

INVESTIGAÇÃO DA REFRACTORIEDADE DAS ATIVIDADES EPILEPTIFORMES  
NÃO-SINÁPTICAS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO  
EXTRACELULAR

Bruno da Silva Brandão Gonçalves

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

SÃO JOÃO DEL-REI, MG - BRASIL

MARÇO DE 2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

GONÇALVES, BRUNO DA SILVA  
BRANDÃO

Investigação da refratariedade das  
atividades epileptiformes não-sinápticas  
sob diferentes concentrações de potássio  
extracelular [MG] 2009

XI, 69 p. 29,7 cm (FIQUINE/UFSJ,  
M. Sc., Neurofísica, 2009)

Dissertação – Universidade Federal de  
São João del-Rei, FIQUINE

1. Medidas Experimentais. 2. Modelagem  
Computacional de Fenômenos

Biológicos.

I. FIQUINE/UFSJ II. Título ( série )

*A minha amiga e esposa Rafaela, que  
humanizou a minha existência. A todos que  
torcem pelo nosso sucesso.*

## **Agradecimentos**

Ao Professor Antônio-Carlos Guimarães de Almeida, pela orientação e oportunidade de realizar esse trabalho.

À aluna de doutorado Danielle e ao Professor Antônio Márcio pelo auxílio nas simulações.

Aos amigos pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, Sônia e Alberto, pelas orações e apoio incondicional.

Aos meus sogros, Chico e Madu, pelo acolhimento.

Aos funcionários José da Silva e Mariano que cuidam do biotério, e a Dalva e Simone que cuidam do Lanec.

Aos professores e demais colegas do Lanec pelo auxílio na realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo indispensável auxílio financeiro.

... e a Deus, por tudo.

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

INVESTIGAÇÃO DA REFRAATARIEDADE DAS ATIVIDADES EPILEPTIFORMES  
NÃO-SINÁPTICAS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO  
EXTRACELULAR

Bruno da Silva Brandão Gonçalves

Março/2009

Orientador: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Co-orientador: Antônio Márcio Rodrigues

Programa: FIQUINE

Departamento: Engenharia de Biosistemas

Os estados de excitabilidade e refratariedade ao longo de atividades epileptiformes induzidas na presença exclusiva de mecanismos não-sinápticos de acoplamento permanecem ainda com poucos estudos. Neste trabalho investigou-se como os mecanismos não-sinápticos, induzidos em fatias de hipocampo por meio de perfusão com zero-cálcio e alto potássio, modulam a excitabilidade interictal utilizando-se dois protocolos. No primeiro, os estímulos foram aplicados após eventos espontâneos, em diferentes intervalos de tempo e intensidade, permitindo avaliar a refratariedade pós-evento. No segundo protocolo, após indução das atividades espontâneas, estas foram suprimidas reduzindo-se o nível de potássio extracelular. Pares de estímulos foram aplicados com diferentes intervalos inter-estímulos e com diferentes concentrações de potássio extracelular. Simulações computacionais dos mesmos experimentos foram utilizadas para análise dos resultados experimentais e identificação dos mecanismos biofísicos envolvidos. Os resultados permitiram identificar três sub-períodos que constituem o período interictal. BI, caracterizado por uma excitabilidade elevada, imediatamente posterior ao período ictal, BII, exibindo um aumento da refratariedade à deflagração de eventos. BIII, caracterizado por um aumento da excitabilidade pré-ictal. Conjectura-se que esses três sub-períodos correspondam,

respectivamente, às ocorrências de atividades pós-ictais, depressão interictal e atividades pré-ictais.

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

INVESTIGATION OF NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITIES  
REFRACTORINESS UNDER DIFFERENT POTASSIUM EXTRACELLULAR  
CONCENTRATION

Bruno da Silva Brandão Gonçalves

March/2009

Advisor: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Co-Advisor: Antônio Márcio Rodrigues

Program: FIQUINE

Department: Biosystems Engineering

The study of the excitability and refractoriness along of the epileptiform activities induced by non-synaptic coupling mechanisms is still not very well explored. In the present work, the effects of the non-synaptic mechanisms on the interictal excitability and refractoriness were investigated along of activities induced in hippocampus slices by means of zero-calcium and high potassium solution. Two protocols were utilized. First, the stimuli were applied after spontaneous events, at different time intervals and intensity, allowing evaluating the refractoriness pos-events. Second, the spontaneous activities were suppressed reducing the extracellular potassium at different levels and pairs of events were deflagrated by paired pulse stimulation. Computational simulations of the same experiments were performed aiming at to analyze the experimental data and to identify the biophysical mechanisms involved. The results allowed identifying three different sub-periods along of the interictal interval: BI, characterized by high excitability after ictal; BII, refractive to inducing events; BIII, the returning excitability. The biophysical mechanisms identified to be related to each sub-period are: post-ictal activity, interictal depression and preictal activity.

# SUMÁRIO

<b><u>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA.....</u></b>	<b><u>3</u></b>
<u>II.1 – Epilepsia .....</u>	<u>3</u>
<u>II.2 – Crises epiléticas.....</u>	<u>4</u>
<u>II.2.1 – Geração de crises epiléticas.....</u>	<u>5</u>
<u>II.2.2 – Sustentação de crises epiléticas.....</u>	<u>9</u>
<u>II.2.3 – Finalização das crises epiléticas .....</u>	<u>11</u>
<u>II.2.4 – Estado pós-ictal .....</u>	<u>13</u>
<u>II.3 – Atividades epileptiformes.....</u>	<u>14</u>
<u>II.3.1 – Atividade epileptiforme não – sináptica (AENS).....</u>	<u>15</u>
<u>II.4 – Refratariedade .....</u>	<u>19</u>
<u>Refratariedade das AENS.....</u>	<u>19</u>
<b><u>CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS.....</u></b>	<b><u>21</u></b>
<u>III. 1 – Preparação experimental.....</u>	<u>21</u>
<u>III. 1.1 – Seleção dos animais.....</u>	<u>21</u>
<u>III.1.2 – Preparação das fatias de hipocampo.....</u>	<u>21</u>
<u>III.1.3 – Soluções utilizadas.....</u>	<u>24</u>
<u>III.2 – Equipamentos utilizados.....</u>	<u>25</u>
<u>III.2.1 – Câmara de perfusão.....</u>	<u>25</u>
<u>III.2.2 – Câmara de Interface.....</u>	<u>26</u>
<u>III.2.3 – Aquisição do potencial elétrico extracelular.....</u>	<u>28</u>
<u>III.2.4 – Sistema de estimulação.....</u>	<u>30</u>
<u>III.2.4.1 – Protocolos de estimulação.....</u>	<u>31</u>
<u>Estudo da influência de estímulos na refratariedade .....</u>	<u>31</u>
<u>Estudo da influência da concentração extracelular de potássio na refratariedade ..</u>	<u>32</u>
<u>III.2.5 – Sistema de visualização e periféricos.....</u>	<u>33</u>
<u>III.3 – Análise do potencial elétrico extracelular.....</u>	<u>34</u>
<u>III.4 – Modelo Computacional.....</u>	<u>36</u>
<b><u>CAPÍTULO IV – RESULTADOS.....</u></b>	<b><u>41</u></b>
<u>IV.1 – Influência do estímulo na refratariedade .....</u>	<u>41</u>
<u>IV.1.2 – Investigação da refratariedade .....</u>	<u>42</u>
<u>Eventos evocados durante o período B-I.....</u>	<u>43</u>

<u>Pós-descargas evocadas durante o período B-II.....</u>	<u>45</u>
<u>Eventos evocados durante o período B-III.....</u>	<u>46</u>
<i>IV.1.2.1 – Excitabilidade e potássio extracelular .....</i>	<i>48</i>
<u>Duração do período B-I em função da [K+]o.....</u>	<u>50</u>
<u>Duração do período B-II em função da [K+]o.....</u>	<u>50</u>
<u>Relação do período B-III em função da [K+]o.....</u>	<u>50</u>
<u>Population Spikes evocados pelo estímulo .....</u>	<u>52</u>
<b><u>CAPÍTULO V – DISCUSSÃO.....</u></b>	<b><u>54</u></b>
<u>Período B-I.....</u>	<u>54</u>
<u>Período B-II.....</u>	<u>55</u>
<u>Período B-III.....</u>	<u>57</u>
<b><u>CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO.....</u></b>	<b><u>58</u></b>
<b><u>CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b><u>60</u></b>

## LISTA DE SÍMBOLOS E NOMEMCLATURAS

Símbolo	Descrição
$\nabla$	Operador Gradiente
$D_j^{gj}$	Constante de difusão do íon $j$ nas <i>gap-junctions</i>
$K_{ADP,P}^i$	Constantes de dissociação de ADP e fósforo
$K_{ATP}^i$	Constantes de dissociação de ATP
$K_{Na}^i$ e $K_K^i$	Constantes de dissociação intracelulares de $Na^+$ e $K^+$
$K_{Na}^o$ e $K_K^o$	Constantes de dissociação extracelulares de $Na^+$ e $K^+$
$\lambda$	Tortuosidade
$\phi$	Fluxo iônico (mM/s)
$\nabla^2$	Operador Laplaciano
$[X]_y$	Concentração do íon $X$ no meio $y$ ( $y = o$ , extracelular; $y = i$ , intracelular). ex: $[K^+]_o$
$A$	Área ( $m^2$ )
$AE$	Atividade epileptiforme
$AENS$	Atividade epileptiforme não-sináptica
$A_{gj}$	Área da <i>gap-junctions</i>
$A_m$	Área da membrana
$C$	Concentração iônica (mM)
CA	Corno de Ammon
CG	Camada granular
DA	Depressão Alastrante
DC	Componente DC
DE	Duração do evento
$D_j$	Constante de difusão iônica do íon $j$ ( $cm^2/s$ )

Símbolo	Descrição
$d_n$	Distância entre o centro do corpo celular neuronal
$E_{Cl}$	Potencial de Nernst de $Cl^-$
$E_K$	Potencial de Nernst de $K^+$
EPI	Estado pós-ictal
$F$	Constante de Faraday (96,487 C/mMol)
FH	Formação hipocampal
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GD	Giro denteado
$I_n^m$	Corrente total de membrana no neurônio
IE	Intervalo entre eventos
FACRE	Fluído artificial céfalo-raquidiano espinal
MAD	Máxima ativação dentada
PA	Potencial de ação
PEE	Potencial elétrico extracelular
PEPS	Potenciais excitatórios pós-sinápticos
PIPS	Potenciais inibitórios pós-sinápticos
$P_j$	Permeabilidade transmembrânica do íon $j$
PRA	Período refratário absoluto
PRR	Período refratário relativo
PS	População de espículas, do inglês, <i>population spike</i>
$Q_{KCC}$	Constante de proporcionalidade do co-transporte KCC
$Q_{NKCC}$	Constante de proporcionalidade do co-transporte NKCC
$t$	Instante de tempo
$V$	Potencial extracelular
$V_g$	Volume glial
$V_m$	Potencial de membrana

Símbolo	Descrição
$V_n$	Volume neuronal
$V_{PA}$	Potencial elétrico no compartimento $(x,y,z)$
$z_j$	Valência do íon $j$

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma classe de desordem neuronal, definida como uma condição neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas recorrentes. O termo crises epiléticas pode ser definido como manifestações clínicas de excessiva e/ou hiper-síncrona atividade anormal de neurônios do córtex cerebral. Para estudo do papel e da importância de determinados mecanismos na geração, sustentação e finalização de crises epiléticas é interessante recorrer a modelos experimentais, cujas atividades, por se assemelharem àquelas epiléticas são denominadas atividades epileptiformes (AE) (ENGEL, 1995).

A formação hipocampal tem sido identificada como importante em processos de geração e sustentação de crises epiléticas. Devido à sua composição estratificada e ao denso empacotamento de células neuronais, essa região facilita a ocorrência de crises epileptiformes, tanto *in vivo* como *in vitro*, em particular a região denominada giro denteado (GD). O GD, acredita-se, funciona como um filtro de entrada que restringe o fluxo de atividades anormais na formação hipocampal (STRINGER *et. al.*, 1989). Uma das estratégias utilizadas para investigar como o GD perde esse papel de filtro, é a indução de *bursts* prolongados, similares aos registrados *in vivo* (SCHWEITZER *et al.*, 1992). Esses *bursts* são produzidos aumentando-se  $[K^+]_o$  e diminuindo  $[Ca^{+2}]_o$  e não requerem transmissão sináptica para sua expressão e são, por isso, denominados atividades epileptiformes não-sinápticas (AENS) (PAN e STRINGER, 1996).

Pouco se sabe sobre as variações de excitabilidade e refratariedade das AENS no decurso de suas ocorrências. Para melhor elucidar essa questão, o presente trabalho teve como objetivo entender como mecanismos não-sinápticos modulam a excitabilidade e refratariedade do período interictal. A investigação constou de três etapas: i) estudo da influência da intensidade de um estímulo na capacidade de se evocar um evento epileptiforme, para cada momento do período interictal; ii) estudo da refratariedade das atividades epileptiformes não-sinápticas sob diferentes condições de excitabilidade; iii) análise dos resultados experimentais, comparativamente às simulações com modelo computacional, verificando a atuação e influência dos principais mecanismos subcelulares.

No capítulo II, é feita uma revisão da literatura, onde são mostradas algumas definições acerca da epilepsia. A seguir, são descritos mecanismos envolvidos na

geração, sustentação e finalização de crises epiléticas. Depois, são apresentadas as atividades epileptiformes como um instrumento experimental para o estudo das crises epiléticas e o capítulo é finalizado com alguns conceitos de refratariedade.

