

INDUÇÃO DE ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS EM FATIAS
DO HIPOCAMPO DE ANIMAIS KINDELIZADOS COM PENTILENOTETRAZOL

Aline Gisele Batista

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTIDISCIPLINAR EM FÍSICA, QUÍMICA E
NEUROCIÊNCIA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM NEUROFÍSICA.

Aprovada por:

Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
(Presidente)

Prof. Dr. Fulvio Alexandre Scorza

Prof. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros

SÃO JOÃO DEL-REI, MG - BRASIL

ABRIL DE 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

BATISTA, ALINE GISELE

Indução de Atividades Epileptiformes
Não-Sinápticas em Fatias do Hipocampo de
Animais Kindelizados com Pentilenotetrazol.
[MG] 2008

XXVII, 80 p. 29,7 cm (FIQUINE/UFSJ,
M. Sc., Neurofísica, 2008)

Dissertação - Universidade Federal de São
João del-Rei

1.Epilepsia 2.Kindling 3.Pentilenotetrazol
4.Atividades não-sinápticas 5.Giro Denteado

I. FIQUINE/UFSJ II. Título (série)

Aos meus Pais, João Monteiro Batista e Maria Imaculada Magalhães Batista. Pelo incentivo e apoio em todos os momentos dessa trajetória. Que a concretização desse trabalho seja motivo de orgulho em suas vidas.

Ao meu querido Leonardo Luiz Pereira, por todo carinho e companheirismo.

E, principalmente, a Deus pela força e presença marcante em todos os dias de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antônio Carlos Guimarães de Almeida, pela oportunidade de desenvolver esse projeto e pela fundamental orientação em todas as etapas do trabalho.

Aos professores Mário Antônio Duarte, Hewerson Zansávio Teixeira, Antônio Márcio Rodrigues, Gilcélcio Amaral da Silveira e Emerson Zumpichiatti Arruda, por todo apoio e disponibilidade para resolver problemas eminentes na execução do projeto.

À Lucélia, pelo auxílio inestimável durante a realização dos experimentos iniciais e durante todo o período em que estive no LANEK.

Aos estagiários Marcos Alexandre e Karla, por toda dedicação e responsabilidade ao desenvolver as atividades de apoio do projeto.

Aos colegas do laboratório Gláucio, Luiz, Maisinha, Rafaela e Bruno, pela colaboração na discussão dos resultados experimentais e de artigos relacionados.

Aos meus queridos irmãos Patrícia, Diego, Diogo e Camila, por todo carinho, incentivo e presença em minha vida.

Aos meus avós maternos e paternos, que muito influenciaram para alcançar os objetivos desse trabalho, em especial, à avó materna Rita Elói Moreira pelo incentivo e por todo amor.

Aos meus amigos Amanda, Alexandra, Dilene, Valdercy e Fernanda, pelo incentivo e apoio para a concretização desse trabalho.

À turma do LANEK: Mozar, Kelisson, Keite, Gisele, Bibiana, Júlio, Mariana, Natália, Marcão, Ester, Simone e Dalva. Um carinho especial por todos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo indispensável auxílio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à FIQUINE/UFSJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M. Sc.)

INDUÇÃO DE ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS EM FATIAS DO HIPOCAMPO DE ANIMAIS KINDELIZADOS COM PENTILENOTETRAZOL

Aline Gisele Batista
Abril/2008

Orientador: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Co-orientador: Mário Antônio Duarte

Programa: FIQUINE

Departamento: Engenharia Biomédica

O kindling é um dos principais modelos usados para indução de crises epiléticas. As variações provocadas por esse modelo no sistema de neurotransmissão do cérebro de animais são semelhantes às que ocorrem em epilepsia da região lobo temporal. A maioria das pesquisas tem associado os efeitos do kindling apenas à atuação de mecanismos sinápticos. Considerando que as conexões não-sinápticas são suficientes para a geração e sustentação das atividades epileptiformes (AE's) e que a região hipocampal, particularmente o giro denteado (GD), apresenta susceptibilidade a indução de atividades em condições de bloqueio das conexões sinápticas, o objetivo desse trabalho foi identificar os efeitos do processo de kindelização química de ratos por PTZ sobre a indução de AE's não-sinápticas nessa região. Assim, fatias do hipocampo de ratos *Wistar* controle e kindelizados, utilizando concentrações de 40 e 45mg/kg de PTZ, foram submetidas à indução de AE's não-sinápticas, registro do potencial elétrico (PE) extracelular e à análise histológica. Foi verificado que o kindling com PTZ promove lesões, com características de processos inflamatórios, que favorecem a excitabilidade neuronal e as conexões não-sinápticas, contribuindo para a sustentação das crises epiléticas. Os resultados sugerem que o aumento da excitabilidade neuronal induzido pela aplicação do PTZ está relacionado a variações na concentração de cloreto intracelular e reforçam efetividade da utilização de drogas com ação bloqueadora de cotransportadores desse íon no tratamento das epilepsias.

Abstract of Dissertation presented to FIQUINE/UFSJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITY INDUCED IN HIPPOCAMPAL
SLICES OF PENTYLENETETRAZOL-KINDLED RATS

Aline Gisele Batista
April/2008

Advisor: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Co-Advisor: Mário Antônio Duarte

Program: FIQUINE

Department: Biomedical Engineering

The kindling is one of the main models used for induction of epileptic crises. The variations caused by this model in the brain neurotransmission system are similar to the ones that happen in epilepsy of the temporal lobe area. Most of the researches have associated the kindling effects just to the action of synaptic mechanisms. Considering that the non-synaptic connections are enough for the generation and the support of the epileptiform activities (EA's) and that the hippocampal area, particularly the dentate girus (DG), presents susceptibility to the induction of activities in conditions of blockade of the synaptic connections, the aim of this work was to identify the effects of the chemical kindleling process of rats for PTZ over the induction of non-synaptic EA's in this area. In this way, hippocampus slices of control and kindled Wistar rats, using concentrations of 40 and 45 mg/kg of PTZ, were submitted to the induction of non-synaptic EA's, register of the extracellular potential (EP) and to the histology analysis. It was verified that the kindling with PTZ promotes lesions, with characteristics of inflammatory processes that favor the neuronal excitability and the non-synaptic connections, contributing to sustain epileptic crises. The results suggest that the increase of the neuronal excitability induced by the application of PTZ is related with variations in the intracellular chloride concentration and reinforce the effectiveness of the use of drugs with blocking action of cotransporters of this ion in the treatment of the epilepsies.

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO DE LITERATURA	3
II.1 - <i>Epilepsia</i>	3
II.1.1 - Classificação das Crises Epilépticas	5
II.1.2 - Atividades Epileptiformes	6
II.2 - <i>Plasticidade Neuronal</i>	12
II.3 - <i>Modelos Animais de Indução de AE's</i>	14
II.3.1 - Modelo Kindling	15
II.4 - <i>Sistemas de Neurotransmissão</i>	22
II.4.1 - Sistemas de Neurotransmissão Sináptica e Kindling	22
II.4.2 - Sistemas de Neurotransmissão Não-Sináptica e Kindling	26
III - MATERIAIS E MÉTODOS	28
III.1 - <i>Procedimentos Experimentais para Indução do Kindling</i>	28
III.2 - <i>Procedimentos Experimentais para Registro do PE</i>	29
III.2.1 - Isolamento do Hipocampo e Obtenção das Fatias	29
III.2.2 - Equipamentos Utilizados para Indução das AE's	33
III.3 - <i>Sistemas de Medição, Aquisição e Visualização</i>	37
III.4 - <i>Procedimentos Experimentais para Análise Histoquímica</i>	39
III.4.1 - Preparação das Fatias	39
III.4.2 - Coloração das Fatias	41
III.4.3 - Quantificação Neuronal	42
III.5 - <i>Análise Quantitativa dos Parâmetros do PE</i>	46
III.5.1- Análise Quantitativa do Parâmetro DC	47
III.5.2 - Análise Quantitativa dos Parâmetros PS e Amax	48
III.5.3 - Análise Quantitativa do Parâmetro DE	48
III.5.4- Análise Quantitativa do Parâmetro IE	49
IV - RESULTADOS	50
IV.1 - <i>Processo de Kindelização com PTZ</i>	50
IV.2 - <i>Parâmetros do PE</i>	51
IV.3 - <i>Histoquímica</i>	56
IV.3.1 - Análise Qualitativa	56
IV.3.2 - Cálculo da Densidade Celular	59
V - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	62
VI - CONCLUSÃO	67
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
α	Fração de volume do espaço extracelular
$[\text{íon}]_o$	Concentração do íon no meio extracelular
Amax	Amplitude máxima dos populations spike
CA	Corno Ammon
CE	Córtex entorrinal
CG	Camada granular
DC	Componente DC
DE	Duração do evento
E_{cl}	Potencial de Nernst para o cloreto
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GD	Giro denteado
H	Hilus
IE	Intervalo entre eventos
IOS	Sinal óptico intrínseco
IP	Infra-piramidal
LANEC	Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional
LT	Latência
LTP	Potencialização de longo prazo
PE	Potencial elétrico

Símbolo	Descrição
PS	Population Spikes
SAE	Sistema auxiliar de experimentos
SP	Supra-piramidal
Sub	Subículo
UFSJ	Universidade Federal de São João del-Rei
V_m	Potencial de membrana

I - INTRODUÇÃO

Ao fazer um levantamento sobre o desenvolvimento das pesquisas na área de doenças neuronais é importante ressaltar o grande avanço que ocorreu a partir do momento em que os modelos animais passaram a ser utilizados. Esses modelos favoreceram principalmente o estudo dos mecanismos de desenvolvimento das epilepsias, por meio da indução de crises epiléticas, que frequentemente provocam variações funcionais e celulares similares às variações observadas em epilepsia da região lobo temporal.

Entre os principais modelos de indução de crises epiléticas em animais está o modelo kindling, que é realizado por meio de repetidas sessões de estímulos de forma a induzir o surgimento e intensificação progressiva das atividades convulsivantes à medida que novas estimulações são realizadas. Esse modelo tem sido frequentemente usado para induzir alterações neuroplásticas nos sistemas de neurotransmissão dos animais, favorecendo um análogo às variações provocadas pelas crises em epilepsia humana.

O aumento da excitabilidade neuronal em condições de kindling tem sido justificado, em diversos trabalhos, por mecanismos que aumentam a excitabilidade celular e/ou reduzem a força de inibição GABAérgica em neurônios, não existindo relatos a respeito dos efeitos do kindling em condições de bloqueio das conexões sinápticas. Para verificar se existe relação entre os dois mecanismos mencionados, este trabalho fundamentou-se em estudar os efeitos do kindling químico, induzido por pentilenotetrazol (PTZ), sobre a região do giro denteado (GD) do hipocampo de animais durante indução de epilepsia sustentada por mecanismos não-sinápticos e em caracterizar a morfologia do tecido por meio de histoquímica.

No capítulo II, referente à revisão da literatura, são abordadas definições, etiologias, características e classificações de crises relacionadas às epilepsias. Faz-se um breve histórico da indução de atividades epileptiformes (AE's), com descrição das interações neuronais realizadas por meio de bloqueio das conexões sinápticas, apresentação da estrutura morfofuncional do hipocampo (propícia à indução de AE's não-sinápticas) e um breve relato a respeito da relação entre o espaço extracelular (EEC) e os mecanismos envolvidos na sustentação das AE's. O capítulo também

apresenta uma descrição do fenômeno de neuroplasticidade e das características de alguns modelos animais de indução AE's, com ênfase ao modelo kindling. São levantadas definições importantes, resultados de pesquisas na área, relações do kindling com a LTP, características e diferenças dos modelos de kindelização elétrico e químico e uma descrição mais específica sobre a realização do kindling químico com PTZ. Finalmente, é feita uma abordagem sobre os sistemas de neurotransmissão sinápticos e não-sinápticos envolvidos no kindling.

No capítulo III, são apresentados, em detalhes, os procedimentos experimentais para a indução do kindling químico com PTZ e toda a técnica utilizada para indução de AE's não-sinápticas. Em seguida são relatados os métodos de registro do potencial elétrico (PE) extracelular no GD do hipocampo dos modelos experimentais. São apresentados, também, os procedimentos para análise histológica das fatias, do PE e para execução da quantificação neuronal empregada durante a análise histoquímica.

Os resultados do trabalho são apresentados no capítulo IV, permitindo uma comparação dos parâmetros do PE dos grupos com as respectivas análises histológicas das próprias fatias utilizadas no registro do PE.

Os resultados são discutidos no capítulo V. São apresentadas características específicas observadas no kindling realizado com PTZ e são propostos mecanismos fisiológicos possivelmente envolvidos durante a indução de AE's não-sinápticas em animais kindelizados.

Por fim, no capítulo VI são apresentadas as conclusões e algumas propostas para continuação do trabalho.

II - REVISÃO DE LITERATURA

II.1 - Epilepsia

As epilepsias estão entre as mais sérias desordens cerebrais comuns, ocorrendo em todas as idades com diversas formas de apresentações e causas (DUNCAN, et al., 2006). Clinicamente são caracterizadas por crises espontâneas e recorrentes, convulsivas ou não-convulsivas, causadas por sincronizações parciais ou generalizadas da atividade elétrica cerebral. Como já comprovado em diversos trabalhos, pode-se dizer que as crises manifestadas por pacientes com algum tipo de epilepsia, são induzidas por meio do aumento da excitabilidade e do acoplamento mútuo neuronal, os quais, por sua vez, estão relacionados à neurotransmissão do SNC.

Segundo ENGEL (1989), as crises epiléticas são reconhecidas por sintomas ou manifestações clínicas de excessivo sincronismo, caracterizadas por uma atividade anormal de neurônios do córtex cerebral. Essas anormalidades na neurotransmissão frequentemente ocorrem por meio de um aumento na transmissão excitatória, diminuição na transmissão inibitória ou de ambos os eventos (MELDRUM, 1984).

As comorbidades provocadas por crises epiléticas estão associadas a uma complexa mistura de alterações psicopatológicas. Variações de humor com predominância de depressão, episódios de irritabilidade, psicoses, alucinações e ansiedade são sintomas proeminentes da desordem neurocomportamental em epilepsias, sendo os sintomas de ansiedade e depressão significativamente mais altos do que na população geral (OLIVEIRA et al., 2007). Alguns trabalhos sugerem uma relação entre lesões epileptogênicas no sistema límbico, especialmente no lobo temporal mesial e o surgimento de distúrbios comportamentais interictais (FRAZON, 2002).

As crises epiléticas podem ser originadas por diversos fatores e apresentam características específicas que dependem da região do cérebro acometida. De acordo com a Associação Brasileira de Epilepsia (www.abe.org.br), as epilepsias podem ser desencadeadas por diversos fatores incluindo lesões no cérebro, decorrente de uma forte pancada na cabeça, infecção (meningite, por exemplo), neurocisticercose, abuso de bebidas alcoólicas ou drogas, problemas antes ou durante o parto, etc. Entretanto, a

maioria das epilepsias não tem necessariamente causa comum, ficando estabelecidos os termos idiopático, sintomático e criptogênico para caracterizar a etiologia das epilepsias.

As epilepsias são consideradas idiopáticas, quando são transmitidas geneticamente (não associadas a lesões cerebrais); como sintomáticas, quando as etiologias são identificadas e como criptogênicas, quando advém de etiologia não esclarecida.

Quando um paciente apresenta diferentes tipos de crises associadas a características clínicas predominantes, como padrão de recorrência das crises, origem, idade de início dos eventos epiléticos, presença ou ausência de ocorrência na família, padrões eletroencefalográficos e prognóstico da doença, o paciente é classificado como portador de um tipo de síndrome epilética. A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de síndrome epilética e segundo a Liga Brasileira de Epilepsia, é caracterizada por crises parciais recorrentes, simples e complexas, acompanhadas por secundarização das crises em aproximadamente metade dos casos. Estudos têm demonstrado que crises prolongadas e crises febris focais em crianças podem produzir injúrias hipocampais agudas, que envolvem atrofia do hipocampo, podendo originar crises complexas no lobo temporal (CENDES, 2004).

A ELT se desenvolve a partir de lesões, principalmente, em estruturas mesiais tais como hipocampo, amígdala e para-hipocampo, afetando um grande número de pacientes que apresentam refratariedade ao tratamento medicamentoso. Cerca de 30% a 40% dos indivíduos que apresentam lesões focais não conseguem controlar as crises com medicamentos (DA SILVA e CAVALHEIRO, 2004). Muitos pacientes apresentam lesões que submetidas ao processo de ressecção podem eliminar as crises convulsivas em 80% dos casos (DODRILL et al., 1986). As drogas normalmente não atuam como curativas no tratamento das epilepsias, mas sim, no combate ao maior sintoma, as crises convulsivas.

Outra característica típica de pacientes com ELT é a esclerose hipocampal, caracterizada por brotamentos de sistemas axonais nas células granulares do GD e por perda neuronal nas regiões CA3, CA1 e no GD do hipocampo (PASTOR et al., 2006). No entanto, ainda existe uma grande discussão se a esclerose hipocampal é causa ou consequência da ELT.

II.1.1 - Classificação das Crises Epilépticas

Apesar da Liga Internacional Contra Epilepsia ainda não dispor de uma classificação adequada, que envolva todas as diferentes desordens causadas pelas epilepsias em agrupamentos, as crises epilépticas recebem diversos tipos de classificações com o objetivo de caracterizar melhor os sintomas desenvolvidos pelos pacientes.

A primeira forma de classificação das crises é dependente da presença ou não de um estímulo desencadeador. As crises são classificadas em “não-epilépticas”, quando provocadas num cérebro normal por tratamento de eletrochoque ou por convulsivantes químicos e em “epilépticas” quando são desencadeadas sem estímulo prévio.

Quanto à região cerebral acometida por algum tipo de epilepsia, as crises são classificadas em parciais (focais), quando se restringem a uma determinada área do tecido cortical, por meio da ativação de um dos hemisférios cerebrais; e em generalizadas, quando possuem capacidade de vincular amplas regiões do SNC, ativando os dois hemisférios cerebrais, principalmente as estruturas mesiais temporais.

As crises parciais são caracterizadas como simples quando não são acompanhadas por perda de consciência e como complexas em caso contrário. As crises parciais frequentemente duram poucos segundos ou minutos e suas manifestações clínicas estão relacionadas à região afetada. Pacientes com crises parciais apresentam frequentemente sensações intensas, movimentos incontrolláveis e distúrbios de visão ou de fala. As crises inicialmente focais podem se propagar para outras estruturas anatomicamente interconectadas tornando-se crises secundariamente generalizadas.

As crises generalizadas são denominadas primárias quando acometem o cérebro por inteiro assim que são iniciadas. Normalmente são caracterizadas por perda de consciência e/ou contrações musculares em todo corpo e são ainda classificadas em seis tipos:

- Crises de ausência: também chamadas de “pequeno-mal”, são crises que ocorrem sem recrutamento do sistema motor, ou seja, sem convulsão. Esse tipo de crise é caracterizado por sintomas como “desligamento” do paciente por menos de 30 segundos, às vezes acompanhados por movimentos mastigatórios. A recuperação é rápida e os pacientes normalmente não se lembram desses episódios.
- Crises mioclônicas: são crises caracterizadas por contrações súbitas, envolvendo extremidades ou grupos musculares. Essas crises frequentemente ocorrem em um

membro, podendo propagar-se bilateralmente e para outros membros. Os pacientes costumam deixar cair objetos das mãos durante essas crises.

- Crises tônicas: são crises caracterizadas por atividades motoras que mantêm contrações musculares sustentadas. Pacientes com esse tipo de crise apresentam súbito enrijecimento muscular e queda. Um grito costuma preceder o período em que o paciente pára de respirar. Frequentemente ocorrem mudanças na expressão facial dos pacientes, as pupilas ficam dilatadas e os olhos desviados.

- Crises clônicas: são crises que ocorrem quando os membros dos dois lados do corpo se movimentam de maneira ritmada, mantendo contrações e relaxamentos musculares alternados. Os sintomas pós-ictais são, geralmente, de curta intensidade e de curta duração.

- Crises tônico-clônicas: também chamadas de “grande-mal”, são crises que ocorrem quando uma crise inicialmente do tipo tônica passa a se manifestar como uma crise do tipo clônica.

- Crise atônica: tipo de crise iniciada com perda súbita do tônus de todos os músculos do corpo, levando a imediata queda do paciente. Nesse tipo de crise, o paciente cai flácido com sério risco de bater com o rosto em objetos próximos ou mesmo no chão. É comum o uso de capacetes para evitar ferimentos graves em pacientes com histórico desse tipo de crise.

Além das crises parciais e generalizadas, existem ainda as crises não-classificadas, que incluem todas aquelas que não podem ser classificadas devido a dados incompletos e/ou inadequados.

II.1.2 - Atividades Epileptiformes

As atividades epiléticas induzidas em modelos experimentais são chamadas de atividades epileptiformes (AE's) e têm características similares às epilepsias humanas. Devido a essas características, manobras experimentais criteriosas com estes modelos podem ser utilizadas para estudar as bases fisiológicas, bioquímicas e anatômicas das atividades epiléticas (ENGEL, 1989).

Atualmente, sabe-se que as AE's podem ser induzidas na presença ou ausência de conexões sinápticas, mas como esses modelos envolvem a manipulação de correntes iônicas transmembrânicas, até pouco tempo atrás, acreditava-se que essas atividades

poderiam ser induzidas somente na presença de conexões sinápticas. Apenas a partir dos anos 80, foi comprovada a possibilidade de induzir AE's durante o bloqueio das conexões sinápticas. Essa comprovação foi apresentada em trabalhos publicados por TAYLOR e DUDEK (1982) e por HAAS e JEFFERYS (1984).

A transmissão não-sináptica do impulso nervoso ocorre por meio da transferência de corrente iônica de uma célula para outra, utilizando-se canais (junções) que permitem que os íons do citoplasma de uma célula passem para o citoplasma de outra. Existem quatro tipos de interações neuronais realizadas por meio de conexões não-sinápticas: acoplamento eletrotônico (gap-junctions), flutuações iônicas, campo elétrico e acoplamento efáptico.

O acoplamento eletrotônico é mediado pelas gap-junctions, que são canais formados por proteínas denominadas conexinas, responsáveis pela comunicação entre células adjacentes, mantendo uma distância de aproximadamente 3,5nm entre elas. Quando ocorre um potencial de ação em uma célula, as correntes atravessam as gap-junctions e despolarizam a célula vizinha. A Figura II.1 apresenta um desenho esquemático representativo da comunicação celular via gap-junctions.

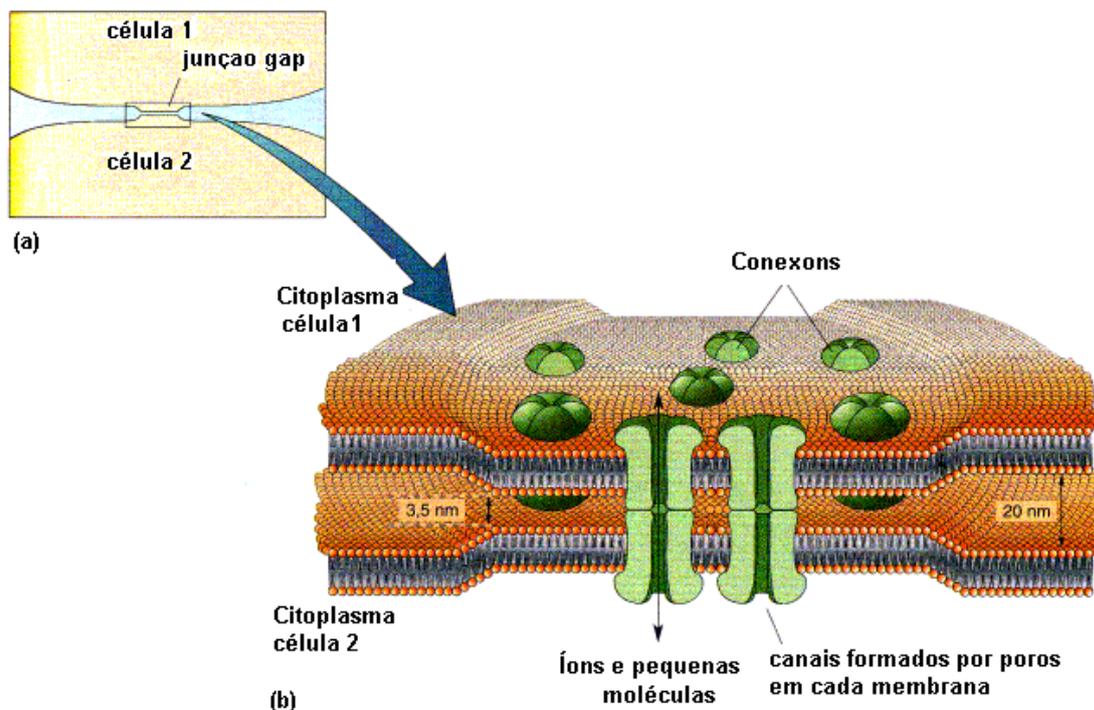


Figura II.1- Representação da comunicação entre duas células via gap-junctions. (Imagem: BEAR, M.F., CONNORS, B.W. & PARADISO, M.A. Neurociências - Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre 2ª ed, Artmed Editora, 2002).

