 1047(2): 148-158.
32. Derrick BE, York AD, Martinez. Increased granule cell neurogenesis in the adult dentate gyrus following mossy fiber stimulation induce long-term potentiation. *Brain Res* 2000; 857:300-307.
33. D'Hooge R, Deyn PP. Applications of the Morris Water Maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 2001; 36:60-90.
34. Drane DL, Meador KJ. Cognitive and behavioral effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy & Behavior* 2002; 3:49-53.
35. Dudai Y. Some basic notions and their ontogenesis. In: *The neurobiology of memory: concepts, findings, trends*. New York: oxford UP 1989; Chap1: pp 3-18.

36. Elger CE, Helmstaedter C, Kurthen M. Chronic epilepsy and cognition. *The Lancet Neurology* 2004; 3:663-672.
37. Engelberts NH, Klein M, Poeg HMV, Heimans JJ, Jolles J, Kasteleijn-Nolst Trenite DG. Cognition and health-related quality of life in chronic well-controlled patients with partial epilepsy on carbamazepine monotherapy. *Epilepsy Behav* 2002; 3(4): 316-321.
38. Farghali-Hassan H, Assael BM, Bossi L, Garattini S, Gerna M, Gomeni R, Morselli PL. Carbamazepine pharmacokinetics in young, adult and pregnant rats. Relation to pharmacological effects. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1976; 220: 125-139.
39. Frison TB, Janisch C, Venturin G, Schmidt N, Simão F, Callegari-Jacques SM, Furtado MM, Garcia-Cairasco N, Da Costa JC (2005) Is long-term potentiation affected by chronicity of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine?, *Cognitive Brain Research* 2005, in press.
40. Gastaut H. Letter: Epileptic seizures. *Dev Med Child Neurol* 1973; 15(5):688-689.
41. Guerreiro AM, Guerreiro MM. *Epilepsia*. Lemos Editorial, 1993.
42. Hendriks MPH, Aldenkamp AP, Alpherts WCJ, Ellis J, Vermeeulen J, Vlugt HV. Relationships between epilepsy-related factors and memory impairment. *Acta Neurol Scand* 2004; 110-291.
43. Herron CE, Williamson R, Collingridge GL. A selective n-methyl-D-aspartate antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1985; 61: 255-260.
44. Holmes GL; Garisa JL; Chevassus-Au-Louis N, Ben-Ari, Y. Consequences of neonatal seizures in rat: morphological and behavioral effects. *Ann Neurol* 1998; 44(6): 845-857.
45. Isokawa M, Levesque MF, Babb TL, Engel J. Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 1993; 13:1511-1522.
46. Ito M. Long-term depression. *Annu Rev Neurosci* 1989; 12: 85-102.
47. Izquierdo I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. *Drug Dev Res* 1993; 30:1-17.

48. Izquierdo I, Medina JH. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology memory. *Neurobiol Learning Memory* 1995; 63:18-32.
49. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH (1998a) Mechanisms for memory types differ. *Nature* 18; 393:635-636.
50. Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Madruga M, Medina JH (1998b) Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol* 9:421-427.
51. Izquierdo I. *Memória*. Artmed Editora S.A., 2002.
52. Janish C. O efeito da epilepsia e dos fármacos antiepilépticos na potenciação de longa duração hipocampal. Dissertação de Mestrado em Neurociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
53. Lampe H, Bigalke H. Carbamazepine blocks NMDA-activated currents in cultures spinal cord. *Neuroreport* 1990; 1: 26-28.
54. Lee GY, Brown LM, Teyler TJ. The Effects of Anticonvulsant Drugs on Long-Term Potentiation (LTP) in Rat Hippocampus. *Brain Research Bulletin* 1996; 39(1): 39-42.
55. Leite JP, Cavalheiro EA. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Research* 1995; 20: 93-104.
56. Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Research* 2002; 50:93-103.
57. Leite JP, Neder L, Arisi GM, Carlotti CG, Assirati JA, Moreira JE. Plasticity, Synaptic Strength, and Epilepsy: What Can We Learn from Ultrastructural Data? *Epilepsia* 2005; 46(5): 134-141.
58. Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late developmental of epilepsy in rats. *Exp Brain Res* 1995; 102:423-428.
59. Lemos T, Cavalheiro EA. Status epilepticus and the late developmental of spontaneous seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research* 1996; 12:137-144.

60. Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS. *Antiepileptic Drugs*. Raven Press. New York, 1995, p51-58, 359-367, 515-522.
61. Longo BM, Mello LEAM. Blockade of pilocarpine or kainate-induced mossy fiber sprouting by cicloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. *Neuroscience Letters* 1997; 226:163-166.
62. Longo BM, Sanabria ERG, Gabriel S, Mello LEAM. Electrophysiologic abnormalities of the hippocampus in the pilocarpine/cicloheximide model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsia* 2002; 43(5):203-208.
63. Longo B, Covolan L, Chadi G, Mello LEAM. Sprouting of mossy fibers and the vacating of postsynaptic targets in the inner molecular layer of the dentate gyrus. *Experimental Neurology* 2003; 181:57-67.
64. Loring DW, Meador KJ. Cognitive and behavioral effects of epilepsy treatment. *Epilepsia* 2001; 42 (8): 24-32.
65. Lynch M, Sayin U, Bownds J, Janumpalli S, Sutula T. Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. *Eur J Neurosci*. 2000; 12(7): 2252-64.
66. Macdonald RL. Antiepileptic drug actions. *Epilepsia* 1989; 30(1): 19-28.
67. McGaugh JL. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 2002; 25:456.
68. Majak K, Pitkanen A. Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. *Epilepsy & Behavior* 2004; 5:35-44.
69. Malenka RC. Synaptic plasticity in the hippocampus LTP and LTD. *Cell* 1994; 78: 535-538.
70. Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – a decade of progress. *Science* 1999; 285: 1870-1874.
71. Marrone DF, Petit TL. The role of synaptic morphology in neural plasticity: structural interactions underlying synaptic power. *Brain Research Reviews* 2002; 38: 291-308.
72. McEachern JC, Shaw CA. An alternative to the LTP orthodoxy: a plasticity-pathology continuum model. *Brain Res Rev* 1996; 22: 51-92.
73. McBride MC, Rosman NP, Davidson SJ, Oppenheimer EY. Long-term behavioral effects of Phenobarbital in suckling rats. *Exp Neurol* 1985; 89: 59-70.

74. McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris Water Maze. *Brain Res Rev* 1993; 18:33-49.
75. Medina JH, Izquierdo I. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Research Reviews* 1995; 21:185-194.
76. Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res* 1999; 36:189-204.
77. Mikaki MA; Holmes GL; Lui Z, Gatt A, Werner SJ. Long-term behavioral deficits following pilocarpine seizures in immature rats. *Epilepsy Res* 1994; 19: 191-204.
78. Mikati MA, Holmes GL, Chronopoulos A, Hyde P, Thurber S, Gatt A, Liu Z, Werner S, Stafstrom CE. Phenobarbital modifies seizures-related brain injury in the developing brain. *Annals of Neurology* 1994; 36(3): 425-433.
79. Mondadori C, Classen W. The effects of various antiepileptic drugs on E-shock-induced amnesia in mice: dissociability of effects on convulsions and effects on memory. *Acta Neurol Scand* 1984; 99: 125-129.
80. Montamedi GK, Meador KJ. Antiepileptic drugs and memory. *Epilepsy & Behavior* 2004; 5:435-439.
81. Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981; 12:239-260.
82. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297: 681-683.
83. Morris R. Developmental of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11:47-60.
84. Nadel L, Eichenbaum H. Introduction to the special issue on place cells. *Hippocampus* 1999; 9:341-345.
85. Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo M, Kato K. Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 2000; 408: 584-88.
86. Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnianian S. Epileptogenic insult causes a shift in the form of long-term potentiation expression. *Neuroscience* 2005; 134: 415-423.
87. Pellock JM. Treatment considerations: traditional antiepileptic drugs. *Epilepsy & Behavior* 2002; 3:18-23.