No capítulo III, são apresentados, com detalhes, os procedimentos experimentais para o registro eletrofisiológico e de eletroestimulação. Na seqüência, são expostos os métodos de análise do potencial elétrico e os métodos de simulações computacionais.

Os resultados experimentais e computacionais são apresentados e comparados no capítulo IV. A discussão desses resultados é feita no capítulo V, onde, a partir dos dados encontrados na literatura, é feita uma certificação dos experimentos e simulações computacionais.

No capítulo VI, são mostradas as conclusões gerais do trabalho, e suas contribuições para o entendimento de como os mecanismos não-sinápticos estão envolvidos na modulação da excitabilidade e refratariedade das atividades epileptiformes.

## CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA

### II.1 – Epilepsia

Os povos antigos acreditavam que as crises epiléticas estivessem ligadas à religião, e sua manifestação era considerada sobrenatural e deveria ser tratada com poderes sobrenaturais. Em 1824, Calmeil tentou classificar as crises epiléticas de acordo com seus sintomas. A primeira distinção entre crises parciais e generalizadas foi feita por John Hughlings Jackson, que propôs uma classificação baseada na localização anatômica. A eletroencefalografia, introduzida em 1929, por Hans Berger, ajudou no entendimento da epileptogênese (ENGEL,1989).

Atualmente, sabe-se que epilepsia é uma classe de distúrbios neuronais, definida como uma condição neurológica crônica, caracterizada por crises epiléticas recorrentes (FISHER *et. al.*, 2005). O cérebro normal pode produzir crises epiléticas em reação a estímulos nocivos, porém, isso não evidencia a presença de condição crônica e não é razão suficiente para se diagnosticar a epilepsia (ENGEL, 1995).

As síndromes epiléticas são classificadas como idiopáticas, quando a condição é transmitida geneticamente, e como sintomáticas, quando aparecem em consequência a um distúrbio cerebral (ENGEL,1995). Na epilepsia idiopática, a maioria das crises é generalizada. Na epilepsia sintomática, as crises são do tipo parcial e podem, ou não, se generalizar (ENGEL, 1995).

A epilepsia é a segunda condição neurológica mais comum, atingindo até 1% da população mundial. Em países desenvolvidos, a incidência de epilepsia é de 50 por 100000 pessoas. Devido à ineficiência sanitária e do sistema público de saúde, a incidência em países em desenvolvimento sobe para 100 por 100000 (SRIDHARAN,2002). Dados de 1983 mostram que em países desenvolvidos, como a Dinamarca, a incidência de epilepsia é de 39 por 100000 pessoas. Para países em desenvolvimento, como o Equador, a incidência pode chegar a 190 por 100000 como apontam dados de 1992 (SRIDHARAN,2002). A incidência específica, de acordo com a idade, mostra uma curva em U, sendo alta nas pessoas durante os primeiros meses de vida, baixa durante a vida adulta e alta durante a velhice.

## II.2 – Crises epilépticas

As manifestações comportamentais associadas às crises epilépticas dependem da funcionalidade das regiões onde ocorrem, podendo envolver alterações da consciência, respostas motoras, além de outros sintomas (ENGEL, 1989).

Para melhor caracterização dos sintomas desenvolvidos pelos pacientes, as crises epilépticas recebem diversas classificações, dependendo de como a crise se inicia, onde se localiza e do tipo de manifestações clínicas (FISHER *et. al.*, 2005).

Outra forma de classificação depende da presença, ou não, de um evento desencadeador. As crises podem ser “não-epilépticas”, quando provocadas por um estímulo, por exemplo: tratamento de eletrochoque ou por convulsivantes químicos, e “epilépticas”, quando são desencadeadas sem estímulo prévio (FISHER *et. al.*, 2005).

Podem também ser classificadas quanto à região afetada, sendo parciais (focais), quando se restringem a uma determinada área do tecido cortical, ou generalizadas, quando ativam os dois hemisférios cerebrais, principalmente as estruturas mesiais temporais (FISHER *et. al.*, 2005).

Quando não há perda de consciência, as crises parciais são caracterizadas como simples, quando há, como complexas (ENGEL, 1995). As crises parciais, frequentemente, duram poucos segundos ou minutos e suas manifestações clínicas estão relacionadas à região afetada. As crises inicialmente parciais 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 (ENGEL, 1995).

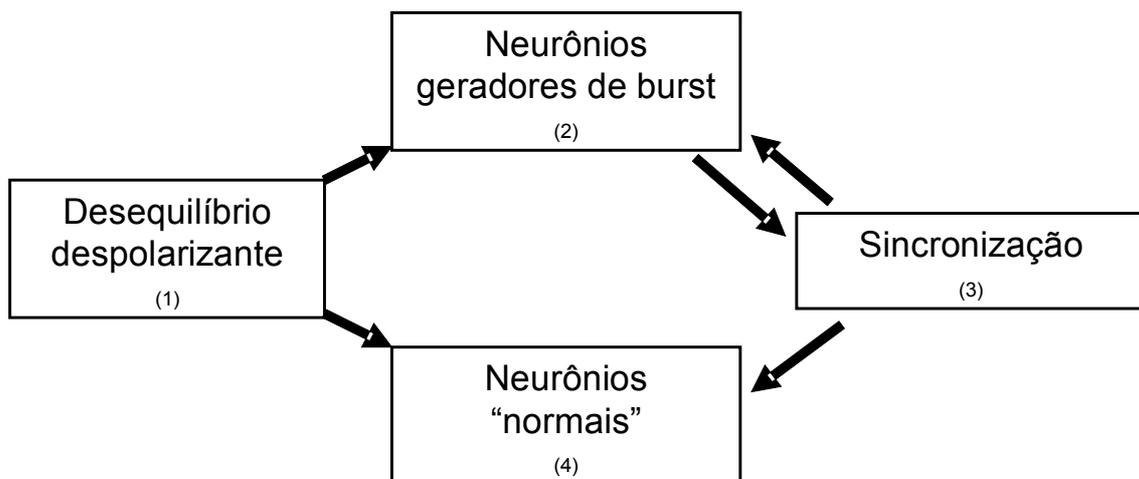
O termo ictal refere-se a registros eletrofisiológicos característicos de uma crise epiléptica (MCNAMARA, 1994; FISHER *et. al.*, 2005). Os eventos pós-ictais são transientes clínicos ou anormalidades eletrofisiológicas da função cerebral, que aparecem imediatamente após os eventos ictais (MCNAMARA, 1994). Os registros interictais são eventos compreendidos entre um estado pós-ictal e o começo do próximo evento ictal (MCNAMARA, 1994).

Os mecanismos básicos das crises epilépticas, sejam focais ou generalizadas, parecem ser os mesmos, independentes da estrutura em que ocorrem (HEINEMANN, 1987). O estudo desses mecanismos se dá pela indução de crises em modelos animais que são conhecidas como atividades epileptiformes (AE's). Sua indução se dá pelo desequilíbrio entre influências despolarizantes e hiperpolarizantes (MCCORMICK e CONTRERAS *et. al.*, 2001). O entendimento dos mecanismos que geram, sustentam e

terminam as crises epilépticas possibilita o desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença (SARKISIAN,2001).

### II.2.1 – Geração de crises epilépticas

O desenvolvimento de crises epilépticas pode estar ligado, basicamente, a três fatores, (figura II.1): (1) Desequilíbrio despolarizante, que ocorre quando há uma desinibição sináptica, aumento na eficiência de sinapses excitatórias ou variações nas correntes intrínsecas de membrana; (2) Presença de células geradoras de *bursts*, que podem estar presentes normalmente ou serem resultado de degeneração patológica; e, por último, (3) presença de mecanismos sincronizadores que, por meio de efeitos sinápticos e não-sinápticos, recrutam uma população de neurônios “normais” a entrar em atividade (HEINEMANN, 1987). Cada um desses fatores é discutido a seguir.



**Figura II.1** – Diagrama esquemático das condições necessárias para o início de uma crise epiléptica (HEINEMANN, 1987). Um desequilíbrio despolarizante pode resultar de uma desinibição sináptica, aumento na excitação sináptica ou de uma variação nas propriedades intrínsecas da membrana. Essa despolarização excita neurônios geradores de *burst*, juntamente com neurônios “normais”, que se sincronizam. A sincronização, por sua vez, atua novamente sobre os neurônios geradores de *burst*, gerando uma atividade intensa e hipersíncrona.

#### *Desinibição sináptica*

A inibição sináptica, normalmente, leva o potencial transmembrânico para níveis abaixo do limiar de disparo e impede a sincronização de células geradoras de *burst*

(ACHARYA,2002). O principal neurotransmissor inibitório, presente no neocórtex, hipocampo e outras estruturas do cérebro, é o ácido gama-amino-butírico, o GABA. O GABA atua em receptores que abrem canais de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  (DITCHER, 1989). A desinibição sináptica aumenta a excitabilidade durante redução na síntese, na liberação e/ou na atuação dos neurotransmissores inibitórios. A diminuição na eficiência inibitória também ocorre quando gradientes iônicos são alterados (HEINEMANN, 1987).

A perda de neurônios gabaérgicos e a atuação de drogas como a aliglicina podem reduzir a produção do GABA (DITCHER, 1989). Mesmo que haja produção, sua liberação pode ser diminuída, quando a  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  está reduzida. A presença de antagonistas de GABA, como a bicuculina, impede que haja inibição. Quando  $E_{\text{Cl}}$  e  $E_{\text{K}}$  estão acima do potencial transmembrânico, mesmo que o GABA seja sintetizado, liberado e atue em seu receptor, a abertura de canais de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  não é capaz de hiperpolarizar as células (HEINEMANN,1987).

#### *Aumento na excitação sináptica*

A excitação sináptica eleva o potencial transmembrânico, podendo levar as células a despolarizações recorrentes (DITCHER, 1989). Uma forma de excitar o sistema é aumentar a eficiência das sinapses excitatórias. Isso ocorre quando há um aumento da liberação e recepção de neurotransmissores excitatórios, ou diminuição da recaptação desses neurotransmissores (HEINEMANN, 1987).

#### *Variação nas correntes intrínsecas de membrana*

A diminuição das correntes hiperpolarizantes, ou o aumento nas correntes despolarizantes, aumenta a excitabilidade do tecido, podendo iniciar uma crise epiléptica. As principais correntes hiperpolarizantes da membrana são as de potássio e da bomba de Na/K. As correntes de sódio e cálcio representam as principais correntes iônicas despolarizantes (HEINEMANN, 1987).

A redução nas correntes de potássio acontece quando há um aumento na  $[\text{K}^+]_o$ , uma redução na expressão de canais de  $\text{K}^+$ , ou durante um bloqueio desses canais existentes na membrana celular. A bomba de Na/K é fundamental no estabelecimento do potencial de repouso das células. A inibição desse mecanismo eleva o potencial celular, além de aumentar a  $[\text{K}^+]_o$ , mantendo o sistema excitado (VAILLEND et. al., 2002).

O aumento na expressão de canais de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e a abertura persistente desses canais elevam o potencial transmembrânico, aproximando-o do limiar de excitabilidade (DITCHER, 1989). A inativação lenta de canais de Na<sup>+</sup> é outro fator que leva à despolarização (WALLACE *et. al.*,1998). Essas correntes contribuem para a sustentação de despolarizações, fazendo com que as células apresentem *bursts* espontâneos (HEINEMANN, 1987).

#### *Células geradoras de bursts*

Quando os efeitos despolarizantes superam os hiperpolarizantes, células geradoras de *bursts* podem levar com mais facilidades outras células à despolarização (HEINEMANN, 1987). Essas células geradoras de *bursts* podem estar presentes em condições fisiológicas (*bursts* autônomos) ou em condições patológicas (*bursts* induzidos), como no caso do aumento da concentração de potássio e diminuição da de cálcio extracelular (PAN e STRINGER, 1996).

Um desequilíbrio despolarizante que ocorra devido aos fatores discutidos anteriormente deve conduzir um conjunto de células à despolarização. Essa condição patológica transformará células “normais” em células geradoras de *bursts*, que, na presença de mecanismos sincronizadores, levarão o sistema a entrar no período ictal.

#### *Sincronização*

A sincronização das atividades neuronais intensas ocorre por diferentes mecanismos sinápticos e não-sinápticos, tais como: sinapses excitatórias, efeitos de campo elétrico, acoplamento efáptico, flutuações iônicas, gap-junction e liberação de neuromoduladores (DICTER e AYALA,1987).

Durante uma atividade neuronal intensa, as células liberam neurotransmissores excitatórios que se ligam a receptores gerando potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS). Esses potenciais elevam o potencial transmembrânico, facilitando a despolarização, podendo levar outras células a uma atividade neuronal intensa.

As correntes transmembrânicas de um neurônio em atividade geram um campo elétrico que afeta, de forma inversamente proporcional à distância, outros neurônios vizinhos. Nesse caso, esse acoplamento pode contribuir para a sincronização dos neurônios, durante as descargas epileptiformes (DUDEK *et al.*, 1998; TAYLOR e DUDEK, 1982; JEFFERYS e HAAS, 1982). Esses campos podem não ser suficientes para provocar a despolarização de uma célula de modo a retirá-las do repouso e fazê-las

alcançar o limiar de disparo para o potencial de ação (BINDMAN *et al.*, 1964). Mas, esse efeito se torna significativo quando conjuntos de neurônios estão próximos do seu limiar de disparo, e funciona como gatilho para a ocorrência de um *population spike* (PS).