As flutuações iônicas também assumem um papel importante na comunicação neuronal, uma vez que o funcionamento normal do cérebro depende do equilíbrio extracelular de diversos tipos de íons, como potássio, cálcio, sódio, cloreto e magnésio. Quando a célula recebe um estímulo, pode ocorrer despolarização da membrana neuronal, que faz o potencial transmembrânico se aproximar do limiar de deflagração de potenciais de ação, tornando o tecido mais excitável. A concentração extracelular de K^+ , por exemplo, tem um efeito significativo na excitabilidade neuronal, uma vez que afeta o potencial de membrana e reduz o gradiente do Cl^- , que tende a reduzir o pós-potencial de hiperpolarização neuronal. Um aumento significativo da concentração extracelular de K^+ provoca despolarização das células vizinhas e aumento da excitabilidade do tecido, desencadeando descargas neuronais espontâneas.

O efeito do campo elétrico ocorre quando correntes elétricas produzidas por atividades neuronais mudam a excitabilidade de outros neurônios vizinhos. Consequentemente, a corrente gerada por um neurônio é conduzida através do meio extracelular e atinge outros neurônios causando despolarizações em suas membranas (JEFFERYS, 1995).

Já a interação efáptica, consiste em um tipo específico de comunicação elétrica que ocorre entre neurônios vizinhos muito próximos. O fato de tanto o efeito efáptico como o efeito de campo elétrico ser mediado por correntes elétricas fluindo através do espaço extracelular (JEFFERYS, 1995), faz com que a fronteira entre esses dois tipos de interação não fique bem definida.

Os quatro tipos de comunicações não-sinápticas apresentam efeitos fisiológicos significativos em tecidos neuronais. Por esse motivo, diversas pesquisas baseadas no estudo das conexões não-sinápticas estão em andamento.

II.1.2.1 - AE's Induzidas no Hipocampo

Alguns tipos de tecido favorecem o estudo das AE's. Em 1989, ENGEL apresentou estudos que confirmaram a importância do hipocampo na geração e sustentação de crises epiléticas que abrangem todo o córtex cerebral. Consequentemente, estudos experimentais de indução de epilepsia em hipocampo de animais passaram a ser utilizados para tentar entender os mecanismos neurofisiológicos envolvidos nas epilepsias.

A formação hipocampal é dividida em quatro regiões: a *fascia dentata* ou giro denteado (dividido em lâmina infra-piramidal, lâmina supra-piramidal e ápice), o corno de Ammon (CA) ou hipocampo (dividido em CA1, CA2, CA3 e CA4), o *subiculum* (S) e o córtex entorrinal (CE) (GUEDES *et al*, 2006). Mas, na maioria dos trabalhos, as regiões do giro denteado (GD), CA e S são agrupadas e chamadas de hipocampo. A Figura II.2 representa as regiões hipocampais descritas acima.

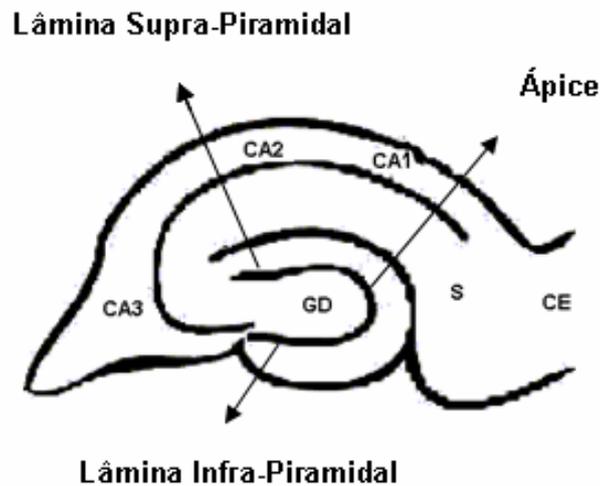


Figura II.2 - Fatia hipocampal onde podem ser identificadas as regiões CA1, CA2, CA3, S, GD (lâmina supra-piramidal, lâmina infra-piramidal e ápice) e CE. A região CA4 corresponde à região de transição entre o GD e o CA.

O CA é formado por células piramidais e o GD por células granulares. Quando os axônios das células granulares (fibras musgosas) se projetam para a região CA3, é formado o stratum lucidum.

O GD ou fascia dentata apresenta uma estrutura laminar e curva, composta por três camadas de neurônios:

- Camada granular, que apresenta um denso empacotamento de corpos celulares com curtos dendritos próximos ao pericário e potencial transmembrânico de repouso mais negativo de - 65 mV (PAN e STRINGER, 1996);
- Camada hiliar ou hilus, composta por neurônios polimórficos como os interneurônios que liberam GABA e neuropeptídeos e por células musgosas, que liberam glutamato (SORIANO e FROTSCHER, 1994);

- Camada molecular, que é composta por pericários neuronais, e principalmente por fibras e terminais dendríticos.

Na Figura II.3 está representada uma fatia hipocampal, onde podem ser identificados os tipos de células característicos das subdivisões do hipocampo.

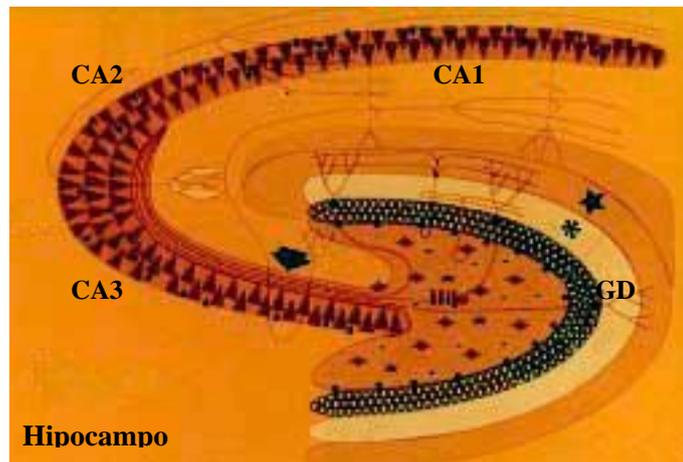


Figura II.3 - As regiões CA1, CA2 e CA3 apresentam neurônios piramidais que estão representados por triângulos. O stratum lucidum, que corresponde a projeções de axônios das células granulares para a região CA3, está indicado pela seta. A região do GD apresenta 3 camadas formadas por células granulares de formato arredondado: a camada granular (indicada pelo fundo preto); a camada molecular mais interna, representada por uma cor mais clara e indicada na figura por um asterisco; a camada molecular mais externa, representada por uma cor mais escura e indicada na figura por uma estrela; e a região do hilus, envolta pela camada granular (LEITE e TERRA-BUSTAMANTE, 1999).

Como a estrutura estratificada do hipocampo exhibe camadas e corpos celulares com denso empacotamento de células neuronais nas regiões do CA e no GD, o acoplamento mútuo pode ser estabelecido nessas regiões por meio das conexões não-sinápticas.

O GD do hipocampo, sob as condições de alto nível de concentração extracelular de K^+ e baixa concentração de Ca^{2+} , exhibe AE's espontâneas e prolongadas de grande amplitude (PAN e STRINGER, 1996; XION e STRINGER, 2000; CARVALHO, 2003). A reduzida concentração de Ca^{2+} bloqueia as atividades sinápticas, incluindo as sinapses inibitórias, favorecendo a excitabilidade, que associada ao alto nível de K^+

extracelular, aumenta ainda mais a excitabilidade do tecido celular, permitindo assim o surgimento de descargas neuronais espontâneas.

As AE's típicas da supressão de conexões sinápticas são caracterizadas por uma salva de espículas, formadas pelo disparo simultâneo de potenciais de ação, denominadas "population spikes" (PS), superpostas a um deslocamento negativo da linha de base. É comum o emprego do termo inglês "bursts" para esse tipo de evento com salvas de PS's. Assim, a expressão "bursts não-sinápticos" é empregada para eventos oriundos da supressão de Ca^{2+} extracelular.

II.1.2.2 - AE's e o Espaço Extracelular

O espaço extracelular (EEC), considerado um importante canal de comunicação entre neurônios e entre os neurônios e as células gliais (NICHOLSON, 1979; NICHOLSON e RICE, 1991; SYKOVÁ, 1992; SYKOVÁ, 1991), também apresenta um importante papel na excitabilidade neuronal, promovendo alterações na transmissão de informações do tecido nervoso.

NICHOLSON e PHILIPS (1981), utilizando o método de iontoforese, mostraram que os valores absolutos do volume do EEC diminuem com mudanças na geometria do espaço extracelular. Esse método determinou que a fração do volume do EEC (α) é igual ao volume do EEC dividido pelo volume total do tecido e que a tortuosidade do tecido (λ) corresponde ao aumento da sinuosidade do curso das partículas, por difusão, entre dois pontos do espaço extracelular.

Foi constatado em trabalhos de VORISEK e SYKOVA (1997) que a fração do volume do EEC é maior nos primeiros dias pós-natal, devido à incompleta migração neuronal, gliogêneses, angiogênese e à presença de muitos proteoglicans na matrix extracelular. Considerando essa idéia, é possível prever que mudanças relativas na fração do volume do EEC, durante o desenvolvimento cerebral, promovam interferências significativas na diluição das diversas substâncias e íons no tecido nervoso.

Quando a fração de volume do EEC é diminuída, qualquer substância presente ou desligada para o EEC sofre um correspondente aumento em sua concentração (PHILLIPS e NICHOLSON, 1979; RICE e NICHOLSON, 1987). Dessa forma, o

aumento da fração de volume do EEC provoca um efeito drástico na diluição de substâncias liberadas pelas células.

A sincronização neuronal e as AE's nas fatias do hipocampo são promovidas pelo aumento da concentração de K^+ extracelular, com isso o reduzido EEC promove aumento da concentração de K^+ em animais adultos e aumenta a sincronização neuronal (TRAYNELIS e DINGLEDINE, 1989; CARVALHO, 2003).

A restrição EEC, como resultado da atividade neuronal ou de estados patológicos no SNC, tem sido descrita como importante para a transmissão sináptica e para comunicação intercelular.

II.2 - Plasticidade Neuronal

A plasticidade neuronal foi considerada por muito tempo como uma propriedade das células neurais, associada ao estabelecimento de conexões e formação de circuitos neurais durante o período de desenvolvimento. Essa idéia foi alterada a partir da divulgação dos trabalhos de STEWARD, COTMAN e LYNCH (1974), que mostraram que neurônios adultos, privados de suas conexões sinápticas, podiam, em alguns casos, ser reinervados por sistemas aferentes próximos, com o brotamento de novas conexões.

Com o passar do tempo, diversos trabalhos conseguiram mostrar que as formas de organização que ocorrem no cérebro maduro podem estar relacionadas a modificações na estrutura de glias e neurônios, morte celular, reorganização sináptica e modificação da expressão gênica. Atualmente, para explicar a recuperação das funções após uma injúria cerebral, neurologistas levantam conceitos de reorganização funcional ou substituição funcional do sistema nervoso central (Ramirez et al., 1996; Sabel et al., 1997). Estudos indicam que neurônios sobreviventes a um insulto no SNC apresentam um processo de brotamento de sistemas axonais denominado sprouting, que é possivelmente o responsável pela reorganização funcional das atividades locais.

Os axônios de células granulares são chamados fibras musgosas e normalmente não são encontrados na camada molecular interna, onde os dendritos de células granulares estão presentes. Morfologicamente, o brotamento de fibras musgosas é caracterizado pela reorganização dos axônios das células granulares para dentro da camada molecular do GD (Sutula et al., 1989). Como os terminais sinápticos dessas

fibras apresentam uma elevada concentração de zinco, o brotamento das fibras musgosas pode ser facilmente identificado por meio da técnica de neo-Timm.

Na Figura II.4, representa-se um hipocampo com esclerose hipocampal, onde pode ser visto o sprouting formado após algum tipo de trauma.

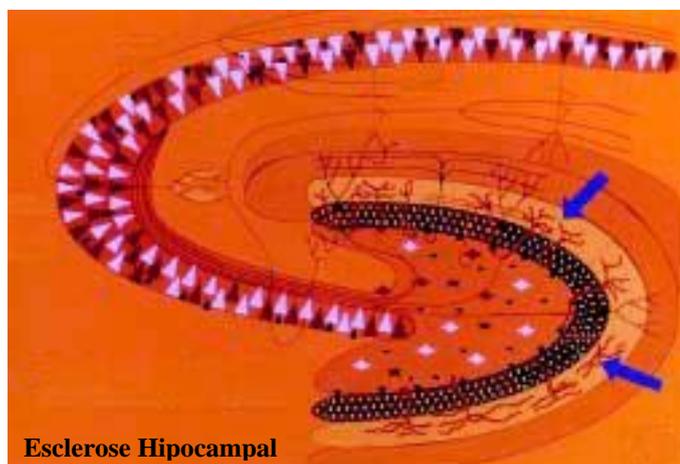


Figura II.4 - Representação esquemática de um hipocampo com esclerose hipocampal. As figuras em branco representam a perda de neurônios piramidais e hiliares. Como pode ser visto não há perda significativa de neurônios na camada granular, ocorrendo, no entanto, uma proliferação de colaterais axônicas (sprouting), provenientes de neurônios granulares que se projetam principalmente para a camada molecular interna, indicadas pelas setas azuis (LEITE e TERRA-BUSTAMANTE, 1999).

Trabalhos recentes demonstraram uma grande coincidência entre o surgimento do brotamento e o aparecimento de crises epiléticas tanto em epilepsias humanas quanto em modelos experimentais de ELT (SUTULA et al., 1988; SUTULA et al., 1989; SLOVITER, 2006). No entanto, o sprouting não aparece associado à neurodegeneração, ocorrendo também em condições de estimulação que não induzem crises epiléticas (HASSAN, 2000).

Estudos anatômicos e fisiológicos, realizados utilizando um inibidor de síntese protéica (ciclohexamida - CHX) para bloquear o brotamento de fibras musgosas, conseguiram comprovar que o sprouting não está relacionado ao desenvolvimento das crises epiléticas. A presença ou ausência do brotamento é indiferente à ocorrência de crises (LONGO e MELLO, 1997). Por outro lado, pesquisas sobre a formação

hipocampal têm indicado que alguns tipos de brotamento anormais podem contribuir para a ocorrência de crises epiléticas (SUTULA et al., 1989; DUDEK et al., 2003).

É possível perceber que os fenômenos envolvidos no processo de modificação tanto fisiológica quanto patológica da circuitaria cerebral ainda são pouco compreendidos. Além da idade, outros fatores como a intensidade do estímulo, o tipo de agressão ou ainda o tipo de região lesionada, parecem contribuir para a ocorrência em maior ou menor grau desse fenômeno.

II.3 - Modelos Animais de Indução de AE's

O uso de modelos animais de indução de AE's permitiu aos pesquisadores controlar variáveis como uniformidade genética, idade, circuitos que podem gerar crises epiléticas, características dos insultos que podem gerar epilepsia, o tempo entre as crises epiléticas, além das alterações funcionais e estruturais relacionados ao cérebro acometido por crises epiléticas (GUEDES *et al*, 2006).

Os modelos animais de indução de AE's são classificados em agudos ou crônicos. Os modelos agudos envolvem administração ou aplicação momentânea de substâncias convulsivas ou estímulos súbitos, que produzem AE's transitórias. Estes modelos são apropriados para a investigação de mecanismos de geração e sustentação das descargas epileptiformes. Já os modelos crônicos demonstram anormalidades epileptiformes persistentes e podem ser induzidos por meio de lesões estruturais permanentes e estimulação elétrica repetitiva do cérebro, ou podem ocorrer espontaneamente em animais geneticamente epiléticos.

Vários modelos de indução de crises estudam o mecanismo de desenvolvimento das AE's. Em vários trabalhos, a indução de crises parciais simples e complexas ocorre com a aplicação focal de agentes químicos ou através da estimulação elétrica de uma área específica do cérebro. A aplicação focal de antagonistas de receptores GABA, tais como penicilina, bicuculina e picrotoxina, por exemplo, é utilizada para criar focos epileptogênicos. Similarmente, outros estudos têm demonstrado que a introdução de metais pesados como alumínio, cobalto, zinco e ferro, dentro de áreas corticais, também podem conduzir ao desenvolvimento de lesões focais e à epileptogênese.

A indução de crises generalizadas ocorre normalmente a partir da indução de *status epilepticus* ou por meio do modelo kindling. Em modelos de *status epilepticus*

são utilizados diversos agentes convulsivantes como a pilocarpina e o ácido kaínico, para induzir a fase aguda de estado epiléptico, que induz os animais a manifestarem crises do tipo tônico-clônicas. Após essa fase, que normalmente é interrompida farmacologicamente, os animais apresentam um período livre de crises denominado fase latente. Conseqüentemente, depois do período de algumas semanas, os animais passam a apresentar crises recorrentes espontâneas, caracterizando a fase crônica da indução de AE's.

Tanto a pilocarpina quanto o ácido kaínico são capazes de gerar lesões caracterizadas por perdas de interneurônios gabaérgicos no hilus e pela morte de células piramidais nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo de animais experimentais (LEITE e TERRA-BUSTAMANT). O brotamento de fibras musgosas é frequentemente observado em animais tratados com essas drogas (OKAZAKI et al., 1995). No entanto, estudos realizados com modelos de *status epilepticus* mostram que se o estado de mal epiléptico não ocorre ou é abortado com drogas antiepilépticas, não ocorrem alterações neuropatológicas no hipocampo dos animais e nem surgem crises espontâneas (LEMOS e CAVALHEIRO, 1995; PITKÄNEN, 2006). Esse trabalho sugere uma possível relação entre a epilepsia induzida por *status epilepticus* e as anormalidades anatômicas e funcionais do hipocampo.

Já a indução de crises generalizadas com modelos kindling ocorre por meio da estimulação elétrica em regiões límbicas do cérebro ou por meio da estimulação química com agentes convulsivantes. Como o kindling é o modelo experimental de epilepsia adotado nesse trabalho, suas características são apresentadas com mais detalhes no item seguinte.

II.3.1 - Modelo Kindling

O modelo kindling refere-se a um processo em que a repetida administração de estímulos elétricos ou químicos, inicialmente subconvulsivantes, resultam no surgimento e intensificação progressiva da atividade convulsivante, culminando em crises generalizadas (GODDARD et al., 1969).

O kindling foi realizado originalmente por Goddard em 1967, com o objetivo de examinar o efeito da estimulação elétrica do complexo amigdalóide sobre a memória. Durante o processo, Goddard percebeu que os animais desenvolviam crises depois de

repetidas estimulações e reconheceu que os cérebros dos animais manifestavam alterações em resposta a estímulos constantes.

Diante dos resultados, Goddard caracterizou as variações provocadas por kindling como uma forma de plasticidade neuronal e, em trabalhos posteriores, conseguiu demonstrar que o kindling também poderia ser induzido quimicamente, identificando patologias de danificação direta, edema e toxicidade de metais como causas do kindling.

Outro pesquisador, RACINE (1972), ao examinar novos fenômenos procurando o limiar de disparo das crises, descreveu a progressão do kindling elétrico em detalhes e caracterizou o comportamento dos animais em cinco estágios distintos: 1 para automatismos faciais, 2 para mioclonias de pescoço e face, 3 para clonias de patas anteriores, 4 para clonias de patas posteriores e 5 para elevação e queda.

A escala de Racine passou a ser adotada para análise da evolução do processo de abrasamento em trabalhos de indução de kindling, mas como o abrasamento está diretamente associado ao tipo de estimulação e às regiões cerebrais afetadas, foi possível comprovar que durante a indução de kindling esses estágios nem sempre são verificados, ou seguem o padrão proposto pela escala de Racine. Depois de um bom período de estudos e observações sobre o comportamento animal após a indução de kindling, a escala de Racine foi complementada pelo cientista LOSCHER (1997), que detahou melhor as características dos estágios do processo de abrasamento. As manifestações comportamentais apresentadas pelos animais após a estimulação, foram classificadas da seguinte forma:

- Estágio 1: quando os animais apresentam imobilidade, clonia facial, fechamento olhos, contração vibrissas e um farejar meio estereotipado;
- Estágio 2: quando os animais apresentam sacudidas de cabeça e clonias faciais mais intensas;
- Estágio 3: quando os animais apresentam clonia unilateral de membros anteriores;
- Estágio 4: quando os animais apresentam elevação, frequentemente acompanhada por clonia bilateral de membros anteriores;
- Estágio 5: quando os animais apresentam elevação contínua seguida de queda e crises clônicas secundariamente generalizadas.

Sabe-se que a propagação de crises para o córtex motor é o que conduz aos estágios do kindling à medida que os músculos são ativados. No entanto, as crises generalizadas podem ser seguidas por um período refratário de transição, durante o qual

podem ser completamente suprimidas (STRIPLING e RUSSELL, 1985). Esse fato já foi comprovado em trabalhos anteriores que demonstraram que repetidas crises em animais kindelizados podem causar permanente resistência a elas (PINEL et al., 1976). Observações do desenvolvimento de crises tônico-clônicas em animais experimentais tem indicado que algumas populações apresentam diferenças significativas em relação à resistência a tratamentos com agentes proconvulsivantes, sugerindo que o desenvolvimento do kindling está relacionado a diversos fatores, incluindo os fatores genéticos.

O kindling tem sido demonstrado em várias espécies e vários trabalhos têm relatado que por meio desse modelo é possível obter uma ativação precisa da área de estimulação e de início das crises, estudar o desenvolvimento das epilepsias, monitorar o padrão de propagação das crises e caracterizar o efeito das crises no cérebro. Além disso, o modelo kindling tem sido extensamente usado para a avaliação de fármacos antiepilépticos, uma vez que compostos efetivos no tratamento de epilepsia do lobo temporal em humanos inibem as crises induzidas por kindling (MORIMOTO et al. 1997).

II.3.1.1 - Modelo kindling e a Potenciação de Longo Prazo

Investigações com modelos kindling têm indicado que as estimulações realizadas durante esse processo podem originar um aumento da facilitação sináptica, dando origem à potenciação de longo prazo (LTP). A LTP é caracterizada como um processo memorização e está relacionada à facilitação sináptica. Cada vez que um impulso sensorial passa através de uma seqüência de sinapses, essas sinapses tornam-se mais eficientes para transmitir o mesmo tipo de informação da próxima vez.

Estudos sobre a LTP são caracterizados como modelos de aprendizagem e memória e também são realizados por meio de estimulações freqüentes de determinadas regiões cerebrais, porém, sem objetivos específicos de indução de AE's. Ao estudar a LTP, BLISS e LOMO (1973) conseguiram demonstrar que as vias hipocampais são consideravelmente sensíveis à história prévia de atividade, resultando em alterações permanentes. Os motivos responsáveis pela maior vulnerabilidade do hipocampo a estimulações, quando comparado a outras estruturas cerebrais, ainda não foram completamente esclarecidos. Acredita-se que estejam relacionados às características

celulares dessa região, onde é possível verificar organização laminar das células e abundância de receptores excitatórios.

O modelo kindling foi o primeiro fenômeno de neuroplasticidade utilizado em estudos de processos de memorização (GODDARD e DOUGLAS, 1975) por apresentar mecanismos fisiológicos similares aos da LTP (ADAMS et al., 1997; SUTULA et al., 1996). Tanto o desenvolvimento do kindling como da LTP, envolve a administração de repetidas estimulações, transmissão glutamatérgica e aumento de cálcio intracelular.

Evidências também têm demonstrado o envolvimento do receptor GABA_A no processo de memorização. Sabe-se que compostos que aumentam a ação do GABA, como os benzodiazepínicos, enfraquecem o processo de memória. Ao contrário, compostos que reduzem a ação do GABA, como o PTZ e a picrotoxina, aumentam o processo de memorização e auxiliam o processo de aprendizagem.