88. Pitkanen A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis. *Neurology* 2002; 59 (5):27-32.
89. Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *The Lancet Neurology* 2002; 1:173-181.
90. Portuguese MW. Avaliação Pré-Cirúrgica do Lobo Temporal: Linguagem e Memória. In: Da Costa, J.C; Palmira, A; Yacubian, EM Cavalheiro, E. A. (org.) *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos*. São Paulo: Lemos Editorial; 1998: p. 939-956.
91. Pouzet B, Zhang W, Feldon J, Rawlins JNP. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behavioral Brain Research* 2002; 133:279-291.
92. Priel MR, Santos NF, Cavalheiro EA. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research* 1996; 26:115-121.
93. Klitgaard H, Matagne A. Pilocarpine-induced epileptogenesis in the rat: impact of initial duration of status epilepticus on electrophysiological and neuropathological alterations. *Epilepsy Research* 2002; 51(1-2): 93-107.
94. Kotloski R, Lynch M, Lauersdorfs, Sutula T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. *Prog Brain Res* 2002; 135:95-110.
95. Kuba K, Kumamoto E. Long-term potentiation in vertebrate synapse: a variety of cascades with common subprocesses. *Prog Neurobiol* 1990; 34: 197-269.
96. Kubota T, Jibiki I, Fukushima T, Kurokawa K, Yamaguchi N. Carbamazepine-induced blockade of induction of long-term potentiation in the perforant path-dentate gyrus pathway in chronically prepared rabbits. *Neuroscience Letter* 1994; 170(1): 171-174.
97. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizure. *Eletroenceph Clin Neurophysiol* 1972; 32: 281-294.
98. Ramírez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21(18): 7340-7348.
99. Reid IC, Stewart CA. Seizures, memory and plasticity. *Seizures* 1997; 6(5): 351-359.

100. Riva D, Devoti M. Carbamazepine withdrawal in children with previous symptomatic partial epilepsy: effects on neuropsychologic function. *J Child Neurol* 1999, 14(6): 357-362.
100. Rogawiski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol. Rev* 1990; 42:223-286.
101. Rogawiski MA, Loscher W. The Neurobiology of Antiepileptic Drugs. *Nature Neuroscience Reviews* 2004; 5: 553-564.
101. Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TVP, Stewart MG. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience* 1997; 80:69-77.
102. Salamoni SD, Da Costa JC, Palma MS, Komo K, Nihei K, Tavares AA, Abreu DS, Venturin GT, Cunha FB, Oliveira RM, Breda RV. Antiepileptic effect of acylpolyaminetoxin JSTX-3 on rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Brain Research* 2005; 1048(1-2): 170-176.
103. Shannon HE, Love PL. Effects of antiepileptic drugs on working memory as assessed by spatial alteration performance in rats. *Epilepsy & Behavior* 2004; 5: 857-865.
104. Sarihi A; Fathollahi Y; Montamedi F; Naghdi N; pour AR. Effects of lidocaine inactivation of the median raphe nucleus on long term potentiation and recurrent inhibition in the dentate gyrus of rat hippocampus. *Brain Res* 2003; 962:159-168.
105. Schmid R, Tandon P; Stafstrom CE, Holmes GL. Effects of neonatal seizures on subsequent seizure-induced brain injury. *Neurology* 1999; 53(8): 1754-1761.
106. Shorvon. Status Epilepticus – Its clinical features and treatment in children and adults. Cambridge University Press, 1994.
107. Squire LR, Kandel ER. Memória da mente às moléculas. Trad Dalmaz C e Quillfeldt JA. Porto Alegre. Editora Artmed, 2003.
108. Steele PM, Mauk MD. Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *J Neurophysiol* 1999; 81: 1559-66
109. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 1985; 5:1016-1022.

110. Teyler TJ, Discenna P. Long-term potentiation as a candidate mnemonic device. *Brain Res Rev* 1984; 7: 15-28.
111. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983; 9: 315-335.
112. Turski L, Ikonomidou C, Turski ZA, Cavalheiro EA. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* 1989; 3(2): 154-171.
113. Wieser HG. Selective Amigdalo-Hipocampectomy for Temporal Epilepsy. *Epilepsia* 2000; 29(2): 100-113.
114. Williams PA, Wuarin J, Dou P, Ferraro DJ, Dudek FE. Reassessment of the effects of cycloheximide on mossy fiber sprouting and epileptogenesis in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 2002; 88:2075-2087.
115. Woolf NJ. A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol* 1998; 55: 59-77.
116. Wu CL, Huang LT, Liou CW, Wang TJ, Tung YR, Hsu Hy, Lai MC. Lithium-pilocarpine induced status epilepticus in immature rats result in long-term deficits in spatial learning and hippocampal cells loss. *Neuroscience Letter* 2001; 312(2): 113-117.
117. Yacubian EMT. Tratamento medicamentos das Epilepsias. Lemos Editorial, 2004.
118. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. *Fundamental Neuroscience*. San Diego. Academic Press, 1999.
119. Zona C, Tancredo V, Palma E, Pirrone GC, Avoli M. Potassium currents in rat cortical neurons in cultura are enhanced by the antiepileptic drug carbamazepine. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68(4): 545-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)