O acoplamento efáptico se dá quando há interação de membranas neuronais muito próximas (JEFFERYS, 1995). Esse efeito ocorre devido a grandes potências extracelulares, que promovem despolarizações transmembrânicas de neurônios adjacentes. Embora muitos autores considerem diferentes os termos transmissão efáptica e efeito de campo elétrico, o que se observa é que, em ambos os casos, há interações neuronais mediadas por correntes elétricas fluindo através do espaço extracelular (JEFFERYS, 1995). O termo interação efáptica é utilizado, por alguns autores, para designar um tipo específico de comunicação elétrica entre neurônios vizinhos de grande proximidade.

Vários íons encontrados no meio extracelular modulam a atividade neuronal (KONNERTH *et al.*, 1984; JEFFERYS e HAAS, 1982; PAN e STRINGER, 1996; XIONG e STRINGER, 2000). O aumento na concentração extracelular do  $K^+$  eleva a excitabilidade do tecido, provocando descargas neuronais espontâneas. A concentração extracelular dos íons  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  também afeta a excitabilidade neuronal. A redução da concentração de cátions divalentes reduz a blindagem eletrostática e o campo elétrico atuante através da membrana. Esse efeito é semelhante à despolarização transmembrânica (JEFFERYS, 1995). A geração de potenciais de ação está diretamente ligada às flutuações do íon  $Na^+$ , pois é seu influxo que causa a despolarização do potencial transmembrânico. Assim, variações no gradiente do  $Na^+$  variam a amplitude do potencial de ação. Desta maneira, observa-se que as flutuações iônicas possuem um papel importante na sincronização de AE's não sinápticas, apesar delas não se mostrarem capazes de sincronizar descargas neuronais a ponto de surgirem PS's no meio extracelular (CARVALHO, 2003).

As gap-junctions unem eletronicamente os citoplasmas de duas células (MACVIVAR e DUDEK, 1982; JEFFERYS, 1995; VELAZQUEZ e CARLEN, 2000). Essa união é feita por um anel de seis proteínas idênticas que formam um canal de aproximadamente 1,5 nm de diâmetro. Assim, quando um neurônio se despolariza, outro ligado perceberá essa despolarização devido à passagem direta de íons do citoplasma de uma célula para outra. Estudos têm comprovado a existência desse acoplamento em sistemas nervosos de vertebrados e invertebrados, sendo mais comuns

nos invertebrados (BENNETT e SPRAY, 1985). Em vertebrados, tal acoplamento é menos proeminente em neurônios adultos do que as transmissões químicas (BENNETT, et al., 1996) e, mesmo em células jovens, somente um pequeno percentual dessas estruturas deve atuar sobre condições normais.

A geração de crises epiléticas não está somente ligada a mecanismos sinápticos de excitação (TAYLOR e DUDEK, 1982; JEFFERYS e HAAS, 1982). Existem mecanismos intrínsecos à membrana que respondem a mudanças no meio extracelular, levando algumas células a um estado excitável independente de conexões sinápticas (PAN e STRINGER, 1996). Isso norteou muitas pesquisas que estudam influências de mecanismos não-sinápticos na geração de crises epiléticas.

## II.2.2 – Sustentação de crises epiléticas

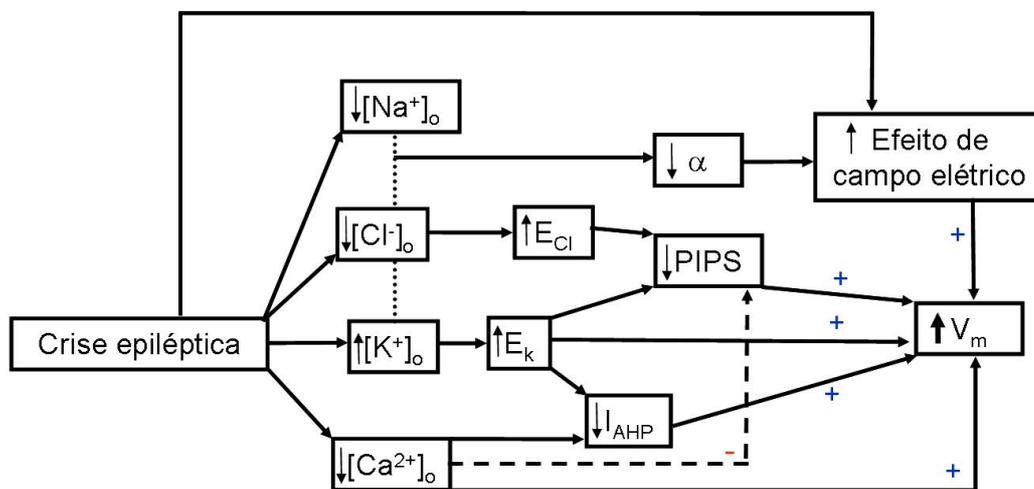
Uma vez que o sistema se encontra no estado excitável e inúmeras células entram em atividade, na presença de mecanismos sincronizadores, uma crise epilética pode se iniciar e se sustentar por meio de componentes que formam uma retro-alimentação positiva. Durante a crise, há uma grande entrada de cálcio e saída de potássio dos neurônios (HEINEMANN et al. 1986). A entrada de cálcio se deve a liberação excessiva de neurotransmissores e a saída do potássio se dá pelo aumento da sua permeabilidade (HEINEMANN et al. 1986).

A diminuição da  $[Ca^{2+}]_o$  reduz a inibição do sistema, aumenta a excitabilidade neuronal, com a perda do efeito de blindagem (HILLE, 1992), e diminui a pós-hiperpolarização (PAN e STRINGER, 1996). Depois de um *burst*, os neurônios apresentam uma corrente pós-hiperpolarizante (do inglês, afterhyperpolarization ou AHP) que é gerada por canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ . A redução na  $[Ca^{2+}]_o$  implica na diminuição das correntes AHP, que ajudam na manutenção do equilíbrio do sistema (PAN e STRINGER, 1997).

O aumento na  $[K^+]_o$  eleva o  $E_K$ , levando a uma redução das principais correntes hiperpolarizantes dependentes desse íon. O potencial transmembrânico tem uma íntima ligação com o  $V_K$  e o aumento do mesmo faz com que as células se despolarizem com mais facilidade (MCNAMARA, 1994). As correntes AHP dependentes do  $K^+$  diminuem quando há um aumento na  $[K^+]_o$ , além da redução de potenciais inibitórios-pós sinápticos (PIPS) (PAN e STRINGER, 1997).

Concentrações extracelulares de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  também têm uma variação em seus valores durante atividades neuronais intensas. Medidas experimentais revelaram um aumento nas concentrações extracelulares de  $\text{Cl}^-$  (LUX et al., 1986) concomitante à diminuição da concentração de  $\text{Na}^+$  (DIETZEL et al., 1982). Essas alterações iônicas são, em parte, balanceadas por um decréscimo do espaço extracelular. A redução do volume extracelular aproxima as células, aumentando o efeito sincronizador do campo elétrico (MCNAMARA, 1994), que é um mecanismo acoplador dessas atividades intensas.

A Figura II.2, mostra um diagrama esquemático resumido dos prováveis mecanismos mostrados anteriormente, responsáveis por sustentar uma crise epiléptica.



**Figura II.2** – Eventos desencadeados por uma crise epiléptica e que podem ser responsáveis pela sustentação dessa atividade excessiva. Uma crise epiléptica leva a uma redução nas concentrações extracelulares de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , além de um aumento na concentração extracelular de  $\text{K}^+$  (LUX et al., 1986, HEINEMANN et al. 1986). A variação nas concentrações dos íons produz uma redução no espaço extracelular ( $\alpha$ ), que aumenta o efeito de campo elétrico (MCNAMARA, 1994). A redução nos PIPS e nas correntes hiperpolarizantes dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , aumentam a excitabilidade sustentando a despolarização (PAN e STRINGER, 1997).

A redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  leva a uma diminuição nos potenciais excitatórios pós-sináptico (PEPS), demonstrando a importância de componentes não-sinápticos de sustentação das crises epilépticas.

### II.2.3 – Finalização das crises epiléticas

Existem vários mecanismos, que podem ser próprios das células neuronais ou de outros componentes do sistema, responsáveis por hiperpolarizar os neurônios. Os principais mecanismos neuronais são: potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS) dependentes de  $\text{Cl}^-$  e/ou  $\text{K}^+$  (DICTER e AYALA,1987), canais de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  (DICTER e AYALA,1987), neuromodulação (DICTER e AYALA,1987), redução no  $\text{pH}_i$  (STERIADE, 2004) e a bomba de Na/K (XIONG *et. al.*,2000). Outros mecanismos não-neuronais hiperpolarizam os neurônios por meio da retirada do  $\text{K}^+$  extracelular, como eletrodifusão e canais retificadores da glia.

Uma atividade neuronal intensa provoca o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e a liberação de GABA. Quando o potencial de Nernst do  $\text{Cl}^-$  se encontra abaixo do potencial transmembrânico, o GABA tem a capacidade de abrir canais de  $\text{Cl}^-$ , levando as células à hiperpolarização.

Os aumentos nas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e  $[\text{Na}^+]_i$  aumentam a condutância de canais específicos de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , e caso o potencial reverso desses íons esteja abaixo do potencial transmembrânico, a célula será hiperpolarizada (DICTER e AYALA,1987).

O aumento dos fluxos iônicos e ativação de bombas eletrogênicas durante a crise conduzem a um aumento do  $\text{CO}_2$  (TIMOFEEV e STERIADE, 2004). Esse aumento acidifica o meio intracelular, levando a uma cascata de eventos hiperpolarizantes (XIONG *et. al.*,2000). Dentre esses eventos, pode-se citar a diminuição na condutância pelos canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (ZIEMANN *et. al.*, 2008) e redução na eficiência das gap-junction (TIMOFEEV e STERIADE, 2004).

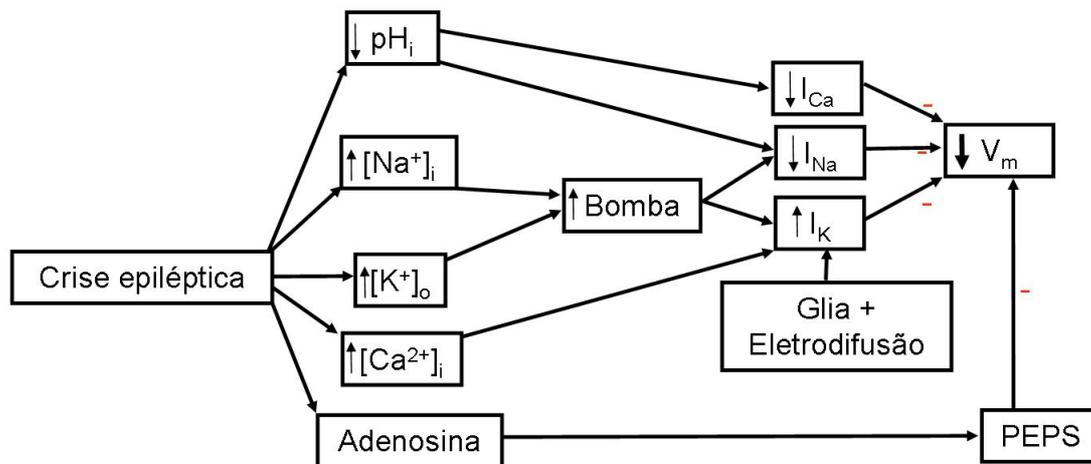
O aumento na permeabilidade dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , durante um evento epileptiforme, levam a um aumento na  $[\text{Na}^+]_i$  e na  $[\text{K}^+]_o$ . Esse aumento ativa a bomba de Na/K, aumentando os efeitos inibitórios sobre o sistema (ALMEIDA *et. al.*,2008).

Neuromoduladores, como, por exemplo, a adenosina, podem ser liberados de terminais nervosos e células gliais, durante intensa atividade do sistema nervoso. A adenosina é um poderoso anticonvulsivante (LEE et al., 1984) que, em adição, reduz a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pré-sináptica e, portanto, a liberação de neurotransmissores.

Outra forma de diminuir a excitabilidade do meio é retirar o excesso de potássio extracelular. Dois fatores principais atuam nesta tarefa: a eletrodifusão deste íon no espaço extracelular e a ação de células gliais (WALZ, 2000). Ambos trabalham no sentido de retirar o excesso de potássio, levando-o para regiões de concentrações

menores. Na glia, ocorre um efeito conhecido como “buffering espacial” (WALZ, 2000). Nesse fenômeno, o aumento do potássio extracelular é grande o bastante para que seu potencial seja maior do que da membrana glial na região. Assim, o potássio flui para o interior da glia e se difunde até localidades onde sua concentração intracelular é menor. Com uma concentração intracelular maior do que a extracelular, o potássio deixa a glia, a favor de seu gradiente de concentração. Assim, o potássio deixa regiões de altas concentrações indo para regiões de baixa concentração (WALZ, 2000).

Todas essas formas de regulação da excitabilidade neuronal funcionam corretamente em condições normais, porém, durante uma crise epiléptica, mecanismos que se baseiam nas correntes hiperpolarizantes de  $K^+$  e  $Cl^-$  têm menor efeito. Essa diminuição se deve ao aumento da  $[K^+]_o$  e da  $[Cl^-]_i$ . Os PIPS's têm uma grande diminuição por dependerem do  $Ca^{2+}$  extracelular. Assim, os principais mecanismos que atuam na finalização de crises epilépticas são: bomba de Na/K e outros mecanismos reguladores do potássio extracelular. Na figura II.3, mostra-se uma compilação dos eventos gerados por uma crise epiléptica e os mecanismos responsáveis pela regulação da homeostase.