Cientistas acreditam que drogas com efeito inibitório de GABA podem auxiliar no processo de memória e aprendizado. Como os pacientes com síndrome de Down sofrem de um excesso de atividade de GABA, a administração de pequenas doses de PTZ está sendo testada em animais portadores da síndrome de Down. Estudos realizados pelo Centro de Pesquisa da Síndrome de Down da Escola de Medicina da Universidade de Stanford mostraram que a aplicação de PTZ em ratos com Down melhora a capacidade dos animais em identificar objetos e realizar tarefas, que simulam dificuldades enfrentadas por crianças e adultos com a síndrome.

II.3.1.2 - Características do kindling Elétrico e Químico

O kindling elétrico é realizado por meio de repetidas estimulações elétricas em regiões límbicas do cérebro (Figura II.5) e é extensamente usado para estudar os mecanismos de ictogênese e epileptogênese, assim como em pesquisas de novas drogas antiepilépticas. Esse modelo é desenvolvido por meio da estimulação de muitas áreas cerebrais, mas não de todas. A amígdala, por exemplo, é uma estrutura muito utilizada por apresentar proporções adequadas para a inserção de eletrodos, que auxiliam a estimulação.

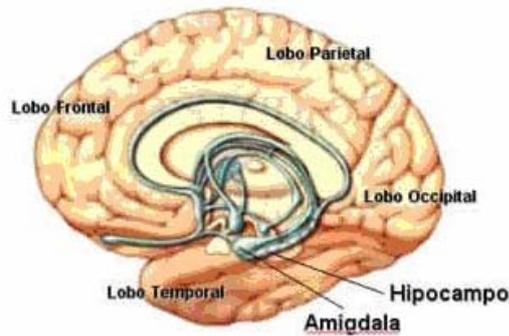


Figura II.5 - Estruturas do sistema límbico (DA SILVA e CAVALHEIRO, 2004)

O kindling elétrico é caracterizado como um modelo de epilepsia parcial complexa (POST, 2007). No entanto, a estimulação elétrica inicial nem sempre provoca um comportamento detectável ou uma resposta eletrofisiológica monitorada por eletroencefalografia (EEG). Por meio de estimulações subsequentes pode ocorrer o surgimento e desenvolvimento de atividades convulsivantes.

Como as crises epiléticas, inicialmente focais, podem se propagar para outras estruturas anatomicamente interconectadas, a evolução do processo de abrasamento elétrico segue um padrão característico bem-definido. A repetição das estimulações provoca, progressivamente, alterações eletroencefalográficas e comportamentais de natureza epileptiforme (RACINE, 1972).

Já o kindling químico, é um modelo experimental de epilepsia que também provoca alterações comportamentais e eletrográficas em animais experimentais, porém induzidas por repetidas administrações de agentes químicos proconvulsivantes. Dentre as muitas drogas utilizadas para a kindelização estão a cocaína, a picrotoxina e o PTZ.

Repetidas injeções de agentes químicos proconvulsivantes em animais, produzem um kindling químico diferente do kindling elétrico, por se tratar de um modelo de epilepsia generalizada primária, ou seja, de um modelo em que as crises acometem o córtex por inteiro assim que são iniciadas.

Como os efeitos provocados por modelos kindling estão relacionados ao tipo de indução, à área de estimulação e aos tipos de crises evocadas, pode-se dizer que os modelos elétrico e químico apresentam características específicas que diferenciam um do outro e que devem ser consideradas durante estudos sobre os mecanismos de desenvolvimento das epilepsias.

O sistema límbico e a região lobo temporal são particularmente susceptíveis ao kindling (GODDARD, 1976). Muitas das variações funcionais e celulares notadas em kindling são similares a variações observadas em epilepsia da região lobo temporal. A literatura aponta que repetidas crises epilépticas provocam alterações fisiológicas e morfológicas na região hipocampal. No GD, por exemplo, as alterações morfológicas induzidas por kindling elétrico e químico incluem perdas de neurônios polimórficos no hilus, surgimento de fibras musgosas de axônios e reorganização sináptica do caminho das fibras musgosas.

No entanto, é importante ressaltar que após alcançarem o estado kindling os animais não desenvolvem crises espontâneas, a não ser que seja realizado um grande número de estimulações (*over-kindling*). SAIYN et al. (2003) demonstrou ser necessário estimular de 90 a 100 crises de estágio 5 para os animais manifestarem crises espontâneas. Pode-se dizer que o principal efeito do kindling está relacionado ao aumento da susceptibilidade às crises em animais submetidos ao processo de kindelização. Alguns trabalhos sugerem que a perda de neurônios hipocampais induzida por kindling, associada à reorganização da atividade celular, apresenta uma importância fundamental para o aumento da hiperexcitabilidade e da suscetibilidade às crises (CAVAZOS et al., 1994; HAWRYLAK et al., 1993; HOSOKAWA et al., 1995).

De acordo com MORIMOTO (1989), o estado kindling é causado por longas e, possivelmente, por alterações irreversíveis de excitabilidade e/ou variações da organização estrutural de redes neuronais envolvidas nesse processo.

II.3.1.3 - Kindling Químico com PTZ

A maioria dos trabalhos de indução de kindling com PTZ utiliza concentrações que estimulam o desenvolvimento de atividades motoras e que, conseqüentemente, permitem analisar a evolução do processo de abrasamento por meio da escala de Racine ou Loscher, mesmo sem a utilização do EEG. Como já comprovado no trabalho de SNEAD (1992), a aplicação diária de baixas doses de PTZ pode elicitar apenas crises de ausência.

O kindling químico induzido por PTZ consiste em um modelo de epilepsia generalizada primária (ONO et al., 1990; ROSSI, 1996) capaz de provocar variações psicopatológicas, como desordens cognitivas (BECHER et al., 1994), mas os poucos

trabalhos na área oferecem a oportunidade de avaliar o grau de ofensividade e defesa, que podem prover um análogo ao emocional humano e às desordens psiquiátricas. FRANKE e KITTNER (2001) conseguiram mostrar que animais kindelizados com PTZ apresentam redução no comportamento ofensivo. Paralelamente, também foi verificado que animais kindelizados com esse agente químico apresentam um aumento da imobilidade (“freezing”) durante o teste de exposição ao odor de gato e uma redução da locomoção exploratória, sugerindo aumento do grau de ansiedade em animais submetidos ao kindling com PTZ.

Investigações recentes indicam que os efeitos específicos do PTZ são mediados por receptores $GABA_A$, via sítios benzodiazepínicos e picrotoxínicos, reduzindo o influxo de íons cloreto (SQUIRES et al., 1984; HUANG et al., 2001). No entanto, o mecanismo de bloqueio do receptor $GABA_A$ pelo PTZ ainda não foi esclarecido (JUNG et al., 2002).

Variações de nível histológico e anatômico ocorrem em animais experimentais após um período de exposições repetidas ao PTZ. O primeiro sinal de alteração morfológica é evidenciado após um período de 24 horas em células piramidais das regiões CA1 e CA3 do hipocampo e em células granulares do GD desses animais. Além disso, o processo de perda neuronal do hipocampo aumenta consideravelmente durante as primeiras dez semanas subseqüentes ao fim da kindelização com PTZ e a perda neuronal pode ser observada num período de até 15 semanas após o kindling (FRANKE e KITTNER, 2001). Esse fato parece estar relacionado aos diferentes tempos de curso dos mecanismos anticonvulsivantes e excitatórios envolvidos em kindling.

De acordo com trabalhos de PAVLOVA (2006), o kindling com PTZ conduz a reduções significantes no número de neurônios em partes sensitivas do hipocampo, independentemente de manifestações de crises convulsivas generalizadas. Dessa forma, PAVLOVA (2006) sugere que as crises convulsivas induzidas em modelos kindling não estão diretamente associadas a neurodegeneração.

Em modelos kindling com PTZ a morte neuronal em hipocampo aparece acompanhada por aumento do stress oxidativo, que começa independente de manifestações externas de crises (PAVLOVA, 2006). Evidências indicam que o stress oxidativo contribui para o desenvolvimento de epilepsias, por isso, a utilização de antioxidantes no tratamento de pacientes com algum tipo epilepsia pode ajudar no controle das crises (IHAN, 2006; LOPEZ et al., 2007).

II.4 - Sistemas de Neurotransmissão

A transmissão do impulso nervoso pode ocorrer por dois mecanismos básicos: as conexões sinápticas e não-sinápticas. A forma predominante de neurotransmissão em seres vivos ocorre através das transmissões sinápticas, no entanto estudos demonstraram que as comunicações não-sinápticas são suficientes para a geração e sustentação das atividades epileptiformes (TAYLOR e DUDEK, 1982; JEFFERYYS e HAAS, 1982).

II.4.1 - Sistemas de Neurotransmissão Sináptica e Kindling

Baseando-se em conceitos de neurotransmissão sináptica pode-se dizer que a hiperexcitabilidade em epilepsias ocorre devido a um desequilíbrio entre a excitação e a inibição neuronal, onde os neurotransmissores glutamato e GABA, respectivamente, apresentam um importante papel.

O aminoácido glutamato é considerado como o maior neurotransmissor do SNC de mamíferos e está envolvido em diversas funções cerebrais tais como cognição, aprendizado e memória (IZQUIERDO e MEDINA, 1997; CASTELLANO et al., 2001). Esse neurotransmissor age acelerando a transmissão sináptica excitatória.

Durante as variações no sistema de neurotransmissão induzidas por kindling com PTZ, acredita-se que o surgimento das crises seja originado pelo influxo de Ca^{2+} dentro das células devido a um aumento da neurotransmissão de glutamato. Esse aumento da neurotransmissão de glutamato é justificado em alguns trabalhos que apontam que o kindling com PTZ conduz a aumentos da densidade e da sensibilidade dos receptores NMDA do glutamato na região do hipocampo (SCHROEDER et al., 1998) e também a aumentos do número de locais de ligação dos receptores AMPA do glutamato, principalmente daqueles que contém subunidades permeáveis ao cálcio (EKONOMOU et al., 2001).

Os receptores NMDA e AMPA apresentam um papel fundamental no processo de kindelização (DÜRMMÜLLER, 1994), sendo os receptores AMPA indicados como importantes para manter o kindling (EKONOMOU et al., 2001). O trabalho de LUKOMSKAYA et al. (2003) indica que os receptores NMDA estão mais envolvidos na gênese de crises clônicas, enquanto os receptores AMPA parecem estar mais relacionados à gênese das crises tônicas.

Considerando que a indução de modelos kindling provoca um aumento da neurotransmissão de glutamato, acredita-se que a morte neuronal evidenciada em modelos kindling pode estar relacionada ao influxo exagerado de cálcio nas células.

O γ -amino-butírico (GABA) é considerado o principal neurotransmissor inibitório do SNC adulto e é responsável pela transmissão sináptica inibitória. A ação inibitória do GABA é mediada por meio da ativação de receptores específicos: os receptores GABA_A e os receptores GABA_B. Os receptores GABA_A são constituídos de um complexo de estrutura hetero-oligômera, cujas subunidades formam um canal de cloreto. Estes receptores medeiam resposta inibitória rápida e apresentam sítios de ligação para GABA, benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides, picrotoxina e etanol (KORPI et al., 2002). Já os receptores GABA_B, ligados à proteína G, hiperpolarizam o neurônio aumentando a condutância de potássio e diminuindo o influxo de cálcio, desencadeando assim, um efeito inibitório lento.

A resposta mediada por GABA_A é sensível a variações nos gradientes eletroquímicos. Em condições cerebrais normais, os canais de cloreto dos receptores GABA_A geralmente são inibitórios em neurônios, em virtude de estabilizar o potencial de membrana próximo ao nível de repouso. A ativação dos receptores GABA_A à hiperpolarização ou despolarização da célula é dependente da relação existente entre o potencial de equilíbrio de Nernst para o cloreto (E_{Cl}) e do potencial de repouso da membrana (V_m).

Em condições de alta $[Cl^-]_i$, como no caso de cérebros imaturos, o E_{Cl} é positivo em relação ao V_m e a ativação de receptores GABA_A causa efluxo de cloreto despolarizando a corrente interna. Já em condições de baixa $[Cl^-]_i$, como no caso de cérebros maduros, o E_{Cl} é negativo em relação ao V_m e a ativação dos receptores GABA_A provoca o influxo de cloreto, hiperpolarizando potenciais pós-sinápticos inibitórios. As entrada e saída de cloreto são reguladas, principalmente, por meio dos cotransportadores KCC2, responsáveis por manter a baixa concentração interna de cloreto e NKCC1, responsável pela entrada de cloreto na célula.

Na Figura II.6, está representada a ação dos cotransportadores de Cl^- nos receptores GABA de neurônios.

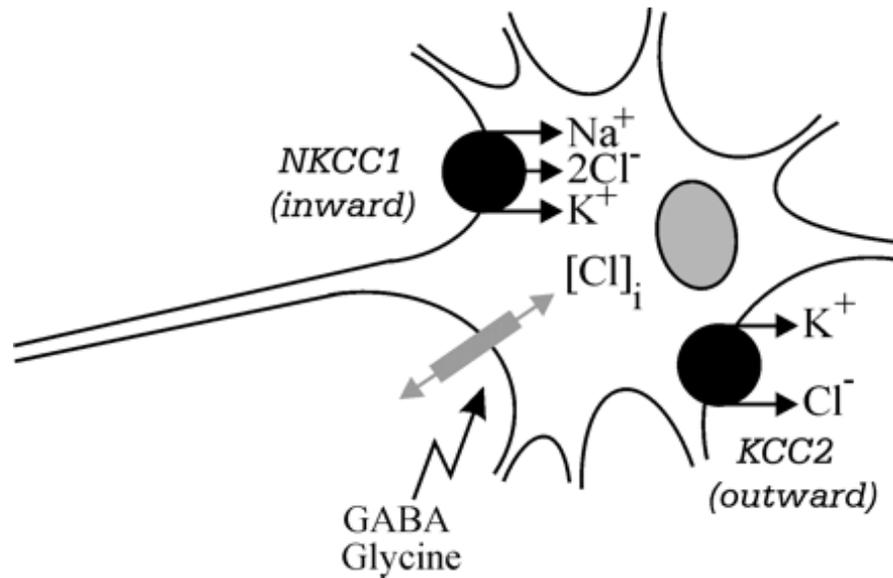


Figura II.6 - Representação da ação dos cotransportadores de Cl^- , expressada nos receptores GABA_A de neurônios. NKCC1 é cotransportador de Na^+ - K^+ - 2Cl^- e KCC2 é cotransportador de K^+ - Cl^- . (E. DELPIRE, 2000).

A expressão de KCC2 é específica de neurônios do SNC, estando ausente no SNP (PAYNE et al., 1996; RIVERA et al., 2000). Já a expressão neuronal de NKCC1 é geralmente baixa, mas existe em algumas regiões do sistema nervoso incluindo bulbo olfatório, hipocampo, amígdala, tálamo, córtex periforme, entre outras (KANAKA et al., 2001; OKABE et al., 2002).

Alguns trabalhos apontam que a expressão de NKCC1 e KCC2 varia com o desenvolvimento. Em cérebros imaturos a expressão de NKCC1 é alta e diminui com o desenvolvimento pós-Natal (PLOTKIN et al., 1997). Em contraste, a expressão de KCC2 é baixa em cérebros imaturos e aumenta durante o período pós-natal (CLAYTON et al., 1998). Os níveis de RNAm e de proteínas também aumentam significativamente após as primeiras semanas de período pós-natal.

Na Figura II.7, é esquematizada a regulação da expressão dos cotransportadores NKCC1 e KCC2 com o desenvolvimento neuronal.

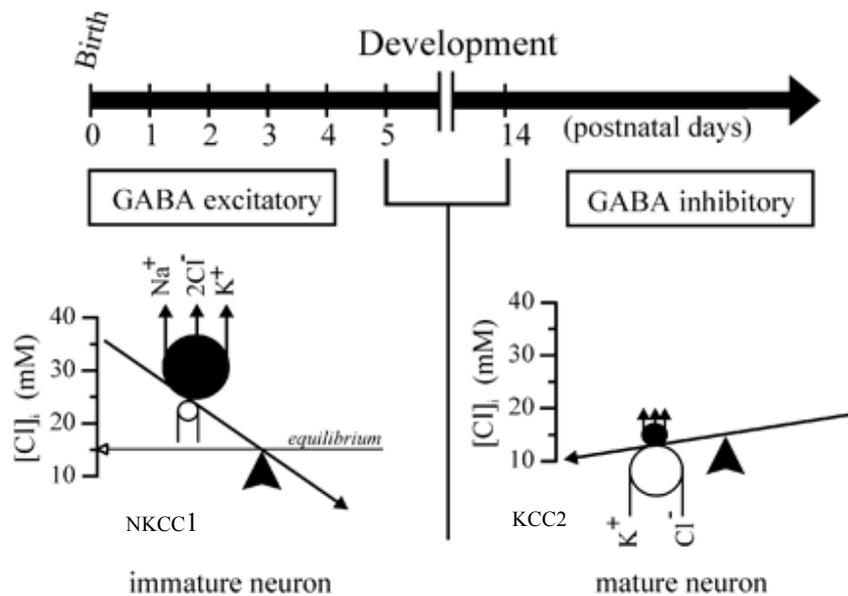


Figura II.7 - Regulação da expressão dos cotransportadores NKCC1 e KCC2 com o desenvolvimento neuronal. Correntes de cloreto induzidas por GABA variam de despolarização (excitação) para hiperpolarização (inibição) de acordo com o desenvolvimento. Durante o período embrionário e pós-natal ocorre a predominância da expressão do cotransportador NKCC1 nos neurônios, que está correlacionada com a alta $[Cl]_i$. Com a maturação neuronal ocorre uma diminuição da expressão de cotransportadores NKCC1 e um aumento da expressão de KCC2. Essas variações no desenvolvimento coincidem com a diminuição da $[Cl]_i$. (DELPIRE, 2000. Adaptação com permissão de LU et al., 1999).

Por causa da grande relação com neurotransmissores gabaérgicos, os cotransportadores de cloreto têm capacidade de influenciar em muitos processos fisiológicos e patológicos. Variações em gradientes de cloreto podem causar desinibição do sistema GABAérgico (FUKUDA et al., 1998), aumentando a excitabilidade neural e dando início a epileptogêneses.

A disfunção de receptores GABA_A implica em muitos processos patológicos tais como epilepsia e ansiedade. Trabalhos recentes demonstraram que reduções da inibição, resultante do decréscimo do número de neurônios GABAérgicos (DINOCOURT et al. 2003) e alterações nos receptores GABA_A (BIANCHI et al. 2002), podem conduzir a hiperexcitabilidade em redes neuronais e a epileptogêneses (BERNARD et al. 2000; PRINCE, 1999; SLOVITER, 1987). Agentes bloqueadores de GABA têm potencial farmacológico caracterizado como excitante, por isso, agentes convulsivos sintéticos, como a picrotoxina e o PTZ apresentam ação excitatória em neurônios.

Os cotransportadores de cloreto são considerados críticos na regulação da concentração intracelular de cloreto e no controle da função neuronal. A indução de kindling elétrico pode conduzir a reduções na expressão de KCC2 (RIVERA et al., 2000) e a um aumento na expressão de NKCC1 (OKABE et al., 2002). Baseando-se nessas constatações, JIN et al. (2005) sugere que a redução na liberação de cloreto, provocada pela diminuição da expressão de KCC2, aliada ao aumento na entrada de cloreto, provocado pelo aumento da expressão do cotransportador NKCC1, pode reduzir a força de inibição GABAérgica em neurônios, contribuindo para o aumento da excitabilidade e para epileptogênese.

II.4.2 - Sistemas de Neurotransmissão Não-Sináptica e Kindling

Estudos demonstram que as comunicações não-sinápticas são suficientes para a geração e sustentação das AE's (TAYLOR e DUDEK, 1982; JEFFERYS e HAAS, 1982), mas até o momento a literatura não apresentou nenhum relato a respeito dos efeitos do kindling sobre as conexões não-sinápticas.

Como as investigações com modelos kindling demonstram características lesionais desse tipo de modelo, acredita-se que o acúmulo de cloreto intracelular possa estar relacionado ao aumento da excitabilidade neuronal. A relação entre modelos lesionais e o conseqüente aumento de cloreto intracelular foi verificada não somente nos trabalhos de indução de kindling elétrico, citados anteriormente, mas também em trabalhos que relatam a redução de cotransportadores KCC2 sob condições de injúrias neuronais (COULL et al., 2003; JIN et al., 2005).

Se o acúmulo de cloreto intracelular é uma característica predominante de modelos kindling, pode-se prever que alterações importantes ocorram na excitabilidade intrínseca dos neurônios da região lesionada que, aliadas ao acoplamento mútuo neuronal local, podem ser um fator essencial à indução das AE's não-sinápticas.

Como a estrutura estratificada do hipocampo exhibe camadas e corpos celulares com denso empacotamento celular, o acoplamento mútuo pode ser estabelecido por meio das conexões não-sinápticas. Presume-se que alterações importantes devam ocorrer em AE's não-sinápticas induzidas no hipocampo lesionado em modelos kindling, particularmente no GD, onde a citoarquitetura é favorável a indução de crises.

É possível que o estudo dos mecanismos iônicos que ocorrem após a indução de lesões neuronais em hipocampo de animais experimentais, auxilie no tratamento das epilepsias oferecendo, no futuro, novas estratégias terapêuticas para essa doença.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - Procedimentos Experimentais para Indução do Kindling

O processo de “kindelização” com PTZ foi realizado utilizando-se ratos machos da raça *Wistar* (8 semanas) fornecidos pelo biotério da UFSJ, controlados em um ciclo claro-escuro de 12 horas e mantidos à temperatura ambiente.

O PTZ usado foi dissolvido em solução 0,9% de salina e administrado intraperitonealmente em animais experimentais, que passaram a receber dosagens de 40 ou 45mg/kg da droga durante três vezes por semana. As aplicações foram efetuadas até a kindelização, utilizando-se um número máximo de aplicações igual a 15. Na Figura III.1 é ilustrada a aplicação intraperitoneal da droga em ratos *Wistar*.



A)



B)

Figura III.1 - A) Imagem de rato *Wistar* utilizado durante o processo de kindelização. B) Imagem representativa do processo de aplicação intraperitoneal de PTZ.

Após cada aplicação os animais apresentaram alterações comportamentais classificadas em estágios de acordo com a complementação da escala de Racine feita por LOSCHER (1997). Para determinar o estágio atingido em cada aplicação, os animais foram observados por um período de aproximadamente 30 min após a injeção da droga e foram considerados “kindelizados” após apresentarem convulsões de estágio 5 (elevação e queda + crises clônicas secundariamente generalizadas) em 3 dias consecutivos de aplicação.

Foi utilizado um grupo controle de seis animais machos da raça *Wistar*, que a partir de 8 semanas de idade passou a receber, intraperitonealmente, solução salina

0,9%, ao invés de PTZ, durante três vezes por semana, até completar o mesmo número de aplicações recebido pelos animais kindelizados.

Até três dias após as aplicações, os animais kindelizados e controle, foram submetidos ao registro do potencial elétrico (PE) extracelular durante indução experimental de epilepsia sustentada por conexões não-sinápticas. Os parâmetros do PE dos dois grupos foram quantificados para comparação dos resultados.

III.2 - Procedimentos Experimentais para Registro do PE

III.2.1 - Isolamento do Hipocampo e Obtenção das Fatias

Para obtenção das fatias de hipocampo, os animais foram anestesiados por meio de nebulização com éter e posteriormente foram decapitados com o auxílio de uma tesoura.

Utilizando-se um bisturi cirúrgico, foi realizada a incisão longitudinal do escalpo permitindo a visualização da calota craniana. Logo depois, foram realizados cortes medianos e laterais, no osso occipital, sobre o cerebelo e, com o auxílio de uma pinça, as calotas cranianas superiores foram levantadas e removidas deixando o encéfalo visível.

A partir do momento em que o encéfalo ficou exposto, este passou a ser constantemente banhado com solução de Ringer Normal (composição apresentada na tabela 3.1), que consiste em um tipo de solução nutritiva, mantida oxigenada e resfriada entre 0°C e 2°C.

Com o auxílio de uma espátula, o encéfalo foi removido da cavidade craniana e imerso em solução de Ringer Normal. Em seguida, o encéfalo foi transferido para uma placa de petri, contendo filtro de papel, onde passou a ser constantemente banhado com a solução Normal.

Na Figura III.2, são ilustrados os passos e os materiais cirúrgicos utilizados durante a remoção do encéfalo .

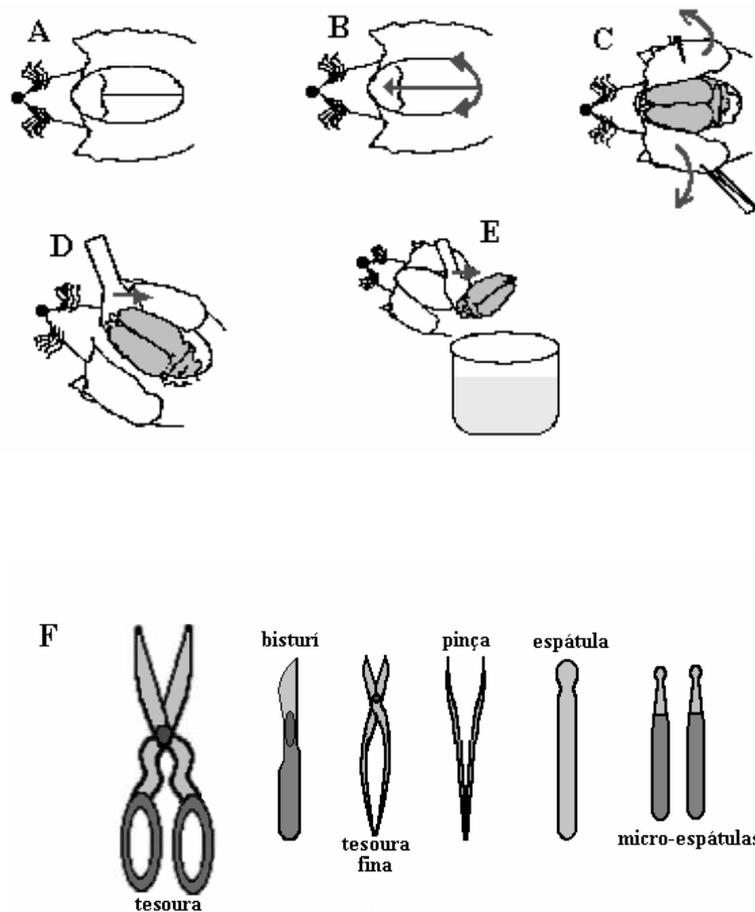


Figura III.2 – Procedimento realizado para retirada do encéfalo de rato da cavidade craniana. A) abertura do couro cabeludo, B) o sentido de corte para a abertura do crânio, C) abertura da calota craniana, D) retirada do encéfalo da cavidade craniana, E) remoção do encéfalo para um becker contendo solução nutritiva resfriada, F) Materiais cirúrgicos necessários para a retirada do cérebro da cavidade craniana e para o isolamento do hipocampo (modificado de CARVALHO, 2003).

Por meio de um novo bisturi, foram realizadas duas incisões que separaram primeiro o cerebelo (Figura III.2, partes A, B e C) e depois os dois hemisférios cerebrais (partes D e E). Enquanto um dos hemisférios foi dissecado, o outro foi mantido imerso na solução Ringer gelada.

Com o auxílio de duas micro-espátulas especiais, o tálamo foi removido, permitindo a visualização da estrutura hipocampal. Introduzindo, cuidadosamente, as micro-espátulas por baixo e pelas laterais, o hipocampo foi desligado do restante do córtex (Figura III.3, partes F, G e H). O mesmo procedimento foi realizado para o outro hemisfério.

Na Figura III.3, são apresentadas ilustrações dos procedimentos descritos para isolamento do hipocampo.

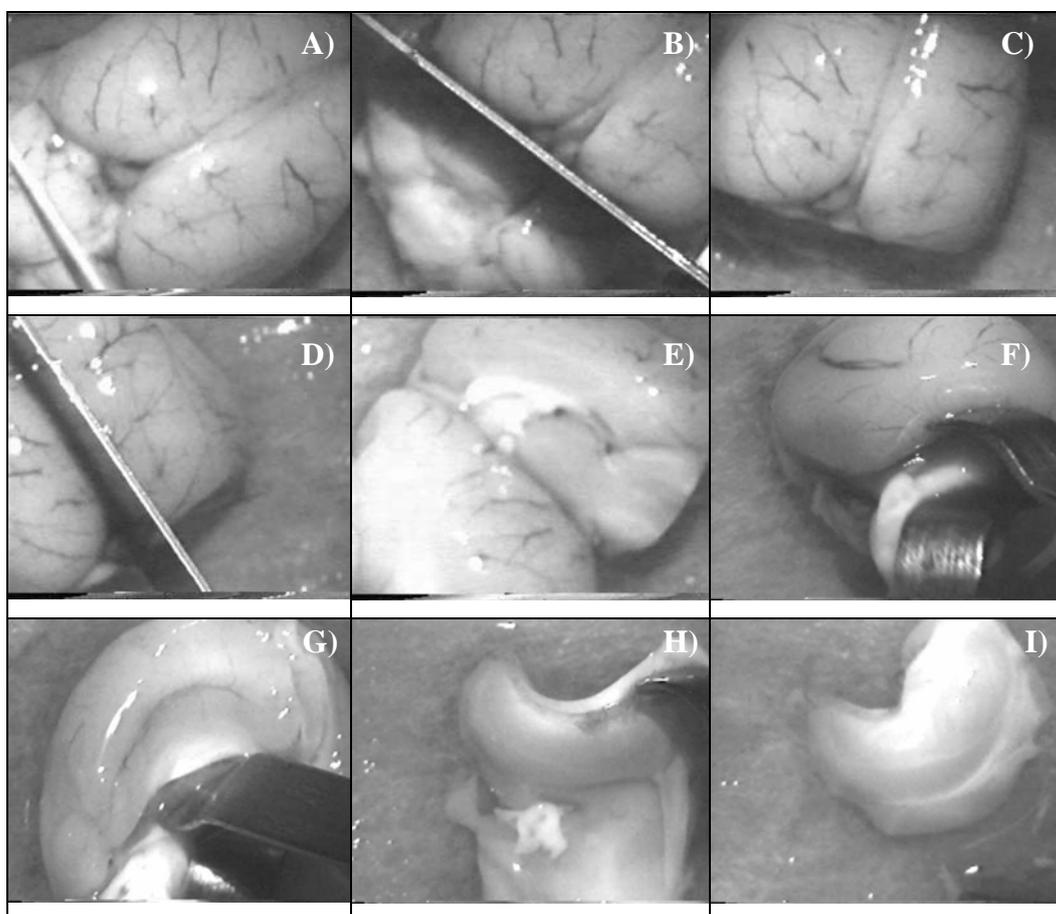


Figura III.3 – Isolamento do hipocampo do restante do encéfalo de rato. Nas fotos A, B, C, D e E são mostrados os cortes realizados para facilitar a dissecação. Em F, G, H são mostrados detalhes da separação do tálamo, com ajuda de micro-espátulas. Em I, está a imagem do hipocampo após ser isolado do restante do córtex (Retirado de CARVALHO, 2003).

O hipocampo isolado foi transferido para um fatiador de construção caseira, do tipo “*chopper*” e depositado sobre filtros de papel umedecidos com a solução normal gelada.

Foi adotada uma espessura de 400 μ m para as fatias, considerando as constatações de NICHOLSON e HOUNSGAARD (1983), que demonstraram que a espessura é um fator limitante para oxigenação das fatias mantidas em uma câmara de interface.

Outro detalhe importante para realização desse processo foi a preparação do fatiador. A lâmina do fatiador esteve bem ajustada permitindo que seu corte alcançasse metade da espessura do filtro de papel.

Após toda essa preparação o hipocampo foi posicionado no fatiador, estabelecendo um ângulo de 70° entre a lâmina de corte e o eixo da fimbria (Figura III.4). Esse ângulo de corte foi utilizado com objetivo de preservar conexões intrínsecas do hipocampo (fibras musgosas, colateral de *Schaffer* e axônios da CA1), que estão dispostas transversalmente, com um ângulo de 70° , em relação ao eixo longitudinal do hipocampo (TEYLER, 1980; LOPES DA SILVA *et al.*, 1990).

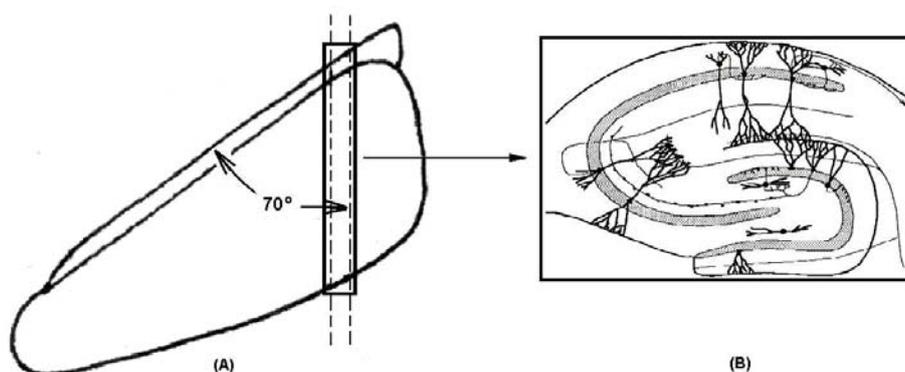


Figura III.4 - Representação esquemática do hipocampo com o respectivo ângulo de corte e suas conexões intrínsecas. Em (A) tem-se a representação esquemática do hipocampo onde se identifica o ângulo de 70° do eixo da fimbria em relação à região de corte do fatiador, com o objetivo de preservar as conexões intrínsecas da fatia, como observado na ampliação da lamela representada em (B). (Retirado de CARVALHO, 2005).

Após cada corte, a fatia obtida ficou aderida a uma das faces da lâmina do fatiador. Com o auxílio de pincel de cerdas finas, cada fatia foi removida e colocada cuidadosamente na câmara de perfusão contendo solução de Ringer Normal, à temperatura entre 31°C e 32°C , onde ficaram descansando por um período de aproximadamente 40min.

Em seguida, as fatias foram transferidas para uma câmara de interface (Figura III.6), onde foram posicionadas sobre uma membrana Milipore. Durante os primeiros 40 minutos, a perfusão foi realizada com solução Normal de Ringer e logo depois com

solução de indução contendo alto potássio e zero cálcio (composição apresentada na Tabela III.1). O pH foi mantido em 7.4, por meio da saturação com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) sob borbulhamento constante.

Utilizando esses procedimentos, foi possível observar AE's por meio de eletrodos (fabricados a partir de tubos capilares) conectados a um amplificador.

Tabela 3.1 – Composições das soluções de perfusão e de indução (valores em mM)

Substância	Solução de Perfusão (Normal)	Solução de Indução
NaCl	127,0	127,0
KCl	2,0	7,0
MgSO ₄ *	1,5	1,5
NaHCO ₃	26,0	26,0
KH ₂ PO ₄	1,1	1,1
Glicose	10,0	10,0
CaCl ₂ *	2,0	0,0

* sais adicionados após o ajuste do pH em 7,4

III.2.2 - Equipamentos Utilizados para Indução das AE's

III.2.2.1 - Câmara de Perfusão

A câmara de perfusão, desenvolvida pelo LANECS-UFSJ, é um recipiente constituído de conexões e tubos de PVC estruturados em forma de U. Essa câmara é preenchida com solução Normal e no ramo de seu maior diâmetro fica estruturada uma fina rede de nylon onde as fatias ficam descansando por um período de aproximadamente 40 min de forma a prevenir as lesões de excitotoxicidade, comuns após o procedimento de corte. Por meio do borbulhamento com carbogênio é estabelecido um fluxo de solução que permite a perfusão suave das fatias.

A câmara de perfusão é mantida dentro de um recipiente banho-maria que mantém a temperatura da solução Normal em torno de 31,5° C. Na Figura III.5, apresenta-se um diagrama esquemático dessa câmara.

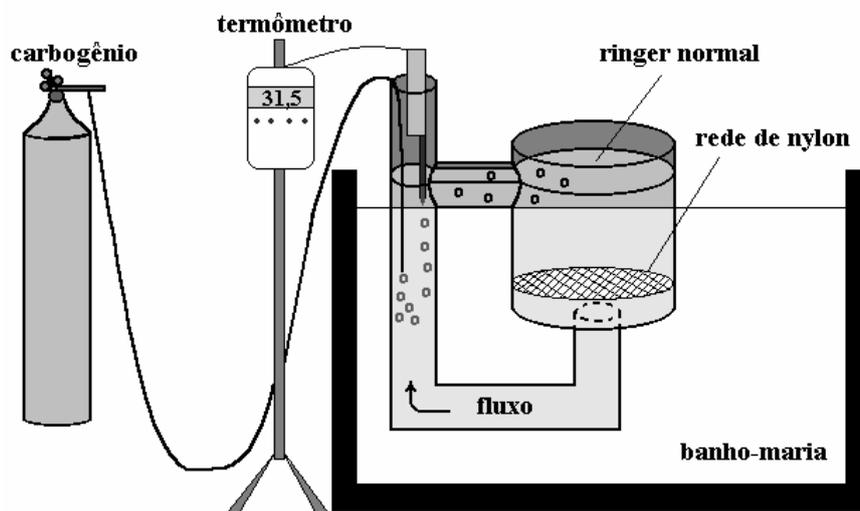


Figura III.5 – Diagrama esquemático da câmara de perfusão montada com tubos e conexões em PVC. A câmara é preenchida com solução de Ringer Normal, mantida a temperatura e oxigenação constantes. As fatias são depositadas no ramo de maior diâmetro sobre uma rede de nylon. (Retirado de PEREIRA, 2005).

III.2.2.2 - Câmara de Interface

A câmara de interface foi desenvolvida no LANEC-UFSJ em material acrílico transparente e tubos de PVC. Ela consiste de dois compartimentos: o banho-maria (Figura III.6) e a cuba (Figura III.7), que são acoplados a uma mesa estática. O banho-maria é composto por 4 resistores cerâmicos de 5 Ω e 20 W de dissipação ligados em paralelo (encerrados em invólucros de vidro) e por dois borbulhadores que dispersam carbogênio no interior do recipiente. Os resistores são submetidos a tensões contínuas até 12 V, que permite o aquecimento controlado da água do banho-maria. As tensões são controladas via software desenvolvido em plataforma LABVIEW 6.1 (NATIONAL INSTRUMENTS) por um programa específico para exercer esse tipo de controle. A temperatura do equipamento é mantida constante em torno de 32° C com precisão de um décimo de grau.

As paredes do tubo são aquecidas por banho-maria e como o tubo é enrolado ao cilindro central, no interior do recipiente que conduz a solução normal para cuba, a perfusão das fatias ocorre com a temperatura da solução devidamente controlada. Tubos de silicone conduzem o oxigênio ao interior do banho-maria. Os borbulhadores dispersam o carbogênio dentro da água, tornando-o aquecido e umidificado para, a seguir, ser direcionado sobre a face superior das fatias mantidas na cuba. Na Figura III.6, apresenta-se o diagrama esquemático da câmara de interface (banho-maria e cuba).

A cuba é composta por dois cilindros e uma base em acrílico, acoplada superiormente ao banho-maria (Figura III.7). O cilindro central, onde se encontra a membrana de Millipore para deposição das fatias, possui um volume bem reduzido, de aproximadamente 0.34 ml, permitindo que toda a solução em contato com as fatias seja constantemente renovada. O nível da solução pode ser controlado através de sucção com ajuda de uma bomba peristáltica (modelo PD5002 – HEIDOLPH). A base em acrílico apresenta alguns pequenos orifícios para que o carbogênio, depois de atravessar o banho maria e já umidificado, possa atingir as fatias.

O ambiente em torno das fatias é coberto por uma tampa em forma de disco que permite uma melhor oxigenação das fatias e o controle da temperatura no interior da cuba. A tampa contém um orifício central que permite a inserção do eletrodo de registro, bem como a exaustão do carbogênio. Devido a problemas de condensação, filtros de papel são colados na superfície interna da tampa do disco e nos eletrodos de aquisição, evitando que as gotas de água produzidas durante a condensação interfiram na osmolaridade do meio e na manutenção das fatias. A formação de gotas de água na ponta da micropipeta que compõe o eletrodo também prejudica a aquisição do sinal e pode até, caso venha a escorrer, lesionar localmente o tecido.

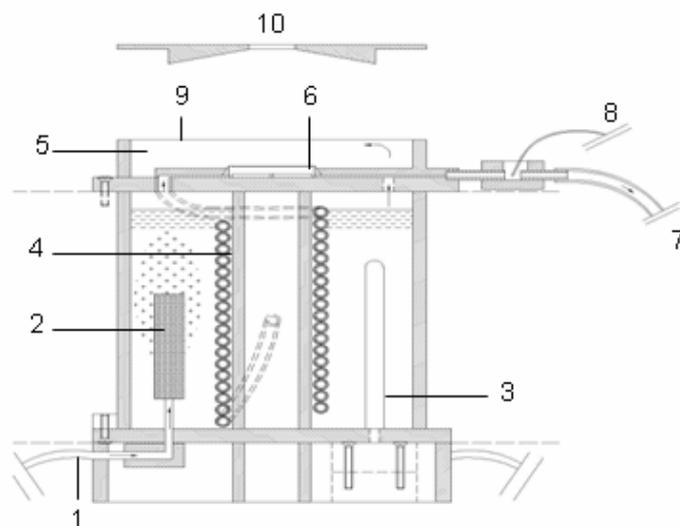


Figura III.6 - Diagrama esquemático da câmara de interface (banho-maria e cuba). Em 1, está representado o tubo de silicone que conduz o carbogênio para o interior da câmara. Em 2, um dos dois borbulhadores de oxigênio existentes na câmara. Em 3, uma das quatro resistências envolvidas em envólucros de vidro. Em 4, o tubo de silicone que conduz a solução até as fatias. Em 5, a cuba que pode ser vista em maiores detalhes. Em 6, a membrana de Millipore, sobre a qual as fatias são depositadas. Em 7, o tubo para sucção da solução. Em 8, o fio terra da solução. Em 9, o disco de acrílico com um orifício ao centro e em 10, o disco que recobre a cuba.

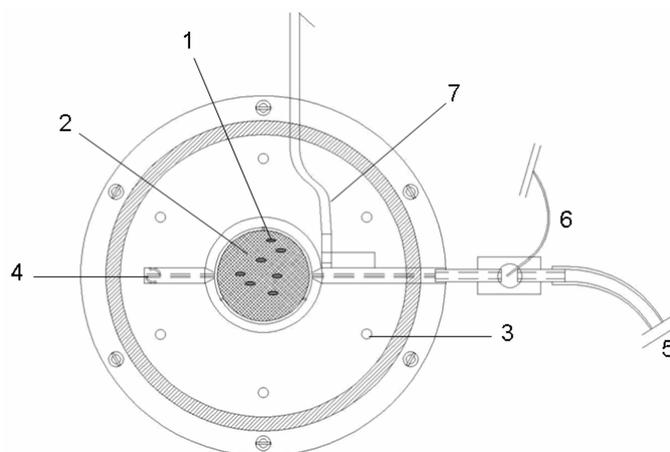


Figura III.7 - Esquema da cuba utilizada para indução das AE's. As fatias, em 1, são sustentadas por uma membrana de millipore posicionada sobre o cilindro central, representada em 2. Em 3, tem-se a representação dos orifícios na base da cuba, que permitem que o oxigênio, depois de umidificado e aquecido, atinja as fatias. Em 4, está representado o canal por onde chega a solução às fatias. Em 5, o tubo por onde ocorre a sucção da solução. Em 6, tem-se a representação do fio terra da solução, e finalmente, em 7 tem-se a representação do termômetro que controla a temperatura da solução que chega às fatias.

III.3 - Sistemas de Medição, Aquisição e Visualização

O PE foi registrado a partir do posicionamento de um eletrodo de registro na região do GD de cada fatia experimental. Foi utilizado um eletrodo formado por filamentos de prata e micropipeta de vidro (modelo THINWALL, TW150F-3 – WPI). A pipeta foi estirada em um puxador de pipetas (modelo DMZ UNIVERSAL PULLER – ZEITZ-INSTRUMENTS) e preenchida com solução de NaCl 1,0 M, com impedância final de 5 a 10 M Ω , suficiente para proporcionar um baixo nível de ruído.

Foram tomados alguns cuidados especiais para preparar as pipetas. Pouca solução foi colocada dentro da pipeta, o mínimo suficiente para fazer contato com o eletrodo de prata, permitindo uma razoável diminuição de ruído. Bolhas de ar alojadas na constrição que forma a ponta da micropipeta foram retiradas, caso contrário, a micropipeta foi descartada em razão de possível alteração indesejável da impedância do eletrodo.

Os filamentos de prata foram cloretados, para evitar o efeito de bateria, provocado pela acumulação de cargas na interface metal-líquido. Após cloretado, o eletrodo foi conectado a uma headstage (modelo AI 402 x 50, ULTRALOW NOISE AMPLIFIER – AXON INSTRUMENTS) interligada a um amplificador (modelo CYBERAMP 380 – AXON INSTRUMENTS) para a aquisição do sinal. O programa SAE (Sistema Auxiliar de Experimentos), desenvolvido no LANEC (SILVA, 2000), foi utilizado para controle do amplificador, digitalização, exibição em tempo real e armazenamento de arquivos. A amostragem do sinal foi feita utilizando a taxa de 10.000 amostras por segundo e o sinal foi amplificado 500 vezes. Também foi utilizado um filtro para redução do ruído de fundo.

O programa MATLAB 7.0 (MATHWORKS) foi utilizado como saída gráfica. O computador empregado na aquisição e processamento dos sinais foi um Pentium III de 1 GHz e 512 MB de RAM.

Um microscópio estereoscópico (modelo PZMTII-L – WPI), que possui várias oculares e um par de objetivas, permitindo uma ampliação de até 225x, foi utilizado para visualização das fatias. A distância focal e o campo de visão máximo são de 314 mm e diâmetro 110 mm, respectivamente. Para manter a câmara de interface fixa, a montagem do microscópio foi efetuada sobre uma mesa XY, independente da câmara, permitindo ajustar o campo visual, sem mover a câmara. Dessa forma, o microscópio varre toda a extensão da membrana onde se encontram as fatias, proporcionando uma

melhor visualização de suas camadas, sem o inconveniente de deslocar o eletrodo, após a mudança do campo visual.

Uma luz gerada na parte inferior do microscópio, abaixo da câmara de interface, alcança as fatias, permitindo uma melhor visualização das camadas. O posicionamento do eletrodo sobre o tecido foi realizado com o auxílio de um micro-manipulador mecânico (modelo KITE-L – WPI), possibilitando a inserção do eletrodo na região de interesse da fatia (no caso, o GD), com o mínimo de lesão.

Para minimizar as vibrações mecânicas durante os experimentos, utilizou-se uma mesa anti-vibração, que consiste de um tampo de pedra suspenso por câmaras de ar, onde são dispostos os equipamentos. As câmaras de ar permitiram, ainda, ajustar o nível de trabalho da mesa. No intuito de isolar os equipamentos de possíveis interferências eletromagnéticas, a mesa foi envolvida por uma gaiola de Faraday.

A captura das imagens contou com a seguinte montagem experimental: a luz branca, gerada na parte inferior do microscópio por uma lâmpada (PHILIPS – Projection Lamp, 6 V e 20 ou 30 W), passava por dentro da câmara de interface e atingia a fatia do hipocampo. Uma binocular acoplada a câmera de CCD (modelo COOLSNAP PROcf) foi responsável pela captação da luz transmitida (luz que atravessa a fatia). As imagens captadas pela câmera de CCD foram gravadas em fitas de vídeo por meio de um vídeo cassete (PHILCO – Hi-Fi Stereo, 7 head) conectado a uma televisão (LG – modelo CP-14K40). Para observar as AE's, o ganho do microscópio foi ajustado de forma que o GD da fatia ocupasse o máximo possível do campo visual. Na Figura III.8, um desenho esquemático representa essa montagem.

As imagens foram capturadas e gravadas em fitas VHS numa taxa de amostragem de 30 Hz, a uma resolução de 640x480 pixels. Para o processo de digitalização, foi necessária uma placa digitalizadora de vídeo, DC10 Plus, gerenciada pelo programa *Pinnacle Studio* - versão 8.10. Esse programa permite armazenar a seqüência de quadros em formato *AVI*, em um microcomputador do tipo *Pentium 4* GHz, de 256MB de memória RAM. O procedimento seguinte foi a extração dos quadros em formato *JPEG*, com o auxílio do programa *Fast Movie Processor*, versão 1.41. Posteriormente, em formato *JPEG*, essas imagens foram gravadas em CD's, para serem utilizadas no processo de quantificação celular.