**Figura II.3** – Mecanismos responsáveis por manter a homeostase, regulando atividades excessivas. Uma atividade excessiva leva a uma redução no pH intracelular, nas concentrações intracelulares de  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$ , na concentração extracelular de  $K^+$  e produção de adenosina. A redução do pH intracelular reduz as correntes excitatórias de  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$ . A variação nos gradientes de  $Na^+$  e  $K^+$  ativa a bomba de Na/K, que reduz a corrente de  $Na^+$  e eleva a corrente inibitória de  $K^+$ . A adenosina reduz os potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS). A redução das correntes excitatórias de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  e dos PEPS concomitante ao aumento da corrente inibitória de  $K^+$  e da bomba de Na/K, reduzem o potencial transmembrânico.

Com a redução da  $[Ca^{2+}]_o$  e da  $[Cl^-]_o$ , a dessensibilização de neurotransmissores inibitórios e a  $[K^+]_o$  aumentada, as sinapses inibitórias têm pouco efeito na finalização

das crises epilépticas, reforçando o papel desempenhado por mecanismos não-sinápticos para finalização de uma crise epiléptica.

#### **II.2.4 – Estado pós-ictal**

Após uma crise epiléptica, o indivíduo pode passar por um momento conhecido como estado pós-ictal (EPI). O EPI deve ser resultado de uma regulação exacerbada da crise epiléptica. Nesse estado, podem aparecer dores de cabeça, déficit cognitivo e outras condições médicas secundárias (FISHER *et. al.*, 2000). Para alguns pacientes, o EPI pode ser mais agressivo do que a própria crise epiléptica. O entendimento dos mecanismos que envolvem o EPI pode auxiliar no desenvolvimento de tratamentos dos sintomas presentes nesse estado (FISHER *et. al.*, 2000).

Sintomas que surgem no EPI podem persistir até mais de 12 horas, como dores de cabeça (FISHER *et. al.*, 2000). Distúrbios psicológicos podem aparecer neste período. Nesses casos, é necessário um cuidado ainda maior com o paciente. O EPI, provavelmente, tem uma função de evitar o aparecimento de uma nova crise epiléptica, funcionando como um período refratário. Assim, se faz necessário entender os mecanismos que o cercam, para tratar os sintomas sem afetar esse papel protetor.

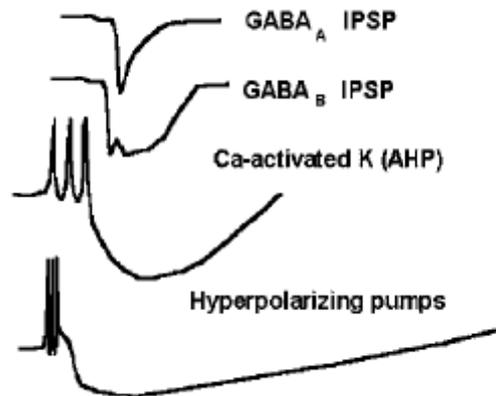
Os possíveis mecanismos acerca do EPI podem estar relacionados a mudanças na liberação e recepção de neurotransmissores, na síntese de neuromoduladores e na presença de algumas correntes inibitórias. Pensava-se que nesse estado havia uma exaustão neuronal que impossibilitava uma resposta neuronal evocada. Porém, sabe-se que com um estímulo antidrômico é possível obter uma resposta de neurônios (FISHER *et. al.*, 2000).

Os neurotransmissores são liberados excessivamente durante uma crise epiléptica, e por se encontrarem em quantidade limitada, têm uma liberação reduzida, diminuindo sua atuação no período pós-ictal (FISHER *et. al.*, 2000)

A adenosina é um neuromodulador importante na supressão da transmissão sináptica (MCGARAUGHTY *et. al.*, 2005) e sua concentração é aumentada durante uma crise epiléptica. Portanto, sua presença parece interferir na transmissão sináptica normal que deveria ocorrer após a crise (MCGARAUGHTY *et. al.*, 2005).

A ativação de correntes inibitórias tem uma grande importância no fim de uma crise epiléptica e durante o EPI. Na Figura II.4, mostram-se os níveis de inibição existentes

no sistema nervoso. Uma análise temporal de atuação mostra que correntes inibitórias mediadas pela bomba de Na/K têm grande significância durante o EPI (FISHER *et. al.*, 2000).



**Figura II.4** – Tipos de atividades inibitórias no cérebro. Essas atividades estão em ordem de duração temporal indo do menor para o maior. (A) Potencial pós – sináptico inibitório rápido. (B) Potencial pós–sináptico inibitório lento. (C) Pós – hiperpolarização mediada por correntes de potássio ativadas por cálcio. (D) Hiperpolarização mediada pela bomba de Na/K (FISHER *et. al.*, 2000).

### II.3 – Atividades epileptiformes

As atividades epileptiformes (AE's) são modelos experimentais de crises epiléticas. Esses modelos são utilizados de acordo com o objetivo da investigação e são divididos em dois grandes grupos: modelos agudos e crônicos. Esses dois grupos podem ser estudados de maneira *in-vitro* ou *in-vivo*. No modelo agudo, há uma aplicação de estímulos que produzem AE's transientes, apresentando uma reversibilidade com a retirada do estímulo. Por outro lado, no modelo crônico, há uma condição em que as AE's são persistentes e podem demorar semanas, meses ou anos para aparecer, sendo geralmente irreversíveis (ENGEL,1989).

Modelos *in-vitro* possibilitam o estudo de mecanismos com métodos que seriam impossíveis de se obter *in-vivo* e permitem controlar melhor a temperatura e concentrações iônicas no meio extracelular (HEINEMANN *et al.*, 2006). Esse maior controle oferecido por modelos *in-vitro* permite isolar variáveis de interesse e estudar a sua importância em determinado fenômeno.

Como discutido ao longo dessa revisão, os mecanismos não-sinápticos têm uma grande participação durante as crises epilépticas. Isolar esses mecanismos e estudá-los se tornou possível com desenvolvimento de manobras experimentais em que as conexões sinápticas são suprimidas e a excitabilidade do meio é aumentada (ALMEIDA *et. al.*,2008). Com esse protocolo, é possível entender como esses mecanismos se comportam durante a geração, sustentação e finalização de atividades epileptiformes (AE's).

### **II.3.1 – Atividade epileptiforme não – sináptica (AENS)**

As manobras experimentais que permitem a obtenção de AENS ganharam importância com a publicação de dois trabalhos de TAYLOR e DUDEK e de JEFFERYS e HAAS, ambos em 1982. Nesses trabalhos, foram utilizadas soluções nutrientes com baixa concentração de cálcio para gerar atividades epileptiformes em hipocampo. Seus registros eletrofisiológicos mostraram uma variação negativa e lenta na linha de base superposta por espículas negativas, denominadas *population spikes* (PS). Trabalhos posteriores sugeriram que a alta amplitude dos PS's, mesmo na ausência das conexões sinápticas, é devida um grande número de neurônios em sincronização (PAN e STRINGER, 1996).

Existem vários modelos capazes de sustentar as AENS, e eles diferem somente na metodologia para se obter uma hiperexcitabilidade do tecido e na maneira de se impedir a comunicação sináptica. Os usos de bloqueadores de canais de potássio, alta concentração de potássio extracelular e baixa concentração extracelular de cloreto são algumas das diferentes manobras de manutenção de um sistema no estado hiperexcitável. A ausência da comunicação sináptica pode ser conseguida impedindo-se a liberação dos neurotransmissores, reduzindo a  $[Ca^{2+}]_i$ . (TAYLOR e DUDEK,1982; JEFFERYS e HAAS, 1982, PAN e STRINGER,1996), ou impedindo sua ligação aos receptores, com uso de antagonistas (XIONG e STRINGER,2001).

Por reproduzir melhores condições encontradas *in-vivo* (STRINGER *et al.*, 1989; STRINGER e LOTHMAN, 1992), o modelo de alto potássio e zero cálcio se mostra bastante eficiente no estudo das AENS no GD (PAN e STRINGER, 1996). Nessas condições, foi mostrado que o GD é capaz de ter uma ativação máxima das células granulares, chamada “máxima ativação dentada” (MAD), perdendo seu papel de filtro

de atividades anormais (SOMJEN *et al.*, 1985; JEFFREY *et al.*, 1992; STRINGER *et al.*, 1991). Assim, entender quais mecanismos estão envolvidos na hiperexcitabilidade e na transição do período ictal para o interictal deve auxiliar na compreensão da MAD.

#### *Geração das AENS's no modelo alto potássio e zero cálcio*

Os efeitos despolarizantes, presentes nesse modelo, são decorrentes, principalmente, das concentrações extracelulares modificadas do potássio e cálcio (PAN e STRINGER, 1997). Além de despolarizar as membranas neuronais, essas alterações fazem com os neurônios apresentem *bursts* endógenos (PAN e STRINGER, 1996). Por meio de mecanismos não-sinápticos de sincronização, esses *bursts* levam mais células a despolarizar, aumentando, assim, a concentração extracelular de potássio. Esse aumento despolariza outras células, até que uma atividade hipsíncrona se inicie.

A ausência do cálcio aumenta a excitabilidade neuronal, reduzindo a inibição sináptica (PAN e STRINGER, 1997), diminuindo as correntes hiperpolarizantes de potássio dependentes de cálcio (HEINEMANN, 1987) e reduzindo o efeito de blindagem desse cátion (HILLE, 1992). A alta concentração extracelular de potássio diminui todas as correntes hiperpolarizantes desse íon (HEINEMANN, 1987), além de causar um inchaço de glias, diminuindo o espaço extracelular (JENSEN e YAARI, 1997).

Simulações computacionais (ALMEIDA *et al.*, 2008) mostram que, durante a exposição do GD a meios nutrientes contendo alto  $K^+$  e zero  $Ca^{2+}$ , há um aumento gradativo na  $[Cl^-]_i$ . Esse aumento se dá pela ativação de cotransportadores NKCC e faz com que o  $E_{Cl}$  supere o potencial transmembrânico, induzindo despolarizações neuronais (ALMEIDA *et al.*, 2008).

De acordo com essas simulações (ALMEIDA *et al.*, 2008), as principais correntes excitatórias são as dependentes de  $Cl^-$  e  $Na^+$ , e as principais correntes inibitórias são as de  $K^+$  e da bomba de Na/K. Com base nesses resultados, juntamente com achados experimentais (KONNERTH *et al.*, 1986), foi possível concluir que o início do evento ictal se dá quando o influxo de  $Na^+$  pelos canais supera seu efluxo pela bomba (ALMEIDA *et al.*, 2008).

PAN e STRINGER mostraram, em 1996, que no modelo de zero  $Ca^{2+}$  e alto  $K^+$  as células granulares do giro denteado apresentavam *bursts* intrínsecos. Os autores também mostraram que quanto maior a despolarização, maior era a frequência de disparos dos *bursts*, antes do evento epiléptico (PAN e STRINGER, 1997). Como os potenciais de

ação liberam mais potássio no meio extra e esse potássio despolariza ainda mais as células, a frequência dos *bursts* intracelulares vão aumentando até iniciar um evento.

Nesse tipo de modelo, as células disparando em *bursts* de potenciais de ação induzem despolarizações em outras células, basicamente, por quatro maneiras (MACVIVAR e DUDEK, 1982; JEFFERYS, 1995; CARLEN *et al.*, 2000): pelas gap-junctions, efeito de campo elétrico, efeito efáptico e flutuações iônicas.

Esses mecanismos de sincronização atuam com intensidade e tempo diferentes, porém, todos são responsáveis, em conjunto, pelo início de uma atividade epileptiforme, onde um grande número de neurônios entra em atividade. Essa atividade é sustentada por esses mecanismos e outros que reforçam ainda mais esse sincronismo.

#### *Sustentação das AENS's no modelo alto potássio e zero cálcio*

Uma vez iniciada uma atividade hipersíncrona, ocorre uma retroalimentação positiva no sistema que, nesse caso, independe de interações sinápticas (KONNERTH,1986). Logo, a sustentação de AENS se dá pelos mesmos mecanismos envolvidos em crises epiléticas, com exceção das sinapses excitatórias. Possivelmente, o aumento na  $[K^+]_o$  está ligado à retroalimentação positiva, que se agrava quando ocorre em tecidos com denso empacotamento celular (YAARI,1986).

Esse aumento despolariza neurônios aumentando sua frequência de disparo, causando um novo aumento na  $[K^+]_o$  (YAARI,1986). Mecanismos não-sinápticos de sincronização, discutidos anteriormente, mantêm a rede excitável, sustentando esses eventos epileptiformes.

#### *Finalização das AENS's no modelo alto potássio e zero cálcio*

A finalização das AENS se dá por mecanismos similares aos envolvidos no fim de uma crise epilética. A diferença é que, nesse caso, as sinapses inibitórias não atuam de forma a hiperpolarizar as células. Sendo assim, os principais mecanismos que atuam na finalização de crises epiléticas são: bomba de Na/K (ALMEIDA *et. al.*,2008) e mecanismos reguladores do potássio extracelular (XIONG *et. al.*,2000 ). O fim desse evento ocorre quando o efeito eletrogênico da bomba supera o efeito excitatório de correntes de  $Na^+$  (ALMEIDA *et. al.*,2008).

Após o fim de um evento epileptiforme, a  $[K^+]_o$  diminui para níveis menores que a concentração basal (JENSEN e YAARI,1997). Quando um estímulo ortodrômico é

aplicado, logo após o fim desse evento, há um aumento rápido na  $[K^+]_o$ , que diminui em seguida (JENSEN e YAARI,1997). Quanto maior o tempo que se espera para aplicar esse estímulo, menor a regulação na  $[K^+]_o$ , sugerindo uma diminuição nos mecanismos reguladores de potássio entre os eventos epileptiformes (JENSEN e YAARI,1997). Esses mecanismos devem definir a transição do período inter-ictal para o período ictal.

#### *Modelo alto potássio e zero cálcio no GD da formação hipocampal*

A formação hipocampal (FH) está localizada na parte medial do lobo temporal e é formada por três partes: Giro Dentado (GD), subiculum e o corno de Ammon (CA) ou hipocampo (AMARAL e WITTER, 1989). Essa estrutura tem grande importância na geração e sustentação de crises epiléticas, que abrangem todo o córtex cerebral (ENGEL,1989).

O GD é formado por três camadas: 1) camada granular (CG); 2) camada molecular (CM); e 3) camada polimórfica ou hílus (H) (AMARAL e WITTER, 1989; LOPES DA SILVA et al., 1990; SCHARFMAN et al., 2002). Recebe entradas do córtex entorrinal através do caminho perfurante (AMARAL e WITTER, 1989). Suas células granulares projetam para CA3 (HSU,2007). As células piramidais de CA3 projetam para CA1 através do chamado colateral de Schaffer (AMARAL e WITTER, 1989).

Estudos *in-vivo* e *in-vitro* mostram que, em condições normais, o GD restringe o fluxo de atividades epileptiformes, dentro do hipocampo (WALTER *et al.*, 1986; JONES e LAMBERT, 1990; LOTHMAN *et al.*, 1992). Por essa razão, pensava-se que o GD era incapaz de gerar e manter atividades epileptiformes (HSU,2007). Contudo, quando estimulado, o GD mostra-se capaz de produzir atividades epileptiformes (SOMJEN *et al.*, 1985; JEFFREY *et al.*, 1992; STRINGER *et al.*, 1991).

A estimulação do GD causa um aumento na concentração extracelular de  $K^+$  e redução na concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ . PAN e STRINGER (1996) mostraram que, nessas condições, as células granulares apresentam *bursts* endógenos e a sincronização desses *bursts* leva a uma ativação do GD, a MAD. Essa ativação é um importante passo na propagação de crises dentro e através do hipocampo (STRINGER *et al.*, 1989; STRINGER e LOTHMAN, 1992).

Os maiores avanços no entendimento de mecanismos celulares envolvidos na MAD estão relacionados à indução de AENS no GD. Essas atividades são bastante similares à MAD registrada *in vivo* (PATRYLO *et al.*, 1994), e podem ser produzidas pelo aumento

na concentração extracelular de  $K^+$  e supressão de  $Ca^{2+}$ . O entendimento de como os mecanismos subcelulares estão envolvidos nas AENS's pode levar a uma compreensão de como ocorre a geração de *bursts* epileptiformes no GD.

## II.4 – Refratariedade

A refratariedade é um fenômeno que ocorre em sistemas neuronais que respondem de forma tudo-ou-nada (de LA PRIDA *et. al.*, 2007). Em respostas do tipo potencial de ação (PA), a refratariedade é responsável por limitar sua frequência de disparos (HODGKIN,1952). Durante a depressão alastrante (DA), a refratariedade regula a dinâmica de sua propagação em tecidos corticais (TEIXEIRA *et. al.*,2008).

As células excitáveis respondem por meio de PA. Essa resposta, bem definida e auto-sustentável, se inicia com a abertura de canais de  $Na^+$ , elevando o potencial transmembrânico da célula, que retorna ao equilíbrio com a abertura lenta de canais de  $K^+$ . Os canais de  $Na^+$ , responsáveis pelo início do PA, se mantém inativos durante um tempo impossibilitando a ocorrência de um novo PA. O período em que há essa inativação é conhecido como período refratário absoluto (PRA). Após esse período, um estímulo com intensidade maior é capaz de evocar uma nova resposta e esse novo período é chamado refratário relativo (PRR).

A DA é um fenômeno cerebral que foi identificado na década de 40, por Aristides Azevedo Pacheco Leão, durante experimentos em córtex de coelho (LEÃO, 1944). Leão observou que uma estimulação local da superfície cortical levava a deflagração de ondas que se propagavam, de forma autônoma, e que se caracterizavam pela supressão das oscilações elétricas espontâneas. Simulações computacionais mostram que, imediatamente após uma DA, o tecido neuronal fica incapacitado de propagar uma nova onda (TEIXEIRA *et. al.*,2008). Essas simulações mostraram que a refratariedade está relacionada com o balanceamento dos fluxos de  $Na^+$  e  $K^+$  pelos canais e pela bomba (TEIXEIRA *et. al.*,2008). A exaustão de neurotransmissores, ligados a propagação da excitabilidade, também tem uma íntima ligação com a refratariedade (TEIXEIRA *et. al.*,2008).

### *Refratariedade das AENS*

À AENS segue-se uma excessiva regulação da excitabilidade, que dificulta o aparecimento de uma nova atividade dessa natureza (KONNERTH *et. al.*,1986). Além

disso, há uma diminuição nos efeitos excitatórios responsáveis pelo início de um novo evento (XIONG *et. al.*,2000). Essa regulação persistente, juntamente com a diminuição nos efeitos excitatórios, deve ser responsável pela refratariedade das AENS.

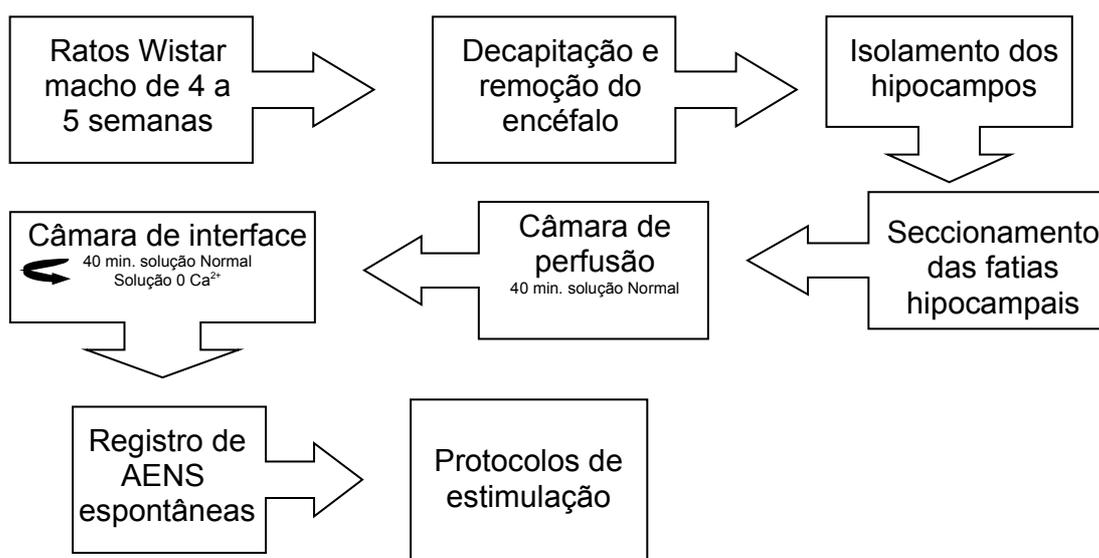
A bomba de Na/K é o principal mecanismo de retirada do Na<sup>+</sup> intracelular. Após um evento epileptiforme intenso, a bomba atua com alta atividade. O reflexo dessa atividade persistente reduz a [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> abaixo da [K<sup>+</sup>] da solução de perfusão. Essa redução excessiva na [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> aumenta as correntes inibitórias dependentes desse íon, juntamente com a corrente inibitória da bomba, formam uma inibição persistente. A acidificação do meio intracelular reduz os efeitos excitatórios de correntes dependentes de Na<sup>+</sup> (ZIEMANN *et. al.*, 2008). Essa redução nos mecanismos excitatórios aliada a pós-hiperpolarização dificultam a ocorrência do primeiro ponto crítico definido por ALMEIDA *et. al.*, (2008). Assim um estímulo não é capaz de evocar uma nova AENS, caracterizando o PRA.

À medida que as concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> intra e extra se restabelecem, o efeito hiperpolarizante da bomba diminui. Isso leva a um gradual aumento na [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> e, conseqüentemente, uma diminuição nas correntes hiperpolarizantes dependentes desse íon. Aliado a essa diminuição na hiperpolarização, há uma regulação no pH<sub>i</sub> (XIONG *et. al.*,2000), que deve aumentar as correntes de Na<sup>+</sup>. Com isso, um estímulo é capaz de evocar uma nova AENS, caracterizando o PRR. Essa nova AENS terá características diferentes de uma AENS evocada após o fim do PRR.

## CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

### III. 1 – Preparação experimental

A indução das AENS's está esquematizada na figura III.1, consistindo na preparação das fatias e exposição das mesmas à solução contendo alto  $K^+$  e zero  $Ca^{2+}$ .



**Figura III.1** – Diagrama em blocos dos processos de preparação e indução das AENS's no GD da formação hipocampal de rato.

#### III. 1.1 – Seleção dos animais

Ratos jovens, de até seis semanas de vida, produzem fatias mais saudáveis e aptas para o estudo *in vitro* (HATTON *et al.*, 1980). Por possuírem um crânio mais fino e menos calcificado, a remoção do cérebro é feita sem trauma excessivo.

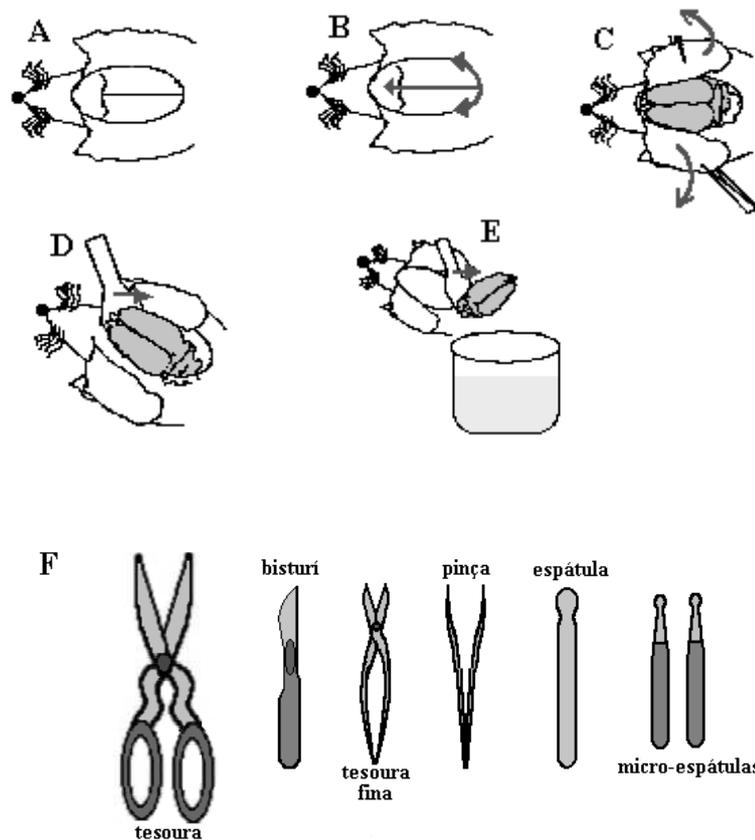
Neste trabalho, foram utilizados ratos machos de 4 a 5 semanas. Os animais, provenientes do Biotério da Universidade Federal de São João Del Rei, obedeceram a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro: 07:00 – 19:00), com a temperatura ambiente constante entre 21 e 22 °C. Os ratos foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e comida.

#### III.1.2 – Preparação das fatias de hipocampo

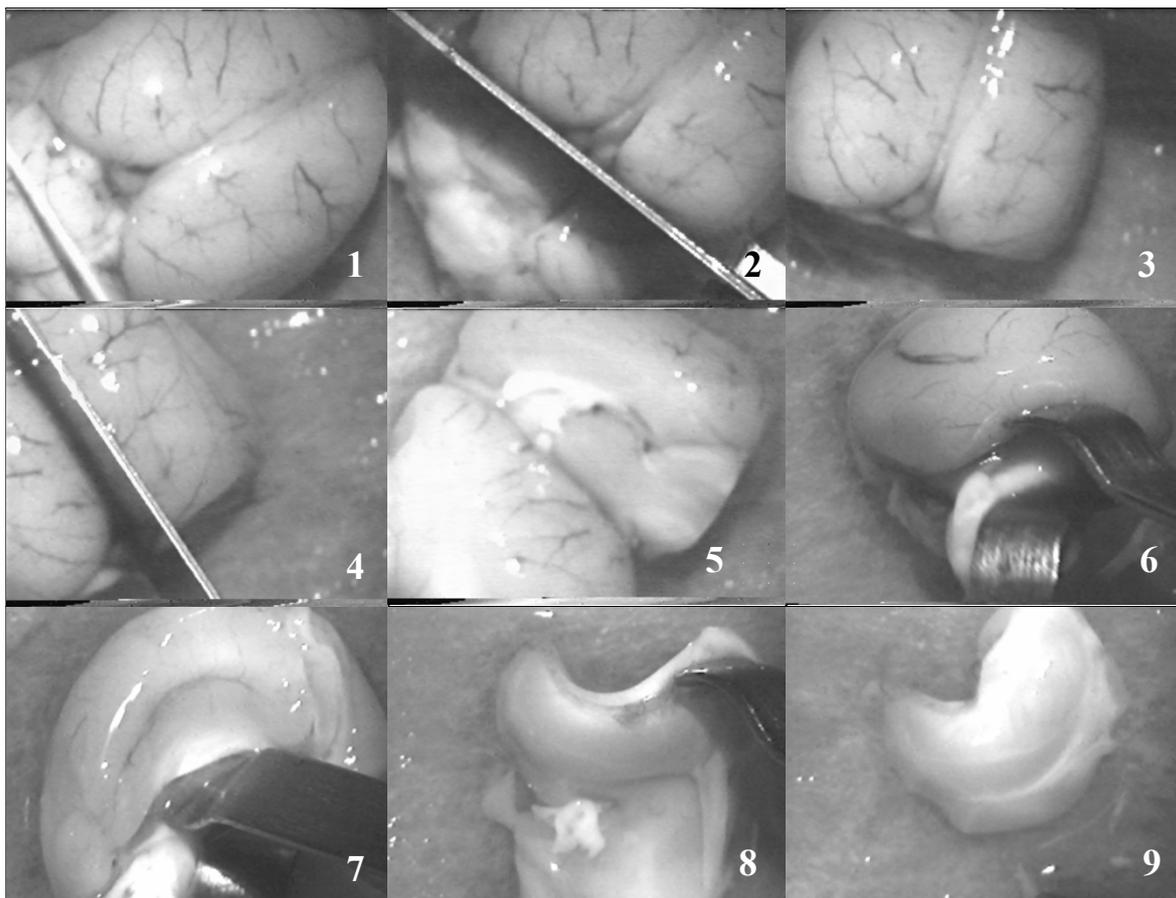
Cuidado e rapidez garantem uma boa preparação das fatias, que não deve exceder cinco minutos para a retirada de cada hipocampo. Meios pobremente oxigenados levam a extinção de potenciais sinápticos registrados no GD do hipocampo (LIPTON e WHITTINGHAM, 1979). Para melhor difusão do oxigênio sobre o tecido, as fatias tiveram no máximo 400 µm de espessura. Embora haja indícios de que temperatura não tem influência tão crucial durante as preparações (DINGLELINE *et al.*, 1980), foi utilizada solução semicongelada durante o procedimento, principalmente para evitar excitotoxicidade.