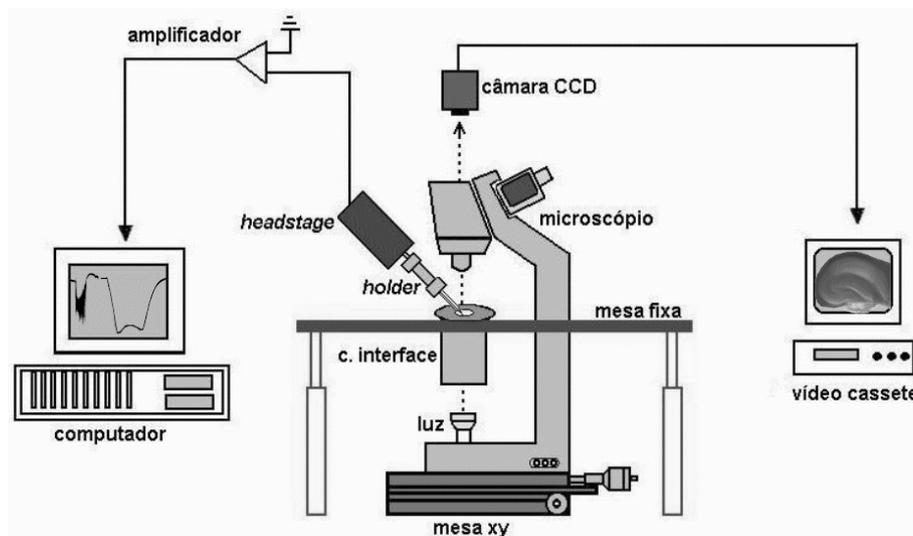


Figura III.8 - Diagrama esquemático do setup experimental utilizado para o registro simultâneo do PE. O PE é registrado a partir do posicionamento do eletrodo de registro no GD. O eletrodo é conectado a uma headstage por meio de um holder. A headstage é interligada a um amplificador biológico. Os sinais são armazenados em um computador. As fatias são iluminadas pela luz gerada na base do microscópio e uma binocular, acoplada à câmara de CCD, captura a luz transmitida. As imagens são gravadas em fitas de vídeo.

III.4 - Procedimentos Experimentais para Análise Histoquímica

III.4.1 - Preparação das Fatias

Após a aquisição de sinais, as fatias do registro eletrofisiológico e algumas fatias controle foram transferidas para recipientes contendo solução paraformaldeído (4%) por 12 horas, com o objetivo de fixar as estruturas morfológicas do tecido.

O paraformaldeído utilizado foi preparado agitando, até dissolver, a solução formada por 170 ml de água destilada e 4,10g de fosfato de sódio dibásico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Após a dissolução, foi adicionado 8,0g de paraformaldeído à solução que, então, foi aquecida até 58°C. Logo depois foi adicionado 1,24g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 30ml de água destilada. A solução foi coada e mantida à temperatura de 4°C.

Após o período de fixação das estruturas do tecido, as fatias foram lavadas 2 vezes, por 5 minutos, em solução de tampão fosfato (PBS 0,1M) constituído por: 11,4g

Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 2,6g de Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,2g de KCl e 8,0g de NaCl, dissolvidas em 500ml de água destilada e posteriormente completada para 1000ml.

As fatias foram emblocadas em ágar e seccionadas a $10\mu\text{m}$ de espessura. O ágar foi preparado com 1,25g de ágar e 25ml de água destilada sendo mantido sob agitação e aquecimento (150°C) até se transformar em uma substância gelatinosa. A fatia foi posicionada sob uma lâmina de alumínio e coberta pelo ágar, depois de resfriado, formando um bloco compacto.

Para o seccionamento das fatias de $400\mu\text{m}$ em fatias de $10\mu\text{m}$, foi utilizado um vibrátomo da marca *Leica*, como mostrado na Figura. III.9. O bloco contendo a fatia foi fixado, com cianocrilato (Gefahr), em um porta blocos posicionado dentro da câmara, à frente da lâmina de corte do vibrátomo.

Dentro da câmara do vibrátomo foi colocada solução de tampão fosfato (4°C) e ao seu redor cubos de gelo para manter a temperatura baixa. Cada seccionamento produziu em média seis fatias de $10\mu\text{m}$ de espessura, que foram colocadas sobre uma lâmina gelatinizada, previamente identificada com o número e a data do experimento, utilizando-se um pincel.

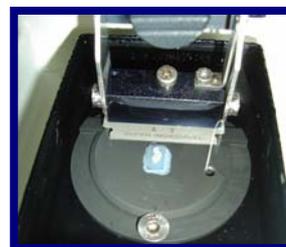


Figura III.9 - Equipamento vibrátomo (marca *Leica*) com a câmara envolvida por cubos de gelo e a fatia posicionada à frente da lâmina de corte do equipamento.

Para gelatinizar as lâminas utilizadas, estas foram banhadas em solução de gelatina histológica contendo: 3,0g de gelatina e 0,30g de cromopotássio de sulfato dodecaidrato (kromalium) diluído em 600 ml de água destilada mantido sob agitação à temperatura de 60° C. Em seguida, a solução foi filtrada e permaneceu esfriando.

Após esse processo, as lâminas contendo as fatias re-seccionadas foram posicionadas em cestinhas de vidro e mergulhadas na solução de gelatina histológica. Antes de serem utilizadas, as lâminas permaneceram secando por 24 horas, à temperatura ambiente, dentro da capela (spencer).

III.4.2 - Coloração das Fatias

O processo de coloração pelo método de Nissl é realizado por meio da imersão de lâminas (contendo as fatias histológicas) em solução de cresil violeta, que marca com uma coloração de azul os núcleos e nucléolos neuronais.

O processo de coloração foi iniciado com o posicionamento de cada lâmina histológica em uma cestinha especial, permitindo banhar as fatias re-seccionadas nas soluções, após o seu posicionamento em cubetas contendo as soluções apropriadas para coloração das fatias. Foram preparadas oito cubetas contendo 200 ml das respectivas soluções: água destilada, cresil violeta-PA (synth), álcool etílico absoluto a 70% - PA (synth), álcool etílico absoluto a 95% - PA (synth), álcool etílico absoluto a 100% - PA (synth) e xilol – PA (synth). Na Figura III.10 mostra-se o posicionamento de uma cestinha (contendo uma lâmina histológica) sobre a cubeta e a capela de exaustão, que é o local onde as cubetas ficam armazenadas.



A)



B)

Figura III.10 - A) Posicionamento da lâmina dentro de uma cestinha para posterior imersão nas soluções dentro de cubetas contendo 200ml das substâncias utilizadas nos procedimentos de hidratação, coloração, desidratação e diafanização. B) Capela (Spencer) com as cubetas.

Cada cestinha contendo as lâminas foi imersa por 5 minutos em água destilada para hidratação e 35 minutos em cresil violeta para coloração dos núcleos e nucléolos. Em seguida, foi mergulhada 2 vezes no álcool 70%, 7 vezes no álcool 95%, 7 vezes no álcool 100%-1 e 7 vezes no álcool 100%-2 para desidratação. Posteriormente, 1 minuto no xilol – 1 e 5 minutos no xilol – 2 para diafanização.

Por fim, as lâminas, contendo o material histológico corado, foram protegidas com a deposição da lamínula fixada pelo entellan (Merck). Após a fixação da lamínula, cada lâmina permaneceu secando por 12 horas dentro da capela. Todo o procedimento de coloração foi realizado dentro da capela com o exaustor (spencer) ligado.

III.4.3 - Quantificação Neuronal

A quantificação neuronal foi realizada utilizando-se um programa desenvolvido no LANEK em plataforma MATLAB 7.0, que possui recursos para captura de imagens. Para realização da quantificação foi necessário utilizar um computador com placa de vídeo, microscópio e uma TV. Na Figura III.11, mostram-se esses equipamentos.

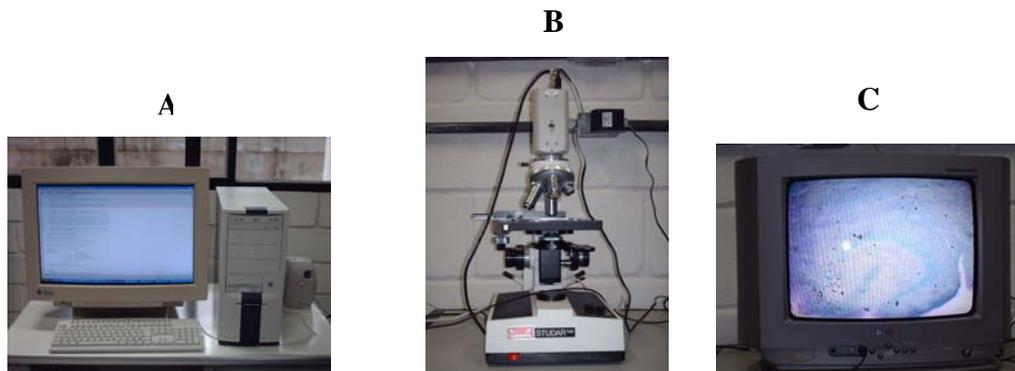


Figura III.11 - Fotografias dos equipamentos utilizados. (A) computador com placa de vídeo. (B) microscópio com uma câmera CCD acoplada. (C) televisão.

Antes da utilização do programa de quantificação celular, a imagem de cada fatia do registro eletrofisiológico, capturada pela câmara de CCD e gravada em fitas de vídeo VHS, foi digitalizada por meio do programa Pinnacle Studio (versão 8.10). Esse programa fornece a captura de uma imagem da fatia (quadro em formato JPEG), importante para inicializar a contagem de células.

Após dar início à execução do programa, foi realizado o ajuste do foco da lâmina na base do microscópio e foram preenchidos os dados do experimento da fatia analisada. Seguiu-se a captura da imagem da fatia na lâmina, sobreposição das imagens (da lâmina e do registro eletrofisiológico), marcação de um trecho do GD e centralização do trecho selecionado.

O primeiro trecho selecionado da região do GD das fatias quantificadas foi sempre correspondente ao local de posicionamento da pipeta, identificado devido à sobreposição da imagem capturada da eletrofisiologia sobre a imagem capturada da lâmina. Foram selecionados trechos do GD de cada fatia analisada até preencher a área total correspondente a essa região. A imagem da Figura III.12 mostra a marcação de todos os trechos do GD de uma fatia utilizada durante experimento.

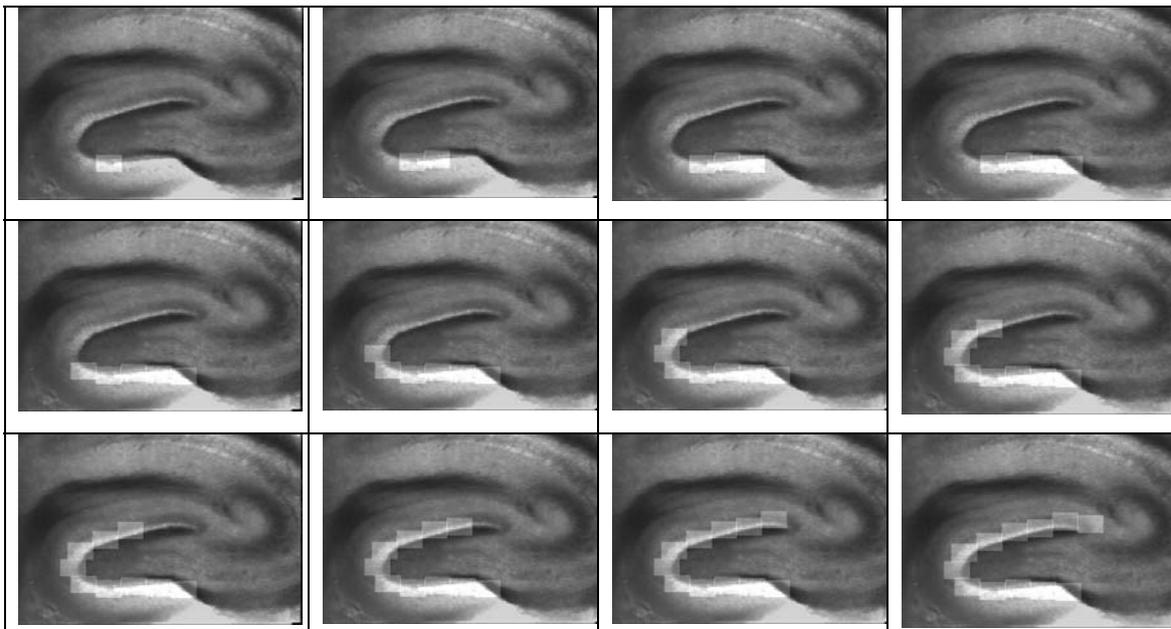


Figura III.12 – Marcação de trechos do GD do hipocampo.

Para cada trecho selecionado foi capturada a imagem da CG de uma parte do GD, utilizando-se uma aproximação de 40 vezes para melhor visualização dos nucléolos durante o processo de quantificação. A Figura III.13 apresenta uma ilustração representativa desse tipo de imagem capturada.

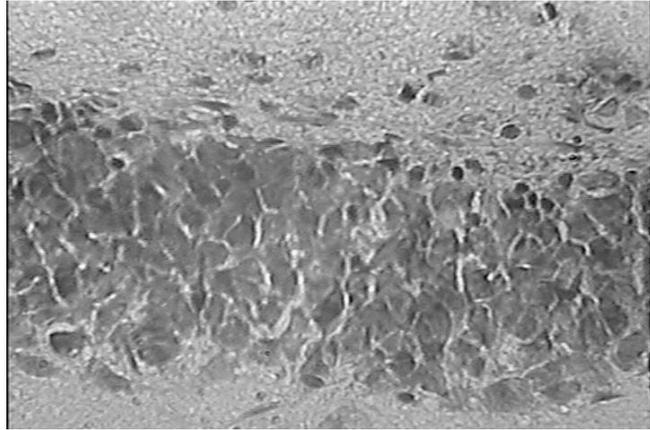


Figura III.13- Imagem capturada de um trecho do GD de uma fatia hipocampal

A imagem gravada nos dois focos foi ampliada e dividida em quatro quadrantes (Figura III.14) para subsequente marcação dos nucléolos das células com o mouse. O programa permitiu ampliar cada quadrante para marcação das células, classificadas de acordo com o tamanho em grandes, médias e pequenas. As células grandes foram marcadas com círculos vermelhos, as médias com quadrados azuis e as pequenas com cruces pretas.

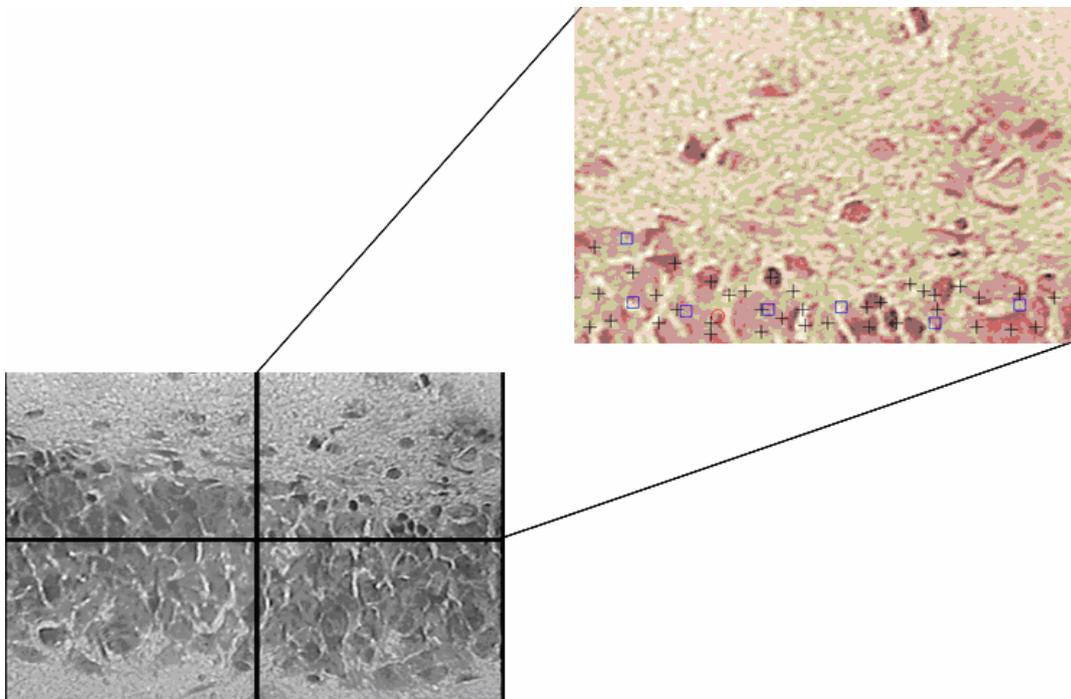


Figura III.14 -Trecho selecionado do GD dividido em quadrantes, onde é possível verificar a marcação de células na camada granular referente ao 3º quadrante.

Após a marcação das células em todos os quadrantes de cada trecho selecionado do GD, a imagem final da marcação foi gravada e utilizada para a contagem celular da camada granular. A quantificação das células marcadas em cada trecho foi finalizada com a emissão de relatório final de contagem da CG do GD de cada trecho selecionado (Figura III.15).

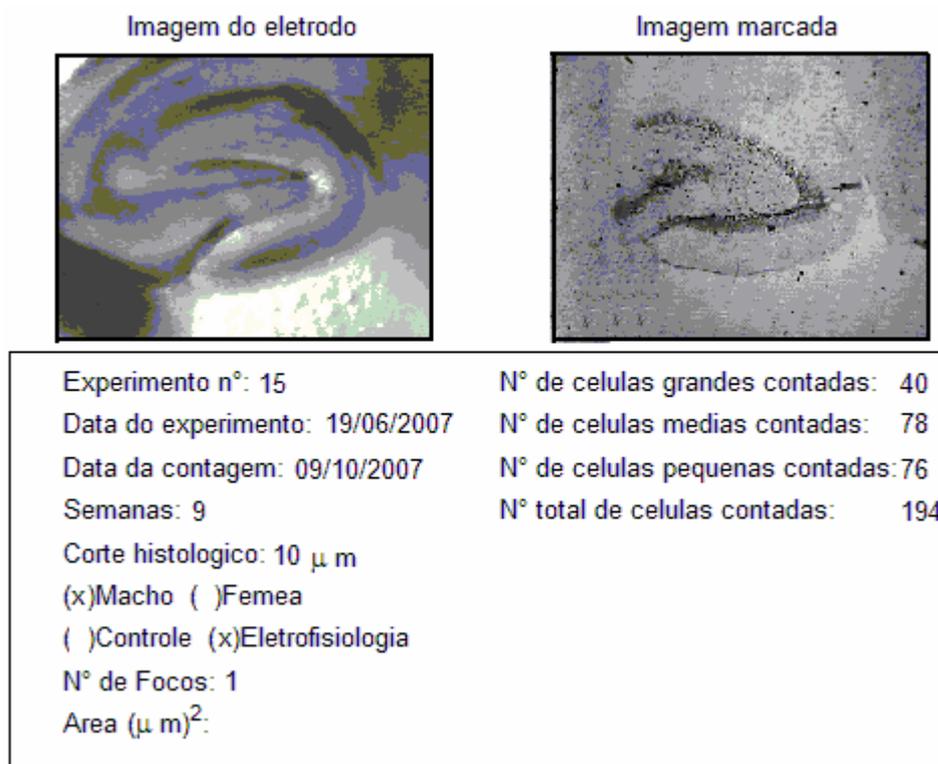


Figura III.15 - Relatório de contagem celular referente a um trecho selecionado do GD

Como o objetivo da quantificação celular se baseia no cálculo da densidade celular do GD das fatias utilizadas na eletrofisiologia, outro programa, também desenvolvido no LANECS em plataforma MATLAB, foi executado para calcular o volume da região de quantificação. Nesse programa uma poligonal é traçada ao redor da CG do GD de cada trecho, fornecendo seu volume. A Figura III.16 apresenta uma imagem representativa de como é traçada a poligonal.

Dispondo da quantificação celular e do volume da CG de cada trecho selecionado, a densidade celular de cada trecho foi calculada dividindo-se o número total de células pelo volume, correspondentes à CG dessa região. Já a densidade total do

GD foi calculada dividindo-se a soma total das células da CG dos trechos selecionados pela soma dos volumes encontrados nesses trechos.

A quantificação foi realizada em trechos para facilitar o cálculo da densidade celular em regiões específicas como, por exemplo, das regiões infra-piramidal (IP), supra-piramidal (SP), ápice (AP) e de posicionamento do eletrodo. Dessa forma, para calcular a densidade celular de uma região específica, foram identificados os trechos correspondentes a essa região e o cálculo da densidade foi realizado dividindo-se o número de total de células pelo volume total da CG da região de análise.

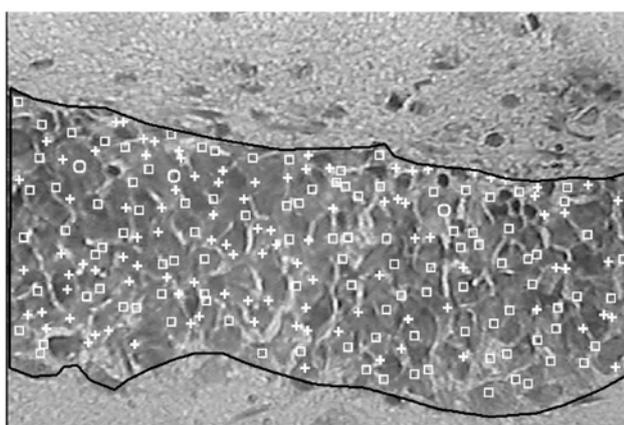


Figura III.16 - Poligonal traçada ao redor da camada do GD em um trecho selecionado

III.5 - Análise Quantitativa dos Parâmetros do PE

Os parâmetros de análise do PE extracelular foram: amplitude da componente DC (DC), amplitude média dos PS's (PS), amplitude máxima dos PS's (Amax), duração dos eventos (DE), intervalo entre eventos (IE) e latência (LT).

A análise dos parâmetros foi realizada utilizando-se uma amostra correspondente a 14 bursts de cada experimento, selecionados após o período de aproximadamente 20 minutos depois do início das AE's. Esse critério foi adotado devido ao fato de ocorrer mudanças nos eventos epileptiformes ao longo do experimento, mudando a conformação dos mesmos no decorrer do tempo de registro. Já o parâmetro LT foi calculado subtraindo-se o tempo de início das AE's pelo tempo de início de perfusão das fatias com solução contendo zero cálcio e alto potássio.

A quantificação dos parâmetros do PE foi realizada utilizando-se programas desenvolvidos no LANECS, em plataforma MATLAB, para leitura e análise de arquivos contendo potenciais elétricos.

III.5.1- Análise Quantitativa do Parâmetro DC

A Transformada Discreta de Fourier (DFT) foi utilizada como ferramenta e aplicada ao sinal elétrico, para separar a componente DC dos PS's, cujas componentes juntas formam os bursts epileptiformes. O termo DC advém do inglês "Direct Current" e é comumente aplicado para identificar fluxo unidirecional de carga elétrica.

A partir do cálculo da DFT do sinal elétrico, foi possível cortar a frequência baixa, abaixo de 10 Hz, que corresponde ao parâmetro DC do sinal cujas componentes apresentam frequência alta, correspondente aos PS's, conforme exemplo ilustrado na Figura. III.17.

A amplitude da componente DC foi considerada como a variação máxima do sinal em relação à linha de base, considerando a linha de base correspondente à média de um trecho do PE antes do evento.

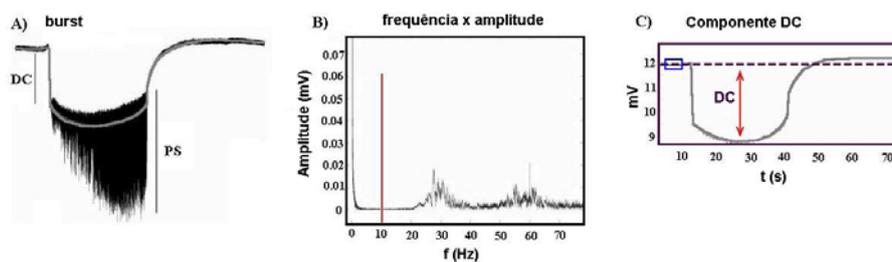


Figura III.17- Procedimento para obtenção da componente DC. A) Sinal completo de um burst contendo a componente DC e os PS's. B) Sinal elétrico após aplicação da Transformada de Fourier, indicando o espectro de frequência. A frequência foi cortada abaixo de 10 Hz. C) Sinal elétrico da componente DC livre dos PS's. A componente DC é a variação máxima do sinal em relação a linha de base (linha pontilhada).