Por ser de fácil obtenção e ter um efeito rápido, para anestesia do animal foi utilizado o éter etílico. O éter produziu resposta mais rápida tornando mais ágil e confortável o manuseio do animal. Depois de anestesiados, os animais foram decapitados.

Com um bisturi abriu – se o escalpo para a visualização da parte superior do crânio. O osso occipital foi cortado com ajuda de uma tesoura fina e pontiaguda. O corte foi estendido mediana e lateralmente como mostrado na figura III.2. Uma pinça foi utilizada para levantar e partir os ossos cranianos superiores que envolvem o cérebro. Em seguida, uma espátula flexível foi inserida por sua base para separá-lo do sistema respiratório medular. O cérebro foi cuidadosamente retirado e então depositado em um recipiente contendo solução Normal oxigenada e resfriada (0 a 2 °C). Após esse procedimento, o cérebro foi transferido a uma placa de Pétri contendo filtro de papel. O cérebro foi constantemente banhado por solução Normal, e imediatamente dissecado com auxílio de um bisturi cirúrgico. O cerebelo foi retirado, figura III.3 itens 1, 2 e 3, e um corte mediano separa os dois hemisférios, itens 4 e 5. Enquanto um dos hemisférios foi dissecado, o outro foi mantido em Ringer gelado. Um corte inclinado separa parte do córtex frontal. Utilizando micro-espátulas especiais, o tálamo foi retirado, figura III.2 item 6. Nesse ponto, foi possível distinguir o hipocampo que fica, em parte, coberto pelo tálamo. As micro-espátulas foram introduzidas por baixo e nas laterais do tecido de forma bastante suave e movimentos laterais ajudam a separá-lo do resto do córtex, figura III.3 itens 7, 8, 9. O mesmo procedimento foi realizado para o outro hemisfério.



**Figura III.2** – Procedimento realizado para retirada do encéfalo de rato da cavidade craniana. A) abertura do escalpo, 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).



**Figura III.3** – Preparação de fatias de hipocampo em cérebro de rato. Os itens 1, 2, 3, 4 e 5 mostram os cortes realizados para facilitar a dissecação. No item 6 é mostrado um detalhe da separação do tálamo, com ajuda de micro-espátulas. Em 7, 8 e 9 o hipocampo é isolado do restante do córtex.

Depois de isolado, o hipocampo foi levado ao fatiador, onde foi depositado sobre filtros de papel com a face alveolar disposta para cima. Com ajuda de um pincel fino, o hipocampo foi posicionado de forma a se obter fatias em ângulos de 15° a 30° sobre o eixo da região septo-temporal. Fatias de 400 µm de espessura foram retiradas do terço médio do hipocampo e colocadas em uma câmara contendo solução Normal oxigenada e à temperatura de 32 °C. Nesse momento, foi importante observar sempre que lâmina do fatiador estivesse bem ajustada, de forma que seu corte alcance metade da espessura do filtro de papel, permitindo um corte preciso das fatias.

### III.1.3 – Soluções utilizadas

Para sustentar as atividades metabólicas do tecido foi utilizada a solução de perfusão, chamada nesse trabalho de Normal. A indução de atividades epileptiformes foi obtida elevando-se a concentração de  $K^+$  e zerando-se a concentração de  $Ca^{2+}$  da

Normal. Essa variação da Normal é denominada “Zero-cálcio” (tabela III.1). A variação na excitabilidade do meio foi feita diminuindo a  $[K^+]_o$  da solução zero-cálcio.

Tabela III.1 – Composições das soluções de perfusão e de indução utilizadas nos experimentos com hipocampo de rato (valores em mM).

Substância	Solução Normal	Solução Zero cálcio
NaCl	127,0	127,0
KCl	2,0	7,0
MgSO <sub>4</sub> *	1,5	1,5
NaHCO <sub>3</sub>	26,0	26,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1	1,1
Glicose	10,0	10,0
CaCl <sub>2</sub> *	2,0	0,0

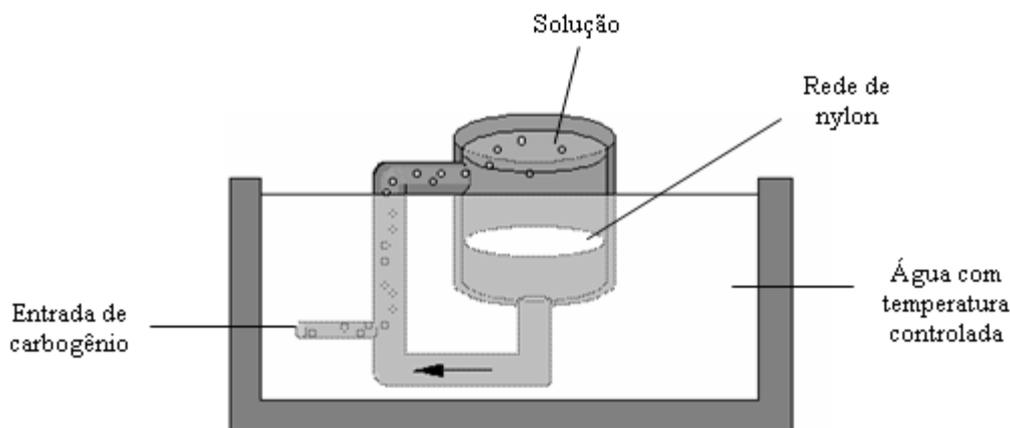
\* sais adicionados após o ajuste do pH em 7,4

O pH foi ajustado para 7,4 por meio de borbulhamento com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). A concentração utilizada de NaHCO<sub>3</sub> garante que, em condições de borbulhamento constante e saturado de carbogênio, o pH estabilize em 7,4. Os compostos CaCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> foram adicionados após o ajuste de pH.

## III.2 – Equipamentos utilizados

### III.2.1 – Câmara de perfusão

A câmara de perfusão é o local onde as fatias se restabelecem dos traumas sofridos durante o fatiamento do hipocampo. Essa câmara foi fabricada com conexões e tubos em PVC, os quais são arranjados formando uma estrutura em U (figura III.4). Uma rede de nylon é colocada no compartimento com diâmetro maior, e era nesse local que as fatias descavam. Todo o sistema era preenchido com solução Normal que era continuamente oxigenada para manter o pH em torno de 7,4. As fatias eram mantidas submersas nessa câmara por no mínimo 50 minutos. Após esse período, as fatias estavam aptas ao protocolo de indução da atividade epileptiforme na câmara de interface.



**Figura III.4** – Diagrama esquemático da câmara de perfusão montada com tubos e conexões em PVC. A câmara é preenchida com solução de perfusão, mantida a temperatura e oxigenação constantes. As fatias são depositadas no ramo de maior diâmetro sobre uma rede de nylon.

### III.2.2 – Câmara de Interface

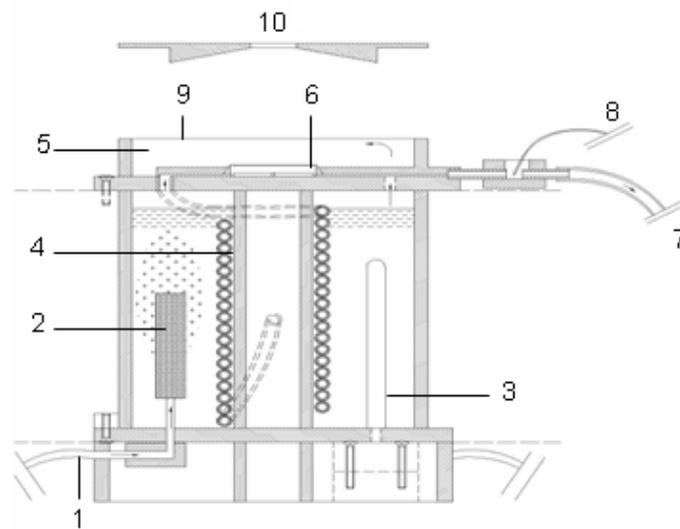
A câmara de interface utilizada, desenvolvida no Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional da Universidade Federal de São João del-Rei (Lanec-UFSJ), é dividida em duas partes principais: a cuba e o banho-maria.

O banho-maria é composto por um tubo de acrílico com uma base em acrílico colada em sua parte inferior. Dentro do tubo encontra-se uma mangueira de silicone, um resistor de 5  $\Omega$  envolvido por uma estrutura de alumínio, dois borbulhadores e água destilada. O resistor que é submetido a uma tensão contínua de até 10 V, aquece a água para manter a temperatura da solução de banho em aproximadamente 32 °C. A água contida no banho-maria aquece as paredes do tubo, e a mangueira de silicone por onde passa a solução de banho. Mangueiras de silicone conduzem o oxigênio aos borbulhadores que dispersam o carbogênio dentro da água. Assim o oxigênio é aquecido e umidificado para, a seguir, ser direcionado sobre a face superior das fatias mantidas na cuba.

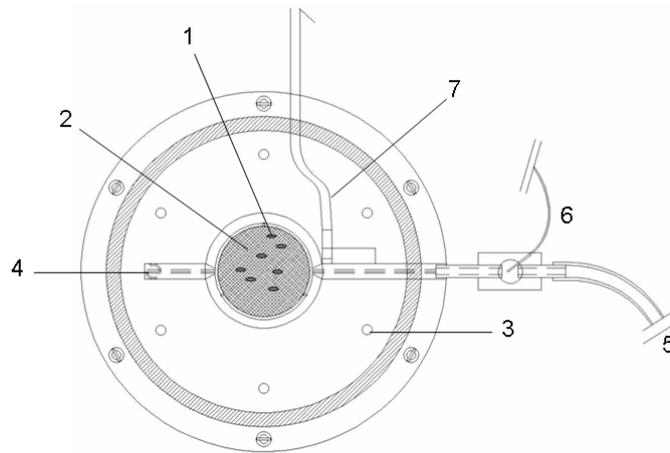
A cuba é composta por dois cilindros de acrílico acoplados a uma base em acrílico que se encaixa superiormente ao banho-maria. Na cuba existem dois furos para que a solução entre por uma extremidade do cilindro central, e saia pela outra. O cilindro central forma um compartimento onde se coloca uma membrana Milipore. Na parte superior da membrana ficam as fatias e, por baixo dela, passa a solução de banho. Depois de banhar as fatias, a solução chega até um compartimento que a retém, e é sugada de forma a não provocar vibrações no sistema.

Para uma oxigenação eficiente e homogeneização da temperatura é utilizada uma tampa em forma de disco para cobrir a cuba. Essa tampa contém um orifício central permitindo a inserção dos eletrodos e a exaustão do carbogênio. Para evitar a condensação na superfície dessa tampa e na ponta dos eletrodos, filtros de papel são colocados sob a tampa e enrolados nos eletrodos de aquisição.

A figura III.5 mostra uma visão lateral da câmara de interface (banho-maria e cuba) com cada um de seus componentes apresentados anteriormente. A figura III.6 mostra a visão superior da cuba, local onde as fatias de hipocampo se encontram para o registro das AENS.