III.5.2 - Análise Quantitativa dos Parâmetros PS e Amax

A amplitude dos PS's, que corresponde à alta frequência dos bursts, também foi encontrada utilizando-se o cálculo da Transformada Discreta de Fourier (DFT) do sinal elétrico, que corta frequências inferiores a 10 Hz, correspondente à componente DC, restando um sinal cujas componentes em frequência correspondem aos eventos PS's. Para determinar a amplitude média dos PS's o programa de análise do PE calcula a integral do módulo desse sinal e o valor encontrado é dividido pela duração do evento, correspondendo ao parâmetro (em mV), indicado nas análises como parâmetro PS. Já o parâmetro Amax (mV) foi determinado pelo programa por meio da marcação das maiores amplitudes alcançadas pelos PS's em cada burst. Na Figura III.18 tem-se a ilustração dos procedimentos para obtenção dos PS's.

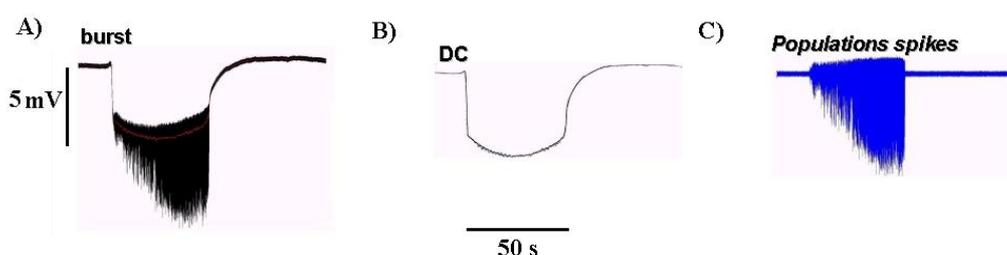


Figura III.18 - Representação do procedimento adotado para obtenção da amplitude dos PS's. Em A) observa-se o sinal completo, em B) observa-se o sinal da componente DC, que será subtraído do sinal completo e, em C), observa-se o resultado da subtração, que é o sinal referente aos PS's.

III.5.3 - Análise Quantitativa do Parâmetro DE

O parâmetro DE foi calculado subtraindo-se o tempo final (t_{final}) pelo tempo inicial (t_{inicial}) de cada evento. Para esse cálculo, o instante de tempo inicial foi considerado quando o sinal atinge uma variação de 20% da amplitude máxima, em relação à linha de base, e, o instante de tempo final, quando o sinal retorna a 20% da amplitude máxima em relação à linha de base. Na Figura III.19 apresenta-se um exemplo da técnica utilizada para o cálculo desse parâmetro.

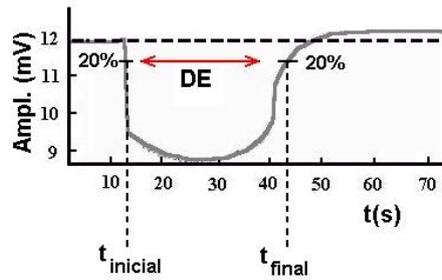


Figura III.19 - Exemplo da técnica utilizada para o cálculo do parâmetro DE. Considerando $t_{inicial}$, quando o sinal atinge uma variação de 20% em relação à linha de base, e t_{final} , quando o sinal retorna a 20% em relação à linha de base, o parâmetro DE foi calculado subtraindo-se o instante t_{final} pelo instante $t_{inicial}$ de cada evento.

III.5.4- Análise Quantitativa do Parâmetro IE

O cálculo do parâmetro IE foi realizado utilizando-se os mesmos parâmetros de identificação do instante de tempo inicial e do instante de tempo final dos eventos, t_{final} e $t_{inicial}$, mencionados no item anterior. Dessa forma, o IE foi considerado como sendo o intervalo de tempo entre o instante em que ocorre o fim de um evento (t_{final}), até o instante em que se inicia o próximo evento ($t_{inicial}$). Na Figura III.20 ilustra-se esse procedimento.

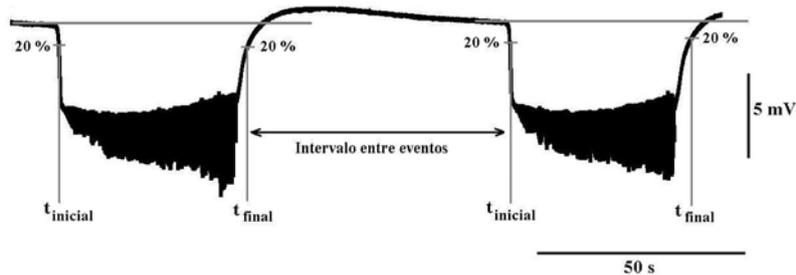


Figura III.20 - Representação do procedimento adotado para obtenção do IE. Considerando $t_{inicial}$, quando o sinal atinge uma variação de 20% em relação à linha de base, e t_{final} , quando este sinal retorna a 20% em relação à linha de base, o parâmetro IE foi calculado como o intervalo de tempo entre o instante t_{final} de um evento e o instante $t_{inicial}$ do evento subsequente.

IV - RESULTADOS

IV.1 - Processo de Kindelização com PTZ

O processo de kindelização com a administração de PTZ proporcionou um baixo índice de animais kindelizados e um alto índice de mortalidade, como se pode observar do levantamento apresentado na Tabela IV.1.

Concentração (mg/kg)	No total de animais	No de animais kindelizados	Percentual kindelização	No de Óbitos	Percentual de mortalidade
40	57	5	8,77	38	66,67
45	33	7	21,21	13	39,40
Total	90	12	13,33	51	56,67

Tabela IV.1- Resultados do processo de kindelização com PTZ em animais experimentais

Foram kindelizados 5 dos 57 animais tratados com concentração de 40mg/kg de PTZ e 7 dos 33 animais tratados com concentração de 45mg/kg de PTZ. Dessa forma, durante todo o processo foram kindelizados apenas 12 animais, representando um percentual de kindelização em torno de 13%.

Todos os animais kindelizados receberam até a 3^a ou 4^a aplicação de PTZ. Os animais que não alcançaram o estado kindling e que resistiram às sessões de aplicação continuaram recebendo a droga até completar a 15^a aplicação, sendo descartados após esse período. Muitos animais alcançaram o estágio 5 da escala de referência (elevação contínua seguida de queda e crises clônicas secundariamente generalizadas) em duas aplicações subseqüentes, mas retornaram ao estágio 2 (sacudidas de cabeça e clonias faciais intensas), 3 (clonia unilateral de membros anteriores) ou 4 (elevação, frequentemente acompanhada por clonia bilateral de membros anteriores) na aplicação seguinte. Nesse caso, as tentativas de kindelização continuaram, já que os animais só são considerados kindelizados após manifestarem crises de estágio 5 em três dias consecutivos de aplicação (Protocolo de Franke, 2001).

O percentual de mortalidade observado foi de 66,7% para o grupo de animais tratados com concentração de 40mg/kg de PTZ e 39,4% para o grupo de animais tratados com concentração de 45mg/kg de PTZ, ficando o percentual de mortalidade total em 56,7%. O índice de mortalidade em função da sessão de aplicação da droga, para animais tratados nas duas concentrações utilizadas, pode ser analisado com maiores detalhes nos histogramas apresentados na Tabela IV.2.

Dentre os animais tratados à concentração de 40mg/kg de PTZ, 24,6% adquiriu resistência à droga, sobrevivendo até a 15ª sessão. Já para os animais tratados com a maior concentração o índice de resistência foi de 39,40%.

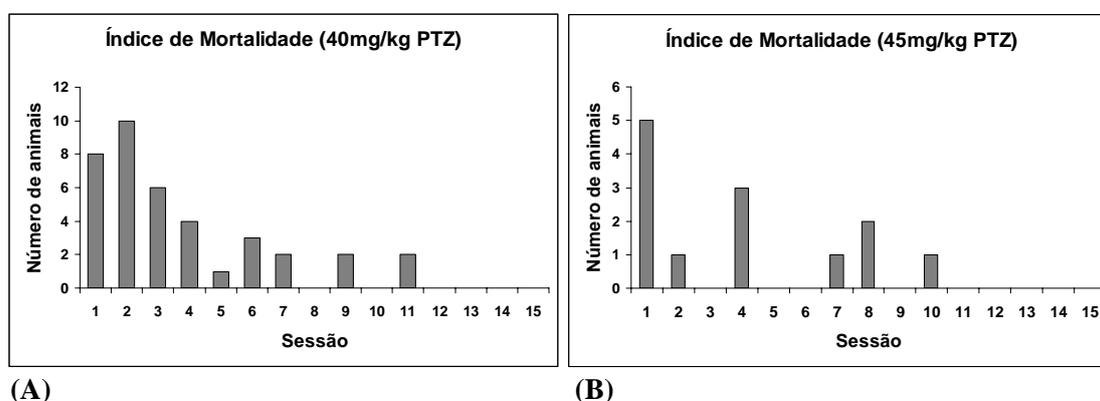


Tabela IV.2 - Índice de mortalidade por sessão de aplicação do PTZ. (A) representa o grupo de animais tratados à concentração de 40mg/kg de PTZ e (B), o grupo de animais tratados à concentração de 45mg/kg de PTZ.

IV.2 - Parâmetros do PE

Os resultados apresentados nesse trabalho referem-se aos parâmetros PE obtidos de 12 experimentos realizados com animais kindelizados e de 6 experimentos realizados com animais controle (9 semanas).

O sinal elétrico gravado foi analisado utilizando-se programas desenvolvidos no LANEC, em plataforma MATLAB, que permitiram calcular as variáveis correspondentes aos eventos epileptiformes denominados bursts. Foi utilizada uma amostra experimental de 70 bursts, referentes a 5 experimentos realizados com animais kindelizados com PTZ à concentração de 40mg/kg de PTZ; 98 bursts, referentes a 7 experimentos realizados com animais kindelizados com PTZ à concentração de 45mg/kg de PTZ e 84 bursts, referentes a 6 experimentos realizados com animais

controle. Para obter essa amostragem foram utilizados 14 bursts de cada experimento, correspondentes a um período de aproximadamente 20 minutos após o início das AE's.

Utilizando-se o método de comparações múltiplas e análise de variância, com nível de significância igual a 5% ($\alpha = 0.05$), foram comparados os valores médios dos parâmetros do PE, obtidos de experimentos realizados com animais kindelizados com as concentrações de 40mg/kg de PTZ (K40) e 45mg/kg de PTZ (K45) e de experimentos realizados com animais controle. O método de comparações múltiplas e análise de variância é executado realizando-se inicialmente a prova de Fisher para contrastar as variâncias dos grupos. Em caso de variâncias e número de indivíduos diferentes para cada grupo, como em nossos resultados, a comparação dos grupos é baseada no teste de Scheffé.

Os valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro LT foram iguais a $70 \pm 1,74$, $66 \pm 3,51$ e $42,43 \pm 3,14$ min, respectivamente para os grupos Controle, K40 e K45 (Figura IV.1). Foram encontradas diferenças significativas entre as médias comparadas dos grupos Controle e K45 e K40 e K45. Essa análise teve como resultado um $p\text{-value} = 0,0015306$.

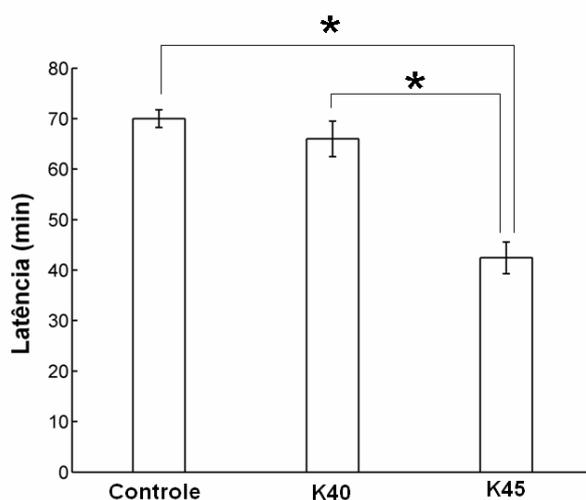


Figura IV.1 - Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro LT dos grupos Controle, K40 e K45.

No gráfico da Figura IV.2 estão apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrão, encontrados para o parâmetro DC em cada grupo. Esses valores foram iguais a $3,40 \pm 0,21$, $4,15 \pm 0,28$ e $7,07 \pm 0,45$ mV, respectivamente para os

grupos Controle, K40 e K45. Foram encontradas diferenças significativas entre todas as médias comparadas e um $p\text{-value} \cong 0$

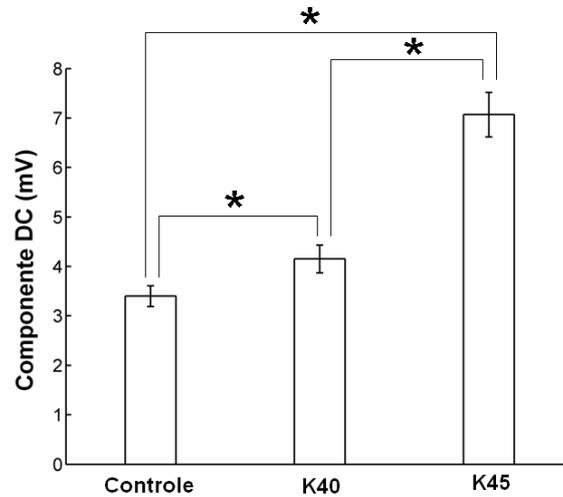


Figura IV.2 - Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro DC dos grupos Controle, K40 e K45

Os valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro PS foram iguais a $0,24 \pm 0,03$, $0,34 \pm 0,03$ e $0,64 \pm 0,04$ mV, respectivamente para os grupos Controle, K40 e K45. Esses resultados estão apresentados no gráfico da Figura IV.3. Foram encontradas diferenças significativas entre todas as médias comparadas e um $p\text{-value} \cong 0$.

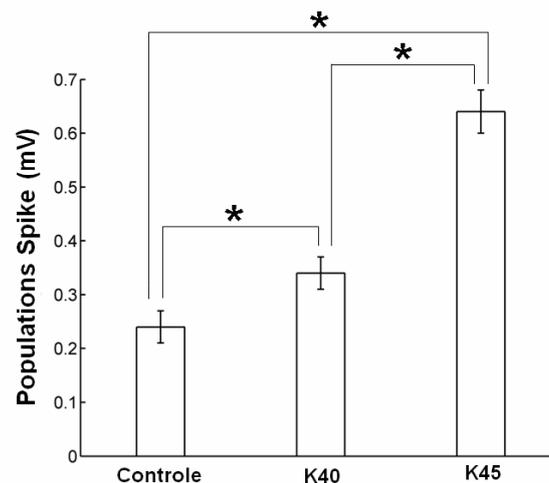


Figura IV.3 - Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro PS dos grupos Controle, K40 e K45.

No gráfico da Figura IV.4 estão apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrão encontrados para o parâmetro Amax de cada grupo. Esses valores foram iguais a $2,95 \pm 0,43$, $4,49 \pm 0,39$ e $8,33 \pm 0,63$ mV, respectivamente para os grupos Controle, K40 e K45. Foram encontradas diferenças significativas entre todas as médias comparadas e um $p\text{-value} \cong 0$.

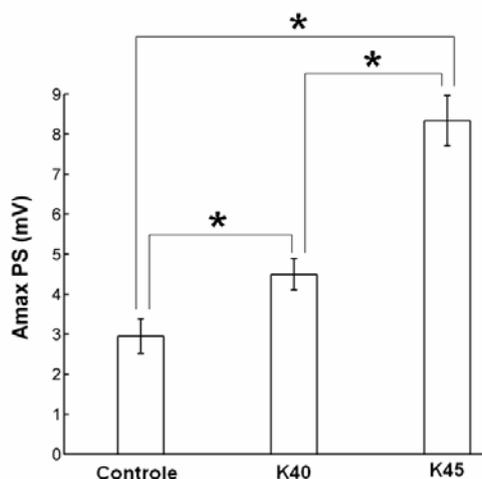


Figura IV.4 - Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro Amax dos grupos Controle, K40 e K45.

Os valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro DE foram iguais a $18,86 \pm 1,15$, $20,90 \pm 3,59$ e $23,22 \pm 0,70$ s, respectivamente para os grupos Controle, K40 e K45. Esses resultados estão apresentados no gráfico da Figura IV.5. Foi encontrada diferença significativa entre as médias comparadas dos grupos Controle e K45. Essa análise teve como resultado um $p\text{-value}=0,0011546$.

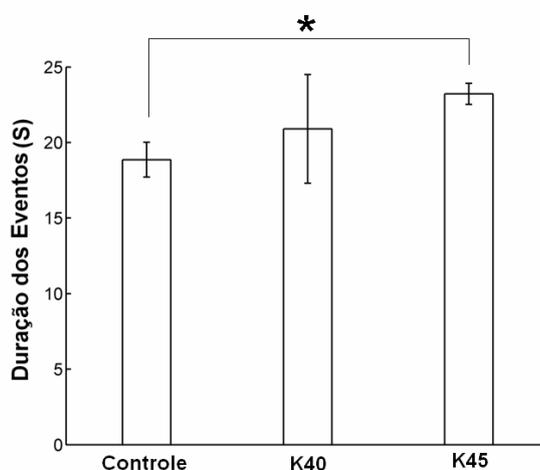


Figura IV.5 - Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro DE dos grupos Controle, K40 e K45

O gráfico da Figura IV.6 apresenta os valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro IE em cada grupo. Esses valores foram iguais a $35,96 \pm 1,96$, $72,11 \pm 8,11$, $50,62 \pm 1,77$ s, respectivamente para os grupos Controle, K40 e K45. Foram encontradas diferenças significativas entre todas as médias comparadas e um $p\text{-value} \cong 0$.

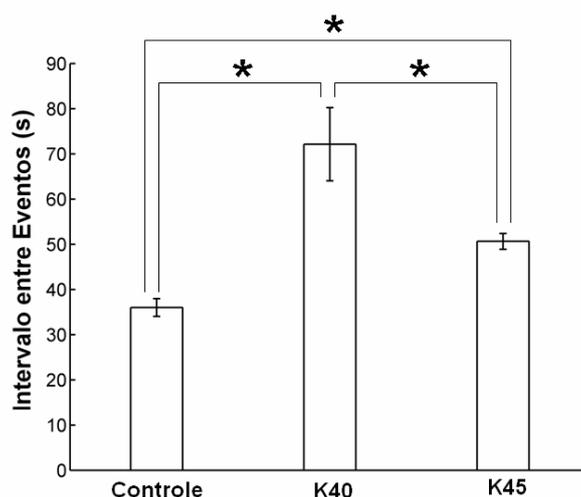


Figura IV.6 - Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro IE dos grupos Controle, K40 e K45.

Diante dos dados apresentados é possível perceber que o PE de animais kindelizados com a concentração de 40mg/kg de PTZ, quando comparado ao PE de animais controle, apresentou aumento significativo dos parâmetros PS, Amax, DC e IE. Já o PE de animais kindelizados com a concentração de 45mg/kg, quando comparado ao PE de animais controle, apresentou aumento significativo em todos os parâmetros do PE, com exceção do parâmetro LT, que apresentou redução significativa.

Entre os dois grupos kindelizados, observou-se um aumento significativo dos parâmetros PS, Amax e DC, quando a concentração de PTZ para a kindelização foi aumentada. Os parâmetros IE e a LT foram significativamente menores em experimentos com animais kindelizados com concentração de 45mg/kg de PTZ.

Na Figura IV.7 são apresentados trechos típicos de cada grupo, assim denominados por apresentarem parâmetros cujos valores se aproximam mais dos valores médios de cada grupo.

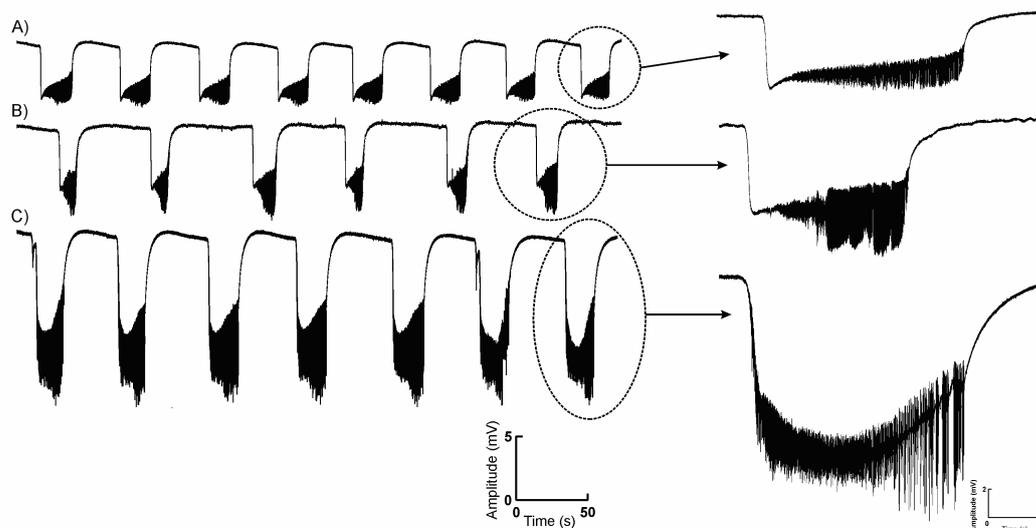


Figura IV.7 - Trechos típicos do PE extracelular de cada grupo. A) Grupo controle. B) Grupo dos animais kindelizados com a concentração de 40mg/kg de PTZ. C) Grupo dos animais kindelizados com a concentração de 45mg/kg de PTZ

IV.3 - Histoquímica

IV.3.1 - Análise Qualitativa

Para análise qualitativa da CG do GD do hipocampo de animais kindelizados nas diferentes concentrações e de animais controle foi utilizado o método de coloração Nissl. A análise qualitativa das lâminas indicou poucas variações ao longo do GD do hipocampo das fatias de animais controle. Na Figura IV.8 apresenta-se um exemplo típico de uma lâmina, onde se pode observar o GD do hipocampo de um animal controle.

Já a análise qualitativa das fatias de animais que receberam PTZ mostrou o surgimento de “manchas brancas”, com aspecto de “vesícula”, em alguns trechos do GD, que parecem ser lesões. Foi verificada a perda da citoarquitetura normal do GD do hipocampo, caracterizada por denso empacotamento normal das células. Esse empacotamento foi substituído por zonas de palidez que parecem estar relacionadas a um quadro de tumefação (edema). Microscopicamente (ampliação de 100 vezes) foi possível verificar em algumas células a perda de corpúsculos de Nissl (retículo endoplasmático) e o núcleo excêntricamente localizado, deslocado para a periferia.

Exemplos dessas lesões na região do GD estão indicadas nas Figuras IV.9 e IV.10, com imagens de lâminas de animais kindelizados concentrações de 40 e 45mg/kg de PTZ, respectivamente. Por outro lado, na Figura IV.11 é apresentada a imagem da lâmina de um animal que recebeu seis aplicações de PTZ, mas que apesar de não ter sido kindelizado, apresentou uma intensa incidência de lesões.

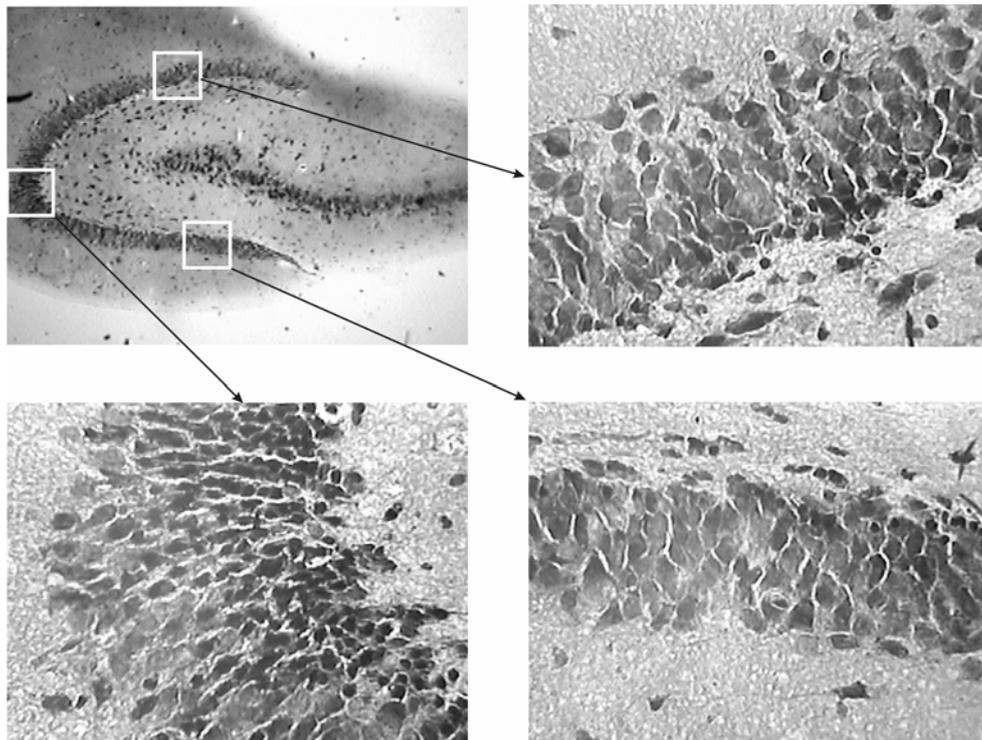


Figura IV.8 - GD da fatia hipocampal de animal controle

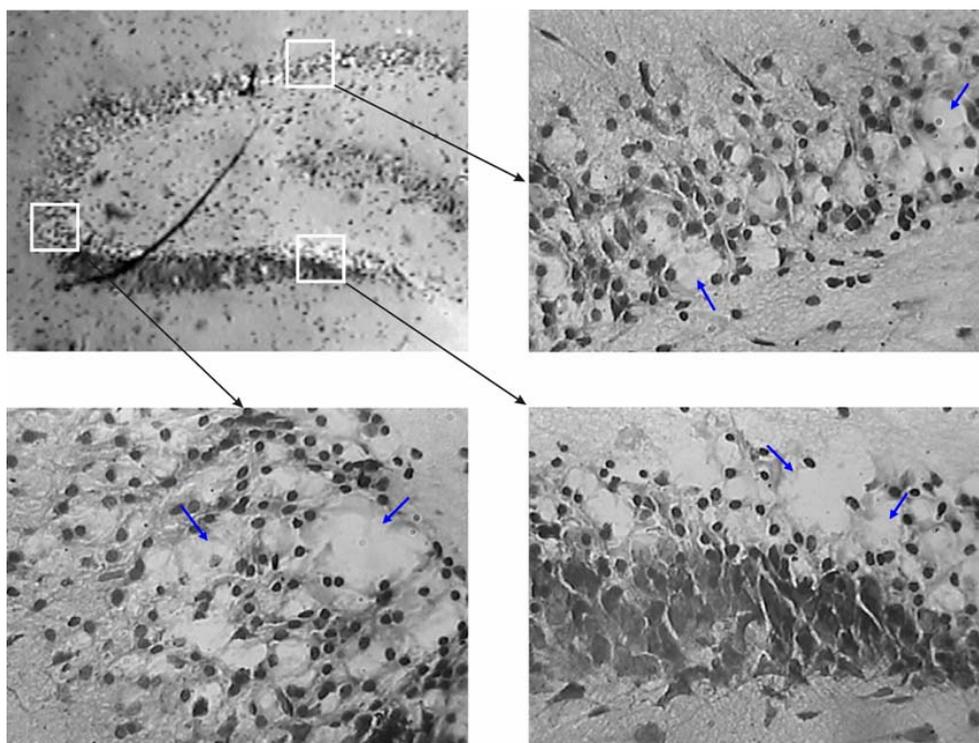


Figura IV.9 - GD da fatia hipocampal de animal kindelizado (40mg/kg PTZ). Setas azuis indicam exemplos de lesões.

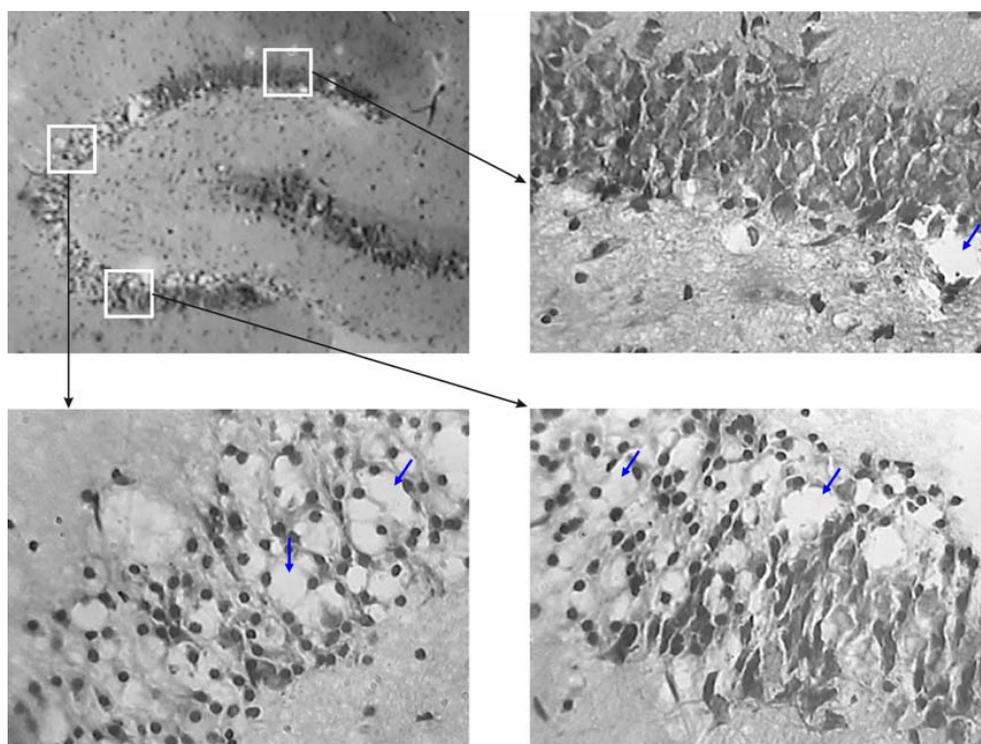


Figura IV.10 - GD da fatia hipocampal de animal kindelizado (45mg/kg PTZ) - Setas azuis indicam exemplos de lesões.

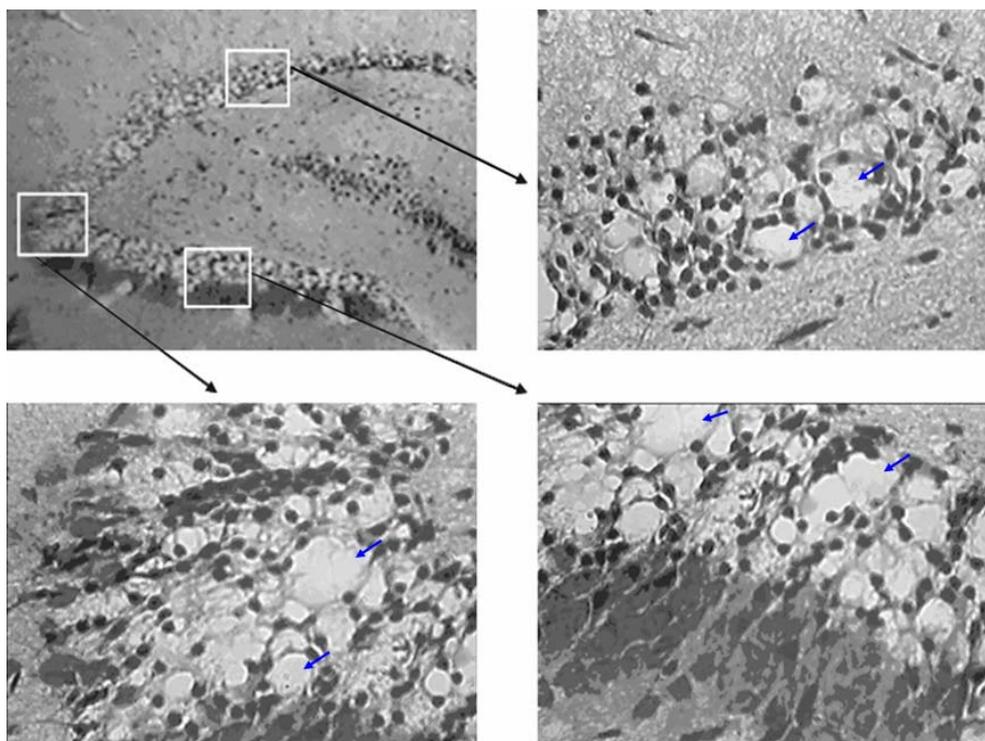


Figura IV.11 - GD da fatia hipocampal de animal que, apesar de não ter sido kindelizado, recebeu 6 aplicações de PTZ. Setas azuis indicam exemplos de lesões.

IV.3.2 - Cálculo da Densidade Celular

Utilizando-se o método de comparações múltiplas e análise de variância, com nível de significância 5% ($\alpha = 0.05$), para comparar a densidade celular dos grupos em regiões específicas do GD, foi possível verificar que os animais kindelizados nas diferentes concentrações apresentaram densidade celular menor do que os animais controle em todas as regiões do GD, ou seja, nas regiões SP, AP e IP do GD.

Os valores encontrados para o *p-value* foram iguais a 0,0006, 0,0008 e 0,000058, para as regiões SP, AP e IP, respectivamente. Como os valores encontrados foram menores que 0,05, pode-se dizer que existem diferenças significativas entre as médias comparadas.

Foram encontradas diferenças significativas entre as médias comparadas dos grupos Controle e K40 e Controle e K45, em todas as regiões do GD. O gráfico da Figura IV.12 apresenta os valores médios da densidade celular (célula/ μm^3), com os respectivos desvios padrão de cada grupo comparado.

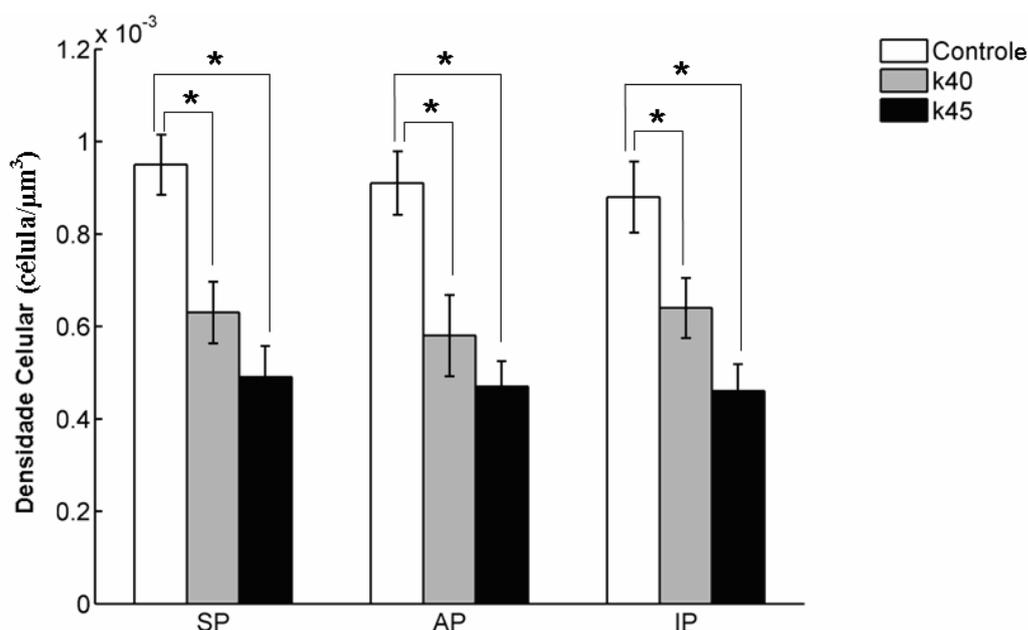


Figura IV.12 - Densidade celular das regiões SP, AP e IP do GD do hipocampo dos animais

O método de comparações múltiplas e análise de variância, com nível de significância 5% ($\alpha = 0.05$), também foi adotado para comparar a densidade celular entre os grupos na região total do GD e do entorno do eletrodo, para cada fatia utilizada no registro do PE. Os resultados indicaram diferenças significativas entre as médias comparadas dos grupos Controle e K40 e Controle e K45, nas duas regiões de análise.

Foi encontrado um $p\text{-value} = 3,54 \times 10^{-5}$, para a comparação dos valores da densidade celular dos grupos na região do eletrodo e um $p\text{-value} = 6,20 \times 10^{-5}$, para a comparação dos valores da densidade celular dos grupos na região total do GD.

Utilizando-se o teste t Student, com nível de significância igual a 5%, também foi possível comparar a densidade celular entre a região total do GD e a região do entorno do eletrodo para cada grupo de animais, permitindo verificar que não existem diferenças significativas entre as médias comparadas. Os valores encontrados para o $p\text{-value}$ foram iguais a 0,2632, 0,4134 e 0,9526, para os grupos C, K40 e K45, respectivamente.

O gráfico da Figura IV.13 apresenta os valores médios encontrados para a densidade celular ($\text{célula}/\mu\text{m}^3$) dos grupos com os respectivos desvios padrão, tanto na região total do GD como na região do entorno do eletrodo.

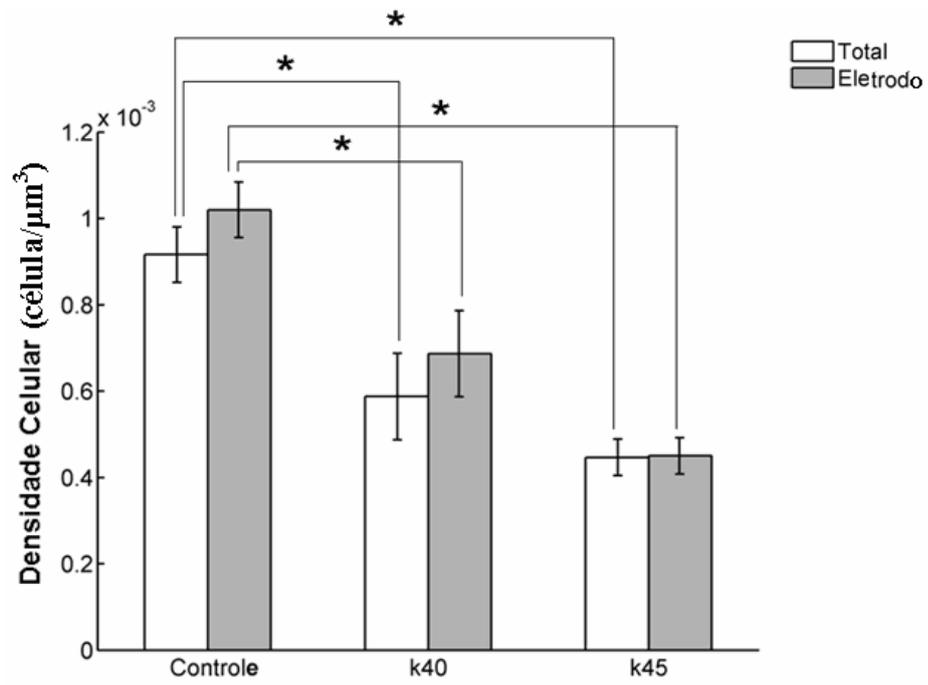


Figura IV.13 - Densidade celular total do GD e da região do entorno do eletrodo

V - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Com o processo de kindelização realizado, observou-se que, diferentemente do kindling elétrico de amígdala (modelo de crises parciais complexas), que necessita de, aproximadamente, 15 sessões para efetivação do kindling, poucas sessões são necessárias para indução com PTZ. Os animais kindelizados atingiram a kindelização até a 3^a ou 4^a aplicação da droga. Por outro lado, o índice de mortalidade observado foi no entorno de 56%. Esse alto índice, acreditamos, deve estar relacionado com a toxicidade do PTZ. Considerando-se o índice de mortalidade em função da dose de PTZ para o processo de kindelização, a menor mortalidade verificada para a maior dose parece estar associada ao fato de animais tratados à concentração de 45mg/kg de PTZ apresentarem maior chance de kindelização. Esse fato, provavelmente, ao reduzir o número de animais submetidos à continuação das sessões de aplicação da droga, resultou em um menor percentual de mortalidade. Complementando essa idéia, os resultados sugerem que a utilização de uma maior dose de PTZ parece ter induzido o mecanismo de defesa dos animais a atuar de forma mais eficiente, resultando também em uma maior resistência às crises nas aplicações subseqüentes da droga.

A kindelização com dosagem maior de PTZ (45mg/kg) demonstrou efeitos favoráveis à indução de crises não só para a aplicação aguda. Seus efeitos refletem ainda posteriormente, quando da indução de crises não-sinápticas em fatias de hipocampo dos animais tratados. Isso é demonstrado pela redução do parâmetro latência, LT, em função da concentração de PTZ, apontando que maiores concentrações da droga para a kindelização implicam em maior predisposição à indução de crises não-sinápticas. Esses efeitos posteriores do PTZ ficam ainda evidentes na morfologia dos eventos epileptiformes.

Proposições teóricas sobre a gênese do DC apontam para uma origem eletroquímica desse potencial (ALMEIDA et al., 2004). Simulações computacionais mostram que a provável origem do DC são variações locais nas concentrações iônicas extracelulares. Essas alterações seriam responsáveis pela formação de potenciais de Nernst ao longo do espaço extracelular e um importante mecanismo de acoplamento lento das atividades neuronais, também chamado de flutuações iônicas (JEFFERYS, 1995). Os PS's, associados a mecanismos acopladores rápidos, tais como efeito de campo e conexões eletrotônicas (TAYLOR e DUDEK, 1982) são variações rápidas do

potencial extracelular, com a morfologia espiculada de um potencial de ação invertido, oriundos da somação de campos elétricos gerados por disparos síncronos de potências de ação por células neuronais do entorno do sítio de medição. A duração do evento, caracterizada pelo parâmetro DE, de acordo com simulações computacionais (ALMEIDA et al., submetido), é modulada pela relação entre as correntes de influxo e efluxo de Na^+ , respectivamente, pelos canais iônicos e pela bomba de Na/K. De acordo com esse modelo teórico, a duração do evento consiste do intervalo de tempo estabelecido entre o ponto 1º ponto crítico, definido pelo momento em que o influxo de Na^+ pelos canais supera seu efluxo pela bomba de Na/K, e o 2º ponto crítico, definido pelo momento no qual o efluxo de Na^+ pela bomba supera seu influxo pelos canais. Por outro lado, o parâmetro IE é definido pelo intervalo de tempo entre o 2º ponto crítico de um evento e o 1º ponto crítico do evento subsequente. Portanto, as tendências de variação dos parâmetros, observadas para os grupos estudados, que foram: aumento de DC, PS, DE e redução de IE (com o aumento da dose) e LT, evidenciam de forma clara que a kindelização com PTZ favorece a indução de eventos epileptiformes não-sinápticos.

Em particular, o aumento observado dos PS's corrobora os achados de RÜTHRICH et al. (1996, 2001) e KRUG et al. (1997), que observaram que o kindling com PTZ induz uma nova forma de potenciação, caracterizada pelo aumento dos potenciais de campo evocados no GD, depois da aplicação de pequenas doses teste de PTZ em animais já kindelizados. Hassan (2000) também observou que 48 horas após a estimulação tetânica do GD, os animais que recebem intraperitonealmente uma dosagem de 20 mg/kg de PTZ apresentam aumento da amplitude dos PS's até 24 horas depois da injeção da droga. A ação do PTZ reduzindo as correntes de K^+ dependente de voltagem, para potenciais transmembrânicos ligeiramente negativos e para potenciais positivos, conforme observado por MADEJA et al. (1996), pode resultar em aumento da amplitude os potenciais de ação e, por conseguinte, dos PS's. Entretanto, como observam os próprios autores, os resultados obtidos foram baseados na perfusão de oócitos de *Xenopus laevis* com PTZ, e não se pode afirmar por quanto tempo persistem os efeitos do PTZ no tecido. Portanto, pode-se suspeitar que esses efeitos possam ser reproduzidos no hipocampo, apesar de serem ainda necessárias observações diretas sobre essa estrutura cerebral.

O surgimento de lesões na CG do GD, como mostram as análises histológicas, ficando clara a redução da densidade celular, com características de processos inflamatórios, possivelmente originados da reação do tecido à agressão local induzida pelo PTZ, pode ajudar a entender as alterações observadas no PE. VEZZANI (2006) aponta que a presença de reações inflamatórias em pessoas com vários tipos de distúrbios epilépticos e causadas por diferentes origens sugere hipóteses sobre a etiologia de inflamações no desenvolvimento de epileptogêneses e na ocorrência de crises espontâneas. Dentre os efeitos da agressão local do PTZ no tecido deve-se considerar também um possível desencadeamento da morte neuronal por necrose, que habitualmente provoca inflamação no local afetado e que também pode ser desencadeada pelo influxo exagerado de cálcio nas células. Esse influxo anormal de cálcio nas células já foi verificado em trabalhos anteriores que indicam que kindling com PTZ conduz a aumentos da densidade e da sensibilidade dos receptores NMDA na região do hipocampo (SCHROEDER et al., 1998) e também a aumentos do número de locais de ligação dos receptores AMPA, principalmente daqueles que contém subunidades permeáveis ao cálcio (EKONOMOU et al., 2001). Além disso, na análise histológica das fatias, principalmente na análise da redução da densidade celular, pode-se considerar a possível indução de edema celular no hipocampo de animais kindelizados. Acredita-se que concentrações excitotóxicas de glutamato causam despolarização excessiva do neurônio pós-sináptico e, conseqüentemente distúrbios da homeostasia iônica e energética, ativação de enzimas líticas mediadas por cálcio, geração de radicais livres, lesão mitocondrial e edema osmótico, podendo levar à lise celular (BARBOSA et al., 2006). As células afetadas por esse distúrbio podem apresentar aumento de volume (reduzindo o EEC) e uma coloração mais pálida, como sugerem os nossos resultados.

Processos degenerativos, caracterizados por alterações ultraestruturais em neurônios e glias, provavelmente induzidos por excitotoxicidade, foram observados em gânglios de *Helix pomatia* perfundidos com PTZ (Schulze-Bonhage et al., 1995). Os autores observaram, ainda, uma possível ação fagocitótica glial, permitindo especular sobre efeitos secundários atuando nas atividades neuronais. O mais importante seria a redução da capacidade de ativação das glias na regulação das concentrações de K^+ extracelular, o que, segundo os autores, pode reverter em despolarização neuronal, influxo de Ca^{++} e degeneração neuronal secundária. Uma redução da função regulatória da $[K^+]_o$, mediada pelas glias, pode explicar o aumento da componente DC, observado

no presente trabalho, normalmente associado com o aumento da $[K^+]_o$. Outro fator que pode contribuir para o aumento da componente DC é a redução do espaço extracelular e o aumento da tortuosidade do meio. A ocorrência de "sprouting" das fibras musgosas do GD (HASSAN et al., 2000) pode implicar nessas alterações.

O aumento da $[K^+]_o$ reportado, aliado à redução da expressão de KCC2 e ao aumento da expressão de NKCC1, podem implicar em aumento da $[Cl^-]_i$. Apesar das variações na expressão desses cotransportadores terem sido evidenciadas, até o momento, apenas em modelos de indução de kindling elétrico (RIVERA et al., 2000; OKABE et al., 2002), é bem provável que essas variações ocorram em modelos de indução de kindling com PTZ, uma vez que as alterações na expressão dos cotransportadores de cloreto podem estar relacionadas também à indução de lesões no tecido (COULL et al., 2003; JIN et al., 2005).

A relação entre a alta $[K^+]_o$ e o acúmulo de $[Cl^-]_i$ já foi relatada em trabalhos anteriores. JENSEN et al. (1993) e, mais recentemente, por meio de simulações computacionais, ALMEIDA et al. (2008) observaram que à elevação da $[K^+]_o$ corresponde aumento da $[Cl^-]_i$. Essa dependência entre os dois íons verificou-se ser mediada pelos cotransportadores KCC2 (DeFAZIO et al., 2000). De acordo com PAYNE et al. (1997), sob baixas $[Cl^-]_i$ e altas $[K^+]_o$, condições termodinâmicas podem induzir os cotransportadores a atuar em sentido reverso, acumulando Cl^- intracelular. No segundo caso, observado em injúrias crônicas do neocórtex (JIN et al., 2005) e em camundongos kindelizados (RIVERA et al., 2002), indicam um impedimento da extrusão de Cl^- pelos KCC2, associada à redução da expressão desses cotransportadores, após injúria e kindelização. Nas duas situações, o aumento da $[Cl^-]_i$ aumenta a excitabilidade. Isso deve implicar em aumento do influxo de Na^+ relativamente ao seu efluxo pela bomba de Na/K, aumentando a duração do evento, portanto da componente DE, e diminuindo o intervalo entre eventos, quantificado pela redução do parâmetro IE, justificando as observações feitas para os animais kindelizados com PTZ. Também, a redução do parâmetro LT sugere que a predisposição a indução de crises em fatias de hipocampo de animais kindelizados deve estar associada à redução da expressão de KCC2, muito provavelmente, resultante do mencionado efeito lesional do PTZ.