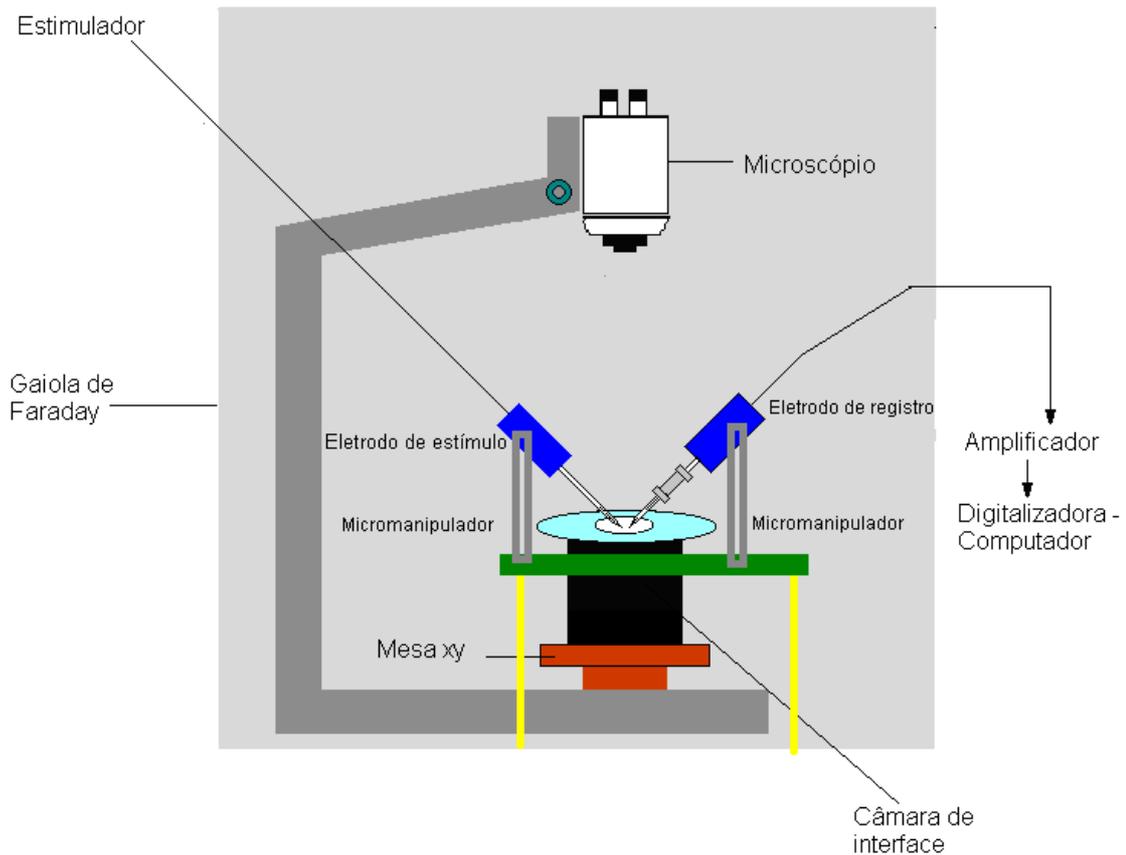
**Figura III.5** – Diagrama esquemático da câmara de interface (banho-maria e cuba). Em 1, está representado o do tubo de silicone que conduz o carbogênio para o interior da câmara. Em 2, um dos dois borbulhadores de oxigênio existentes na câmara. Em 3, uma das quatro resistências envolvidas em envólucros 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.6** – 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. O item 6 representa o fio de prata cloretada utilizado como terra da solução, e finalmente, em 7 tem-se a representação do termômetro que mede a temperatura da solução que chega às fatias.

### **III.2.3 – Aquisição do potencial elétrico extracelular**

Para aquisição do registro elétrico da atividade neuronal extracelular, foi utilizada a montagem esquematizada na figura III.7. Esta montagem constou dos micromanipuladores, responsáveis pelo posicionamento dos eletrodos, microscópio e amplificadores.



**Figura III.7** – Diagrama da montagem experimental com os principais equipamentos utilizados para o registro das AENS espontâneas e evocadas pela eletroestimulação. Os eletrodos de estímulo e registro são fixados e posicionados em micromanipuladores e conectados no eletroestimulador e no amplificador respectivamente. A visualização das fatias é feita por meio de um microscópio que auxilia no posicionamento dos eletrodos. A mesa xy posiciona a região de interesse na posição dos eletrodos. A gaiola de *Faraday* evita que ruídos externos impossibilitem o registro das AENS. O registro das AENS é feito por uma placa digitalizadora que converte os dados para serem gravados no computador.

### *Eletrodos*

O eletrodo de registro era formado por um filamento de prata cloretada, colocado dentro de micropipetas de vidro preenchidas por solução de NaCl a 1,0 M. As micropipetas de vidro eram estiradas por meio de um puxador de pipetas (modelo DMZ UNIVERSAL PULLER – ZEITZ-INSTRUMENTS). A impedância final do eletrodo foi de 5 a 10 M $\Omega$ , suficiente para proporcionar um baixo nível de ruído. O eletrodo de referência correspondeu a um fio de prata cloretada.

A cloretagem foi necessária para evitar o efeito de bateria provocado pela diferença de cargas entre a solução e o eletrodo. A cloretagem foi feita mergulhando-se dois filamentos de prata em solução de HCl 1,0 M. Em seguida, utilizando-se uma fonte de

corrente contínua, foi aplicada uma tensão de até 1,0 V entre os filamentos, durante 5 minutos, aproximadamente. O eletrodo a ser cloretado era ligado ao pólo positivo da fonte. O filamento ligado ao terminal positivo atraía os ions  $\text{Cl}^-$  formando uma capa escura sobre a superfície, enquanto o outro terminal atraía os ions  $\text{H}^+$ .

#### *Amplificadores*

Após cloretado, o eletrodo de registro foi conectado a headstage do amplificador (Duo 773, WPI) para a aquisição do sinal. O eletrodo de referência estava conectado no pino terra do amplificador. O sinal foi amplificado 10 vezes e a saída do amplificador foi conectada a entrada de outro amplificador (Isodam, WPI). Esse outro amplificador com ganho de 10 vezes filtrava o sinal limitando a frequência em 3 KHz.

#### *Aquisição do sinal*

O sinal foi digitalizado a uma frequência de 6 KHz por uma placa digitalizadora (National Instruments) de 16 bits e gravado com o auxílio de um programa desenvolvido em Labview (SILVA,2000). Esse sinal foi processado e suas características foram extraídas com a ajudar do programa MATLAB 6.0 (MATHWORKS).

### **III.2.4 – Sistema de estimulação**

#### *Eletrodo*

Para evitar dano ao tecido, foi utilizado um eletrodo construído com um capilar de vidro do tipo teta, que foi estirado de forma a obter um diâmetro de 3 – 5  $\mu\text{m}$ . O capilar, com um fio de prata em cada lado, foi preenchido com a solução extracelular. Os fios de prata não foram cloretados para evitar que a superfície cloretada se desprendesse e pudesse obstruir a ponta do eletrodo. As extremidades dos fios de prata foram conectadas a fonte de corrente. Esse tipo de eletrodo foi utilizado porque o produto resultante da reação eletroquímica de um eletrodo metálico pode causar dano no tecido (MERRILL, *et. al.*, 2005).

Devido à ausência das conexões sinápticas, o eletrodo de estímulo foi posicionado no hilus. Assim, as fibras axonais das células granulares do GD foram estimuladas produzindo uma resposta que podia gerar, ou não, uma atividade epileptiforme.

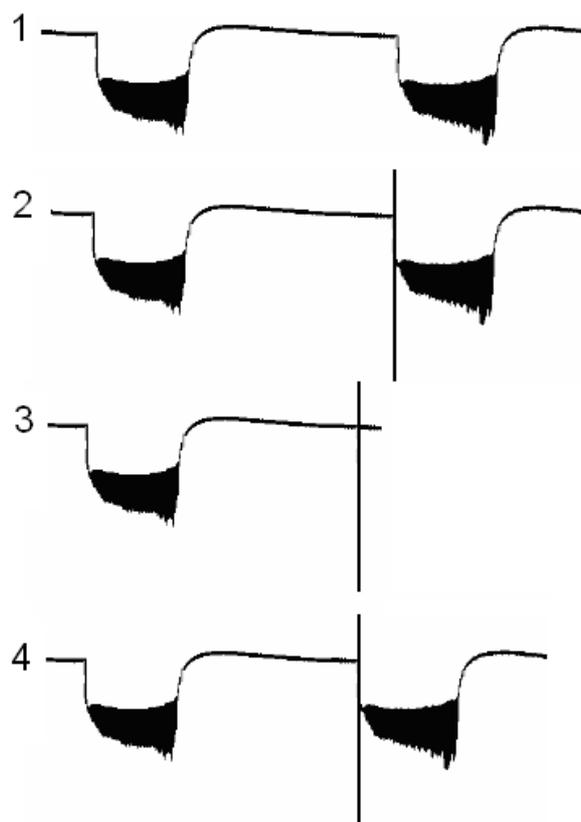
### *Estimulador*

O estímulo único aplicado foi gerado por uma fonte de corrente (ISOSTIM A320, WPI) e ajustado de acordo com a resposta máxima encontrada quando a fatia estava sendo banhada pela solução de alto potássio (8.1 mM). Os valores da amplitude e duração do estímulo monopolar variavam respectivamente de 1 a 10 mA, e de 300 a 550  $\mu$ s.

### **III.2.4.1 – Protocolos de estimulação**

#### *Estudo da influência de estímulos na refratariedade*

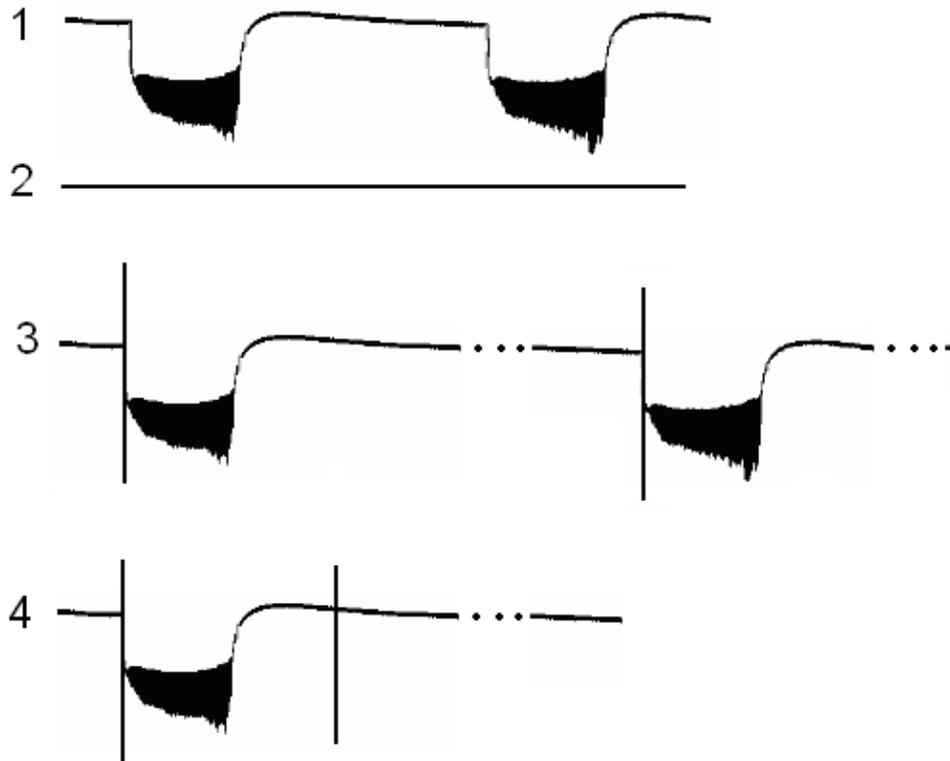
Para estudar a influência do estímulo na refratariedade, foram induzidas AENS's e observou-se o intervalo médio entre os eventos epileptiformes (figura III.8 item 1). Depois de conhecido esse intervalo, esperou-se que um novo evento espontâneo ocorresse, evento este denominado "A". Com um estímulo mínimo, tentou-se evocar uma nova AENS, denominada de "B", imediatamente antes da ocorrência de uma nova espontânea (figura III.8 item 2). Se o estímulo não fosse capaz de evocar um novo evento (figura III.8 item 3), esperava-se uma nova AENS espontânea e, com um estímulo maior, aplicado no mesmo instante após a descarga espontânea, tentava-se evocar um novo evento (figura III.8 item 4). Uma vez conseguida uma resposta, esperou-se um novo evento espontâneo, para a aplicação de um novo estímulo, desta vez, a um intervalo de tempo do espontâneo ainda menor que no procedimento anterior. Esse processo foi repetido cobrindo-se todo o intervalo inter-eventos espontâneos, incluindo-se, ainda, estímulos aplicados no momento da recuperação do evento espontâneo.



**Figura III.8** – Diagrama esquemático do protocolo de estimulação para estudo da influência do estímulo na refratariedade. Em 1, dois eventos espontâneos. Em 2, o segundo evento é evocado por estimulação, antes da ocorrência do espontâneo. Em 3, um estímulo, de baixa intensidade, é insuficiente para evocar um evento. Em 4, para a mesma situação de 3, o estímulo é intensificado a ponto de evocar o evento.

#### *Estudo da influência da concentração extracelular de potássio na refratariedade*

Após o registro das AENS's espontâneas (figura III.9 item 1), trocou-se a solução de indução por outras contendo menor  $[K^+]_o$ , o que reduziu a excitabilidade do tecido, suprimindo os eventos espontâneos (figura III.9 item 2). Após a troca, iniciou-se o protocolo de duplo pulso. O primeiro foi aplicado quando o sistema estava apto a apresentar uma AENS de duração máxima (primeiros estímulos do item 3 e 4 da figura III.9). O segundo foi aplicado em tempos diferentes, após o fim do primeiro evento evocado (segundos estímulos do item 3 e 4 da figura III.9).



**Figura III.9** – Diagrama esquemático do protocolo de estimulação para estudo da influência da concentração extracelular de potássio na refratariedade. Em 1, dois eventos espontâneos. Em 2, após a redução da concentração extracelular de potássio, os eventos são suprimidos. Em 3, dois estímulos subseqüentes evocam eventos. Em 4, a proximidade temporal dos estímulos não permite que o segundo estímulo evoque evento.

### III.2.5 – Sistema de visualização e periféricos

Para visualizar as fatias, foi utilizado um microscópio que permitiu uma ampliação de até 45 vezes. A montagem do microscópio foi feita de forma que a objetiva estivesse perpendicular à mesa XY (figura III.7), tornando-se, assim, possível a visualização da parte superior das fatias e uma melhor visualização de suas camadas.