As alterações no parâmetro IE do PE de animais kindelizados, para os quais observam-se aumentos independentes da concentração, parecem estar associadas à

redução do volume extracelular, implicando em maior eficiência da bomba de Na/K, com conseqüente aumento do período interictal ou IE.

VI - CONCLUSÃO

A kindelização com PTZ promove lesões que favorecem a excitabilidade neuronal e as conexões não-sinápticas, contribuindo para a sustentação das crises epiléticas típicas do modelo experimental, mesmo quando da ausência de mecanismos excitatórios sinápticos. Isso pode explicar situações em que o modelo experimental se demonstra refratário à atuação anti-epileptogênica de drogas de ação sináptica, indicando a possível efetividade do uso de drogas de ação bloqueadora de cotransportadores de cloreto no tratamento das epilepsias.

Propostas para continuação do trabalho

- Investigação da expressão dos cotransportadores KCC2 e NKCC1 no GD do hipocampo de animais kindelizados com PTZ.
- Investigação da atuação de drogas com ação bloqueadora de cotransportadores de cloreto, como a furosemida, por exemplo, em animais kindelizados submetidos à indução de AE's não sinápticas.
- Investigação histológica dos efeitos do PTZ sobre o tecido em intervalos de tempo variados.
- Investigação da distribuição do sprouting no EEC a partir da marcação celular das fatias do hipocampo por meio do método Neo Timm;
- Investigação dos efeitos do bloqueio das conexões-sinápticas em animais submetidos à indução de epilepsia por meio do kindling elétrico de amígdala, com análise da expressão dos cotransportadores de cloreto, do sprouting no EEC e dos efeitos induzidos no GD do hipocampo dos animais em intervalos de tempo variados.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B., LEE M., FAHNESTOCK, M. and RACINE, R.J., 1997, “Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting”, *Brain Research*, v. 775, pp. 193-197.

ALMEIDA, A. C. G., TEIXEIRA, H. Z., DUARTE, M. A., INFANTOSI, A. F. C., 2004, “Modeling extracellular space electrodiffusion during Leão’s spreading depression”, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, v. 51, pp. 450-458.

BARBOSA L. F., MEDEIROS, M. H. G., AUGUSTO, O., 2006, “Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes?”, *Química Nova*, v. 19, pp. 1352-1360.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2002. 855 p.

BECKER, A., GRECKSCH, G. and MATTHIES, H., 1994a, “The influence of diazepam on learning processes impaired by pentylentetrazol kindling”, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 349, pp. 492-496.

BERNARD C., COSSART R., HIRSCH J. C., EXCLAPEZ M. e BEN ARI Y., 2000, “What is GABAergic inhibition? How is modified in epilepsy?”, *Epilepsia*, v. 41, pp. S90-S95.

BIANCHI, M. T., SONG, L., ZHANG, H., MACDONALD, R. L., 2002, “Two different mechanisms of disinhibition produced by GABA_A receptor mutations linked to epilepsy in humans”, *J. Neurosc.*, v. 22, pp. 5321-5327.

BLISS T. V. P., LOMO T., 1973, “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path”, *J Physiol.*, 232(2), pp.331–356.

CARVALHO, R. S., 2003, “*Transições Espontâneas de Burstings Epileptiformes para Depressão Alastrante*”, Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del Rei, MG, Brasil.

CASTELLANO, C., CESTARI, V., CIAMEI, A., 2001, “NMDA receptors and learning and memory processes”, *Bentham Science Publishers*, v. 2, pp. 273-283.

CAVAZOS, J. E., DAS, I., SUTULA, T. P., 1994, “Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures”, *Journal of Neuroscience*, v.14, pp. 3106-3121.

CENDES, F., 2004, “Febrile seizures and mesial temporal sclerosis”, *Current opin. Neurol.*, v.17, pp. 161-164

CLAYTON, G. H., OWENS, G. C., WOLF, J. S. and SMITH, R. L., 1998, “Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex”, *Brain Res Dev*, v. 109, pp. 281-292.

DA SILVA, A.V., CAVALHEIRO, E. A. Epilepsia: uma janela para o cérebro. *Multiciência* 2004, v. 3, artigo 5.

DeFAZIO, R. A., KEROS, S., QUICK, M. W. and HABLITZ, J. J., 2000, “Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons”, *The journal of Neuroscience*, v. 20, pp. 8069-8076.

DELPIRE, E., 2000, “Cation-chloride cotransporters in neuronal communication”, *News Physiol. Sci.*, v. 15, pp. 309–312.

DINOCOURT, C., PETANJEK, Z., FREUND, T. F., BEN-ARI, Y. and ESCLAPEZ, M., 2003, “Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures”, *J. Comp. Neurol.*, v. 459, pp. 407-425.

DODRILL, C. B., WILKUS, R. F., OJEMANN, G. A., WYLER, A. R., VAN BELLE, G. e TAMAS, L., 1986, “Multidisciplinary prediction of seizure relief from cortical resection surgery”, *Ann. Neurol.*, v. 20, pp. 2-12.

DUDEK, F. E., SHAO, L-R, 2003, “Mossy Fiber Sprouting and Recurrent Excitation: Direct Electrophysiologic Evidence and Potential Implications”, *Epilepsy Currents*, v.4, pp. 184-187.

DUNCAN, J. S., SANDER, J. W., SISODIYA, S. M., E WALKER, M. C., 2006, “Adult epilepsy”, *The Lancet*, v. 367, pp. 1087-1100.

DÜR MÜLLER, N., CRAGGS, M., MELDRUM, B. S., 1994, “The effect of the non-NMDA receptor antagonists GYKI 52466 and NBQX and the competitive NMDA receptor antagonist D-CPPene on the development of amygdala kindling and on amygdala-kindled seizures”, v. 17, pp. 167-174.

EKONOMOU, A., SMITH, A. L. and ANGELATOU F., 2001, “Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylentetrazole-induced ‘kindling’ model of epilepsy”, *Molecular Brain Research*, v. 95, pp. 27-35.

ENGEL, J., 1989, *Seizures and Epilepsy*, 1^a ed., Philadelphia, USA, F. A. Davis Company.

FRANKE, H. e KITTNER, H., 2001, “Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentilenetrazol-kindled rats”, *Pharmacol Biochem Behav*, v. 70, pp. 291-303.

FRAZON, R. C., 2002, *Valor Lateralizatório do EEG Interictal na Avaliação Pré-Cirúrgica de Crianças com Epilepsia Lobo-Temporal*. Dissertação de D. Sc, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

FUKUDA, A., MURAMATSU, A., OKABE, A., SHIMANO, Y., HIDA, H., FUJIMOTO, I., NISHINO, H., 1998, "Changes in intracellular Ca^{2+} induced by $GABA_A$ receptor activation and reduction in Cl^- gradient in neonatal rat neo-cortex", *J. Neurophysiol.*, v. 79, pp. 439-446.

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

GODDARD, G. V. and DOUGLAS, R. M., 1975, "Does the engram of kindling model the engram of normal long term memory", *Journal of Canadian Science and Neurology*, v. 2, pp. 385-394.

GUEDES, F. A., GALVIS-ALONSO, O. Y., LEITE, J. P., 2006, "Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais", *J. epilepsy clin. Neurophysiol*, v.12, n^o.1, suppl.1.

HAAS, H. L., JEFFERYS, J. G., 1984, "Low-Calcium Field *Burst* Discharges of CA1 Pyramidal Neurones in Rat Hippocampal Slices", *J. Physiol.*, v. 354, pp. 185-201.

HASSAN, H., POHLE, W., RÜTHRICH, H., BRÖDEMANN, R., E KRUG, M., 2000, "Repeated long-term potentiation induces mossy fibre sprouting and changes the sensibility of hippocampal granule cells to subconvulsive doses of pentylentetrazol", *European Journal of Neuroscience*. v. 12, pp.1509-1515.

HAWRYLAK, N., CHANG, F. L., GREENOUGH, W. T., 1993, "Astrocytic and synaptic response to kindling in hippocampal subfield CA1. II. Synaptogenesis and astrocytic process increases to in vivo kindling", *Brain Res.*, v. 603, pp. 309-316.

HOSOKAWA, J., ITANO, T., USUKI, T., TOKUDA, M., MATSUI, H., JANJUA, N. A., SUWAKI, H., OKADA, Y., NEGI, T., MURAKAMI, T. H., 1995, "Morphological changes in the hippocampus in amygdaloid kindled mouse", *Epilepsy Res.*, v. 20(1), pp. 11-20.

HUANG, R. Q., BELL-HORNER, C. L., DIBAS, M. L., COVEY, D. F., DREWE, J. A., DILLON, G. H., 2001, "Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action", *J Pharmacol Exp Ther.*, v.298, pp.986–995.

IHAN, A., IRAZ, M., KAMISLI, S., YIGITOGU, R., 2006, "Pentylentetrazol-induced kindling seizure attenuated by Ginkgo Biloba extract (EGb 761) in mice", *Progres in Neuro-Phycopharmacology e Biological Psychiatry*, v. 30(8), pp. 1504-1510.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., 1997, "Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures", *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 68, pp. 285-316.

JEFFERYS, J. G., 1995, "Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions", *Physiol. Rev.*, v. 75, pp. 689-723.

JEFFERYS, J. G., HAAS, H. L., 1982, "Synchronized *bursting* of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission", *Nature*, v. 300, pp. 448-450.

JIN, X., HUGUENARD, J. R. e PRINCE, D. A., 2005, "Impaired Cl⁻ extrusion in layer V pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex", *J. Neurophysiol.*, v. 93, pp. 2117-2126.

JUNG, M. A., LAL, H., GATCH, M. B., 2002, "The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent development", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 26, pp. 429-439.

KANAKA, C., OHNO, K., OKABE, A., KURIYAMA, K., ITOH, T., FUKUDA, A., SATO, K., 2001, "The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system", *Neuroscience*, v.104, pp. 933-946.

KORPI, E. R., GRÜNDER, G., LÜDDENS, H., 2002, "Drug interactions at GABA_A receptors", *Progress in Neurobiology*, v. 67, 113-159.

LEITE, J. P., TERRA-BUSTAMANTE, V. C., 1999, “Plasticidade Cerebral e Epileptogênese”, *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 9, pp. 10-14.

LEMOS, T., CAVALHEIRO, E. A., 1995, “Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats”, *Exp Brain Res.*, v. 102, pp. 423-428.

LOPES DA SILVA, F. H., 1990, “Anatomic Organization and Physiology of the Limbic Cortex”, *Physiological Reviews*, v. 70, pp. 453-511.

LÖSCHER, W., 1997, “Animal Models of intractable epilepsy”, *Progress in Neurobiology*, v. 53, pp. 239- 258.

LONGO, B. M. e MELLO, L.E., 1997, “Blockade of pilocarpine- or kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats”, *Neurosci. Lett*, v. 226, pp. 163-166.

LÓPEZ, J., GONZÁLEZ, M. E., LORIGADOS, L., MORALES, L., RIVERÓN, G. E BAUZÁ, J. Y., 2007, “Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy”, *Clinical Biochemistry*, v. 40, pp. 292-298.

LU, J., KARADSHEH, M., and DELPIRE, E., 1999, “Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 in postnatal rat brains”, *J Neurobiol.*, v. 39, pp.558-568.

LUKOMSKAYA, N. YA, RUKOYATKINA, N. I., GORBUNOVA, L. V., MAGAZANIK, L. G. e GMIRO, V. E., 2003, “Studies of the Roles of NMDA and AMPA Glutamate Receptors in the Mechanism of Corasole Convulsions in Mice”, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, v. 34, pp. 783-789.

LUHMANN, H. J. e PRINCE, D. A., 1991, "Postnatal maturation of the GABAergic system in neocortex. *J. Neurophysiol.*", v. 65, pp. 247-263.

LU, J., KARADSHEH, M. and DELPIRE, E., 1999, "Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 in postnatal rat brains", *J. Neurobiol.*, v. 39, pp. 558-568.

MADEJA, M., MUSSHOF, U., LORRA, C., PONGS, O., SPECKMANN, E. J., 1996, "Mechanism of action of epileptogenic drug pentylenetetrazol on a cloned neuronal potassium channel", *Brain Res.*, v. 722, pp. 59-70.

MELDRUM, B. S., 1984, "Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action", *Epilepsia*, v. 25, pp. 140-149.

MORALES-AZA, B. M., CHILLINGWORTH, N. L., PAYNE, J. A. e DONALDON, L. F., 2004, "Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons". *Neurobiology of Disease*, v. 17, pp. 62-69.

MORIMOTO, K., 1989, "Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors", *J. Psychiatry Neurol.*, v. 43, pp. 459-63.

MORIMOTO, K, SATO, H, SATO, K, SATO, S., YAMADA, N., 1997, "BW1003C87 Phenytoin and carbamazepine elevate seizure threshold in the rat amygdala kindling model of epilepsy". *Eur J Pharmacol*, v. 339, pp. 11-15.

NICHOLSON, C., 1979, "Brain cell microenvironment as a communication channel", In *The Neurosciences Fourth Study Program*, pp. 457-476. MIT Press, Cambridge, MA.

NICHOLSON, C., HOUNSGAARD, J., 1983, "Diffusion in the slice microenvironment and implications for physiological studies", *Fed. Proc.*, v. 42, pp. 2865-2868.

NICHOLSON, C., PHILLIPS, J. M., 1981, "Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum", *J. Physiol. Lond.*, v. 321, pp. 225–257.

NICHOLSON, C. and RICE, M. E., 1991, "Diffusion of ions and transmitters in the brain cell microenvironment". In Volume transmission in brain: Novel Mechanisms for neuronal transmission (eds Fuxe K. and Agnati L. F.), pp. 279-294. Raven Press, New York.

OKABE, A., OHNO, K., TOYODA, H., YOKOKURA, M., SATO, K. e FUKUDA, A., 2002, "Amygdala kindling induces upregulation of mRNA for NKCC1, a Na⁺, K⁺ -2Cl⁻ cotransporter, in the rat piriform cortex", *Neuroscience Research*, v. 44, pp. 225-229.

OKAZAKI, M. M., EVENSON, D. A., AND NADLER, J. V., 1995, "Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: Visualization after retrograde transport of biocytin", *J. Comp. Neurol.*, v. 352, pp. 515-534.

OLIVEIRA B. L. M. B., PARREIRAS M. S., DORETTO M. C., 2007, "Epilepsia e Depressão: Falta diálogo entre a Neurologia e a Psiquiatria?", *J Epilepsy Clin Neurophysiol*, v. 13, pp. 109-113.

OLIVEIRA, M. S., FURIAN, A. F., ROYES, L. F. F., FIGHERA, M. R., FIORENZA, N. G., CASTELLI, M., MACHADO, P., BOHRER, D., VEIGA, M., FERREIRA, J., CAVALHEIRO, E. A., MELLO, C. F., 2008, "Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures", *Epilepsy Research*, v. 79, pp. 14-21.

ONO, J., VIETH, R. F. and WALSON, P.D., 1990, "Electrocorticographical observation of seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) injection in rats", *Func. Neurol.*, v. 5, pp. 345-352.

PAN, E., STRINGER, J. L., 1996, “Burst Characteristics of Dentate Gyrus Granule Cells: Evidence for Endogenous and Nonsynaptic Properties”, *J. Neurophysiol.*, v. 75, pp. 124-132.

PASTOR, J., UZCÁTEGUI, Y. G., GAL-IGLESIAS, B., ORTEGA, G. J., SOLA, R. G., MENÉNDEZ DE LA PRIDA, L., 2006, “Bases fisiopatológicas de la epilepsia del lóbulo temporal: estudios en humanos y animales”, *Rev. Neurol.* 2006, v. 42, pp. 663-673.

PAVLOVA, P. V., YAKOVLEV, A. A., STEPANICHEV, M. YU. and GULYEVA, N. V., 2006, “Pentylentetrazol kindling in rats: is neurodegeneration associated with manifestation of convulsive activity?”, *Neuroscience and Behavioral*, v. 36, pp. 746-748.

PAYNE, J. A., STEVENSON, T. J., DONALDSON, L. F., 1996, “Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporte in rat brain. A neuronal-specific isoform”, *J. Biol. Chem.*, v. 271, pp. 16245-16252.

PAYNE, J., 1997, “Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for $[K^+]_0$ regulation”, *J. Physiol Cell Physiol* , v. 273, pp. 1516-1525.

PEREIRA, L. S., 2005 “As Conexões Sinápticas e Não-sinápticas no Hipocampo e a Propagação da Depressão Alastrante”. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del-Rei, MG, Brasil”.

PHILLIPS, J. M., NICHOLSON, C., 1979, “Anion Permeability in Spreading Depression Investigated with Ion Sensitive Microelectrodes”, *Brain Res.*, v. 173, pp. 567-571.

PINEL, J. P., SKELTON, R., MUCHA, R. F., 1976, “Kindling-related changes in afterdischarge thresholds ”, *Epilepsia*, v.17, pp. 197–206.

PITKÄNEN, A., 2006, “New data suggest that discontinuation of status epilepticus is not necessary for antiepileptogenic effect in immature brain”, *Epilepsy Currents*, v.6, pp. 170-172.

PLOTKIN, M. D., SNYDER, E. Y., HEBERT, S. C., e DELPIRE, E., 1997, “Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain”, *J. Neurobiol*, v. 33, pp. 781-795.

POST, R. M., 2007, “Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena”, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 31, pp. 858–873

RACINE R. J., 1972, “Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure”, *Electroencephalography Clinical Neurophysiology*, v. 32, pp. 281-94.

RAMIREZ, J. J., MCQUILKIN, M., CARRIGAN, T., MACDONALD, K., KELLEY, M. S., 1996, “Progressive entorhinal cortex lesions accelerate hippocampal sprouting and spare spatial memory in rats”, *Proc Natl Acad Sci*, v. 93, pp.15512-15517.

RICE, M. E., NICHOLSON, C., 1987, “Interstitial ascorbate in turtle brain is modulated by release and extracellular volume change”, *J. Neurochem.*, v. 49, pp. 1096-1104.

RIVERA, C., VOIPIO, J., PAYNE, J. A., RUUSUVUORI, E., LAHTINEN, H., LAMSA, K., PIRVOLA, U., SAARMA, M. e KAILA, K., 2000, “The K^+/Cl^- cotransporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation”, *Nature*, v.397.

RIVERA, C., LI H., THOMAS-CRUSELLS, J., LAHTINEN, H., VIITANEN, T., NANOBASHVILI, A., KOKAIA, Z., AIRAKSINEN, M., VOIPIO, J., KAILA, K., e SAARMA, M., 2002, “BDNF-induced TrKB activation down-regulates the K^+-Cl^- cotransporter KCC2 an impairs neuronal Cl^- extrusion”, *The Journal of Cell Biology*, v.159, pp. 747-752.

ROSSI, J., 1996, "Sensitization induced by kindling and kindling-related phenomena as a model for multiple chemical sensitivity", *Toxicology*, v. 111, pp. 87-100.

RÜTHRICH, H., GRECKSCH, G., BECKER, A. and KRUG, M., 1996, "Development of long-lasting Potentiation effects in the dentate gyrus of pentylentetrazol-kindled rats", *Physiol. Behav.*, v. 60, pp. 455-462.

SCHROEDER, H., BECKER, A., HOELLT, V., 1998, "Sensitivity and density of glutamate receptor subtypes in the hippocampal formation are altered in pentylentetrazole-kindled rats", *Exp Brain Res.*, v.120, pp. 527-530.

SCHULZE-BONHAGE, A., WIEMANN, M., ALTRUP, U., WITTKOWSKI, W., SPECKMANN, E-J., 1995, "Epileptic discharges induced by pentylentetrazol: ultrastructural alterations in identified neurons and glial cells (*Helix pomatia*), *Epilepsy Research*, v.22, pp. 23-24.

SILVA, S. F., 2000, "Análise de Sincronismo entre o Potencial Extracelular e o Sinal Óptico Intrínseco em Retina de Aves Durante a Depressão Alastrante". Dissertação de M. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SLOVITER, R.S., 1991, "Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy", *Hippocampus*, v. 1, pp. 41-66.

SNEAD, O.C., 1992, "Evidence for G protein modulation of experimental- generalized absence seizures in rat", *Neurosci Lett* , v. 148, pp. 15– 8.

SORIANO, E. e FROTSCHER, M., 1994, "Mossy cells of the rat fascia dentate are glutamate-immunoreactive", *Hippocampus*, v. 4, pp. 65-69.

SQUIRES, R. F., SAEDERUP, E., CRAWLEY, J. N., SKOLNICK, P., PAUL, S. M., 1984, "Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with action on GABA / benzodiazepine / picrotoxin receptor complex in brain", *Life Sci*, v. 35, pp.1439-1444.

STEWART, O., COTMAN, C. W. and LYNCH, G. S., 1974, "Growth of a new fiber projection in the brain of adult rats: Re-innervation of the dentate gyrus by the contralateral entorhinal cortex following ipsilateral entorhinal lesions", *Experimental Brain Research*, v. 20, pp. 45-66.

STRIPLING, J. S., RUSSELL, R. D., 1985, "Effect of cocaine and pentylentetrazol on cortical kindling", *Pharmacol Biochem Behav*, v. 23, pp. 573-81.

SUTULA, T., KOCH, J., GOLARAI, G., WATANABE, Y. and MCNAMARA J. O., 1996, "NMDA Receptor Dependence of Kindling and Mossy Fiber Sprouting: Evidence that the NMDA Receptor Regulates Patterning of Hippocampal Circuits in the Adult Brain", *The Journal Neuroscience*, v. 16, pp. 7398-7406.

SUTULA, T., CASCINO, G., CAVAZOS, J., PARADA, I., RAMIREZ, L., 1989, "Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe", *Annals of Neurology*, v. 26, pp. 321-330.

SUTULA, T., HE, X. X., CAVAZOS, J. and SCOTT, G., 1988, "Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity", *Science*, v. 239, pp. 1147-1150.

SYKOVÁ, E., 1991, "Activity-related ionic and volume changes in neuronal microenvironment". In *Volume transmission in brain: Novel Mechanisms for neuronal transmission* (eds Fuxe K. and Agnati L. F.), pp. 217-336. Raven Press, New York.

SYKOVÁ, E., 1992, "Ionic and volume changes in the microenvironment of nerve and receptor cells", *Progress in Sensory Physiology*, v. 13, pp. 1-167.

SAYIN, U., OSTING, S., HAGEN, J., RUTECKI, P., SUTULA, T., 2003, "Spontaneous Seizures and Loss of Axo-Axonic and Axo-Somatic Inhibition Induced by Repeated Brief Seizures in Kindled Rats", *The Journal of Neuroscience*, v. 23(7), pp. 2759.

- FROTSCHER, M., JONAS, P., SLOVITER, R. S., 2006, "Synapses formed by normal and abnormal hippocampal mossy fibers", *Cell Tissue Res.*, v. 326, pp. 361-367.
- TAYLOR, C. P., DUDEK, F. E., 1982 "Synchronous Neural Afterdischarges in Rat Hippocampal Slices without Active Chemical Synapses", *Science*, v. 218, pp. 810-812.
- TEYLER, T. J., 1980, "Brain slice preparation: hippocampus", *Brain research bulletin*, v. 5, pp. 391-403.
- TRAYNELIS, S. F., DINGLEDINE, R., 1989, "Role of Extracellular Space in Hyperosmotic Suppression of Potassium-Induced Electrographic Seizures", *J. Neurophysiol.*, v. 61, pp. 927-938.
- TURSKI, W. A., CAVALHEIRO, E. A., SCHWARZ, M., CZUCZWAR, S. J., KLEINROK, Z., TURSK, L., 1983, "Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study". *Behav Brain Res*, v.9, pp.315-35.
- VEZZANI, A., BARTFAI, T., 2006, "Role of Brain Inflammation and Angiogenesis in Epileptogenesis", FUNDEB.
- VORISEK, I., SYKOVÁ, E., 1997, "Ischemia-Induced changes in the extracellular space diffusion parameters, K^+ , and pH in the developing rat cortex and corpus callosum", *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.17, pp. 191-203.
- XIONG, Z. Q., STRINGER, J. L., 2000, "Sodium Pump Activity, not Glial Spatial Buffering, clears Potassium after Epileptiform Activity Induced in The Dentate Gyrus", *J. Neurophysiol.*, v. 83, pp. 1443-1451.
- YI, S. D., LEE, T. H., PARK, Y. C., 1995, "Mossy Fiber Synaptic Reorganization of Dentate Gyrus by Pentylenetetrazol Kindling Rats", *Korean Neurol Assoc*, v.13, pp. 239-248

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](#)