O posicionamento dos eletrodos foi feito com o auxílio de micro-manipuladores mecânicos (modelo MC-35A – NARISHIGE INTERNATÍONAL). Em um dos micromanipuladores foi fixada a headstage do amplificador e no outro o eletrodo de estímulo.

Toda a montagem foi feita sobre uma base inercial suspensa por câmaras de ar, prevenindo distúrbios mecânicos durante o experimento. Além disso, a montagem foi

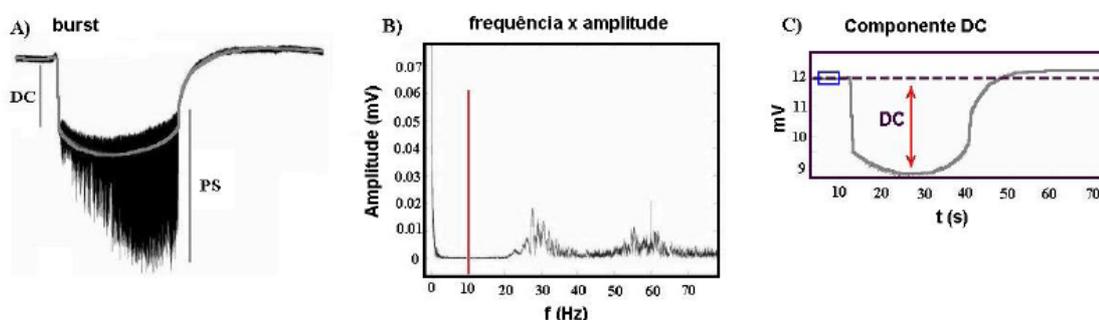
envolvida por uma gaiola de Faraday, blindando os equipamentos de possíveis interferências eletromagnéticas.

### III.3 – Análise do potencial elétrico extracelular

Os cálculos de amplitude da componente de baixa frequência (DC), duração do evento epileptiforme (DE), intervalo entre os eventos (IE) e a amplitude média do primeiro population spike evocado pelo estímulo (APS), e a latência do PS (LPS) foram realizados numa rotina desenvolvida em MATLAB.

#### *Amplitude da Componente DC*

Para determinação da amplitude da componente DC, foi utilizada a Transformada Rápida de Fourier (FFT). Isso possibilitou retirar do PEE (figura III.10 A) o sinal de baixa frequência ( $< 10$  Hz). A linha de base do sinal foi calculada como sendo o valor médio de um trecho, durando cinco segundos, do PEE antes do evento (Figura III.10 C). A diferença entre o valor mínimo alcançado pelo sinal de baixa frequência e a linha de base do sinal é a amplitude da componente DC (figura III.10 C).



**Figura III.10** – Etapas para obtenção da componente DC que corresponde a componente de baixa frequência ( $< 10$  Hz) do potencial elétrico. (A) Registro do potencial elétrico de uma AENS com suas componentes de baixa e alta frequência. A componente de baixa frequência corresponde ao DC, e a de alta frequência aos Population Spike's (PS). (B) Gráfico mostrando as frequências que compõe o sinal elétrico com suas respectivas amplitudes em mV. A linha vermelha separa a componente DC dos PS's. (C) Componente DC. O seu valor máximo é tido como referência para cálculo do início e fim do evento.

#### *Duração do evento*

A duração do evento (DE) foi estimada utilizando a linha de base e a componente DC do sinal. Primeiro, determinou-se os pontos de início e fim do evento. O tempo

inicial do evento correspondeu ao instante onde o sinal atinge uma variação de 20% da amplitude máxima da componente DC (Figura III.11). O tempo final correspondeu ao instante onde houve uma recuperação do sinal até que fosse atingido 20% da amplitude máxima da componente DC (Figura III.11). A duração do evento foi calculado como a diferença entre o tempo final e o tempo inicial (Figura III.11).

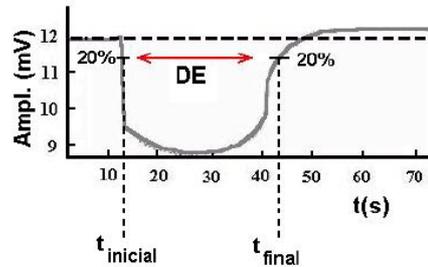


Figura III.11 – Cálculo da duração do evento epileptiforme. Com a amplitude da variação máxima encontra-se os pontos definidos como início e fim do evento. A diferença entre o tempo final e o tempo inicial do *burst* é a duração do evento.

#### *Intervalo entre eventos*

O intervalo entre eventos foi considerado como sendo a diferença do tempo final de um evento até o tempo inicial do próximo (Figura III.12).

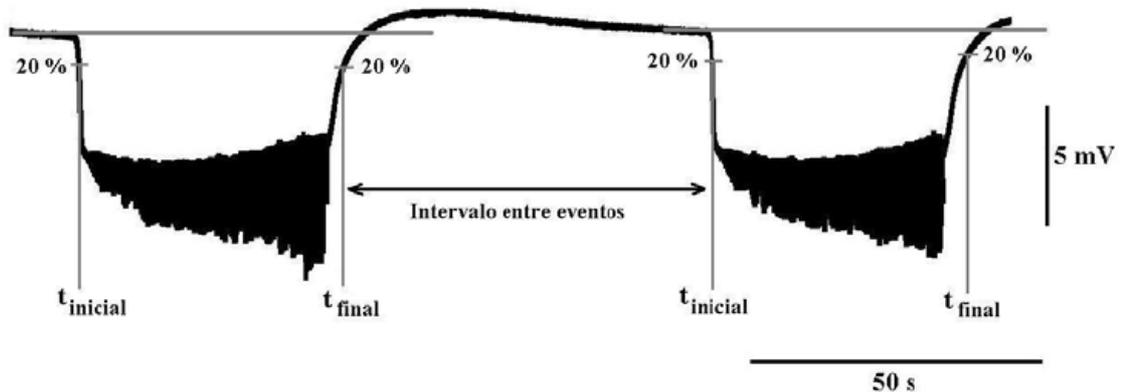
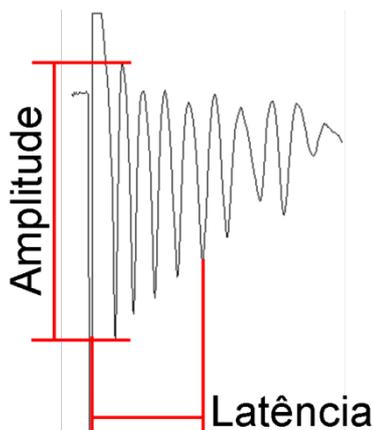


Figura III.12 – Cálculo do intervalo entre duas AENS. A diferença entre o início do segundo evento pelo fim do primeiro é o intervalo entre eles.

#### *Amplitude e latência do PS*

Um estímulo antidrômico aplicado sobre o tecido neuronal em condições de excitabilidade gera uma resposta em PS. Essa resposta dependeu da intensidade do estímulo e da situação em que o tecido se encontrava. Na figura III.13, mostra-se uma resposta ao estímulo típica, quando o tecido está em condições de hiperexcitabilidade.

O cálculo da amplitude do primeiro PS foi calculado como a diferença pico a pico. A latência foi calculada como a diferença do tempo de ocorrência do PS pelo tempo do início do estímulo.



**Figura III.13** – Cálculo da amplitude e latência do PS evocado pelo estímulo. A amplitude é calculada pela diferença entre o valor máximo e mínimo do PS. A latência é o tempo entre o estímulo e a ocorrência do valor máximo do PS.

### **III.4 – Modelo Computacional**

Em conjunto com os estudos experimentais, foram realizadas simulações computacionais utilizando um modelo matemático para as atividades epileptiformes do GD (ALMEIDA *et. al.*,2008). Essas simulações auxiliaram na identificação dos mecanismos biofísicos envolvidos. Para isso, o modelo foi adaptado para simular a condição experimental desenvolvida neste trabalho.

#### **III. 4.1 – Estrutura geral do modelo**

O modelo computacional utilizado de maneira a mimetizar a geometria da região do GD do hipocampo. Nessa região, encontram-se densos pacotes de células neuronais e gliais, que são representadas por pares de compartimentos neurônio-glia. Esses pares comunicam entre si e entre outros por meio do espaço extracelular, também representado no modelo.

No modelo, as células foram representadas por esferas com diâmetro de 20 $\mu$ m. Nessas células, foram incluídos os mecanismos relevantes que atuam durante atividades epileptiformes. Esses mecanismos descrevem a comunicação das células entre si e entre o meio extracelular.

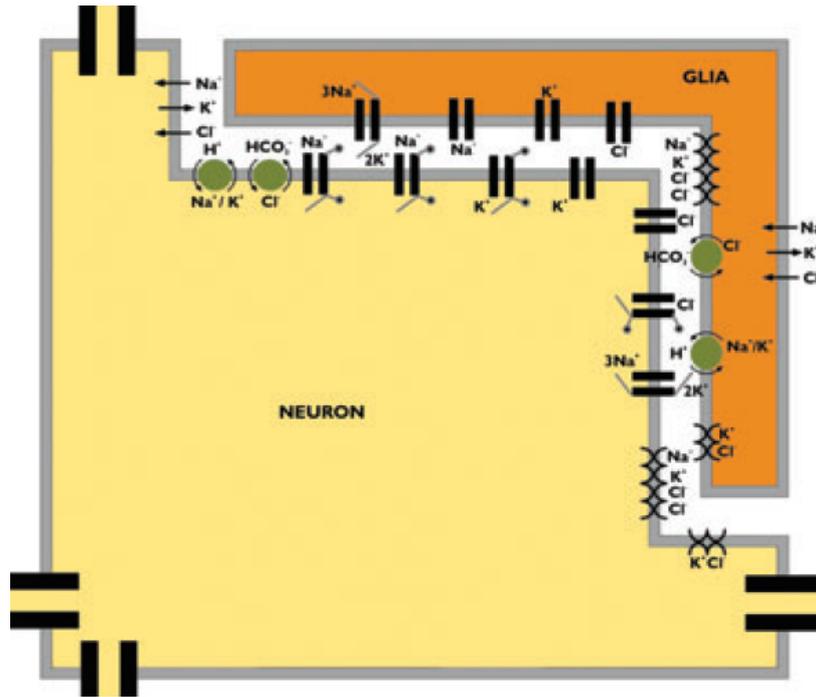
Essas células são cercadas pelo espaço extracelular, modelado como uma rede tridimensional de compartimentos justapostos. Cada compartimento comunica entre si e com um par de corpos celulares. As concentrações desses íons são constantes nas bordas da rede tridimensional, simulando o efeito da perfusão do tecido. O volume de cada compartimento extracelular é adotado, no repouso, como sendo 7% do volume dos corpos celulares.

Todos os mecanismos utilizados no modelo foram ajustados tendo como base resultados experimentais, permitindo comparar os resultados computacionais com os experimentais.

As simulações das atividades epileptiformes foram realizadas com uma rede tridimensional contendo 625 neurônios, dispostos conforme descrito anteriormente. A rede é mantida, durante os 10s iniciais, em condição de repouso equivalente a perfusão das fatias com solução Normal. Após esses 10s de atividade neuronal, a concentração do  $K^+$  nos compartimentos de borda é aumentada. Essa manobra simula a perfusão de fatias de tecido com solução contendo alto- $K^+$ .

#### III. 4.2 – Estruturas específicas do modelo

Nos neurônios foram incorporados mecanismos de transporte iônicos, como as bombas de Na/K, mecanismo de co-transporte  $K^+-Cl^-$  eletrodifusão intercelular, através de gap-junctions, e os canais iônicos de  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Na^+$ . Em glias, são considerados os mecanismos de co-transporte  $Na^+ - K^+ - Cl^-$ , bombas de Na/K e canais iônicos de  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Na^+$ . No espaço extracelular, a movimentação iônica foi simulada por meio da eletrodifusão (TEIXEIRA et al., 2001). Na figura III.14, mostra-se uma unidade funcional do modelo utilizado para as simulações.



**Figura III.14** – Unidade funcional do modelo computacional utilizado, composta por um neurônio, glia e o espaço extracelular. Nas membranas neuronais e gliais são indicados os mecanismos representados em cada modelo celular.

As equações que regem o comportamento de cada um desses mecanismos são mostradas na tabela III.2. Na tabela III., encontram-se as descrições dos símbolos envolvidos nas equações.

Tabela III.2 – Equações referentes aos mecanismos relacionados na figura III e simulados no modelo (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Nº	Descrição	Equação
1	Eletródifusão para o meio extracelular	$\frac{\partial C_j}{\partial t} = \frac{D_j}{\lambda^2} \nabla^2 C_j + \frac{z_j F D_j}{RT \lambda^2} \nabla C_j \nabla V + \frac{z_j F D_j}{RT \lambda^2} C_j \nabla^2 V$
2	Potencial elétrico lento no meio extracelular	$\nabla V = - \frac{RT}{F} \frac{z_{Na} D_{Na} \nabla C_{Na} + z_K D_K \nabla C_K + z_{Cl} D_{Cl} \nabla C_{Cl}}{z_{Na} D_{Na} C_{Na} + z_K D_K C_K + z_{Cl} D_{Cl} C_{Cl}}$
3	Potencial elétrico rápido no meio extracelular	$V_{PA} = \sum_{n=1}^N \frac{k \cdot I_n^m}{d_n}$
4	Gradiente de potencial total no meio extracelular	$\nabla V_{total}(x, y, z, t) = \nabla V(x, y, z, t) + \nabla V_{PA}(x, y, z, t)$
5	Gap-junction	$I_j^{gj(i)} \approx - z_j F D_j^{gj} \left( \frac{C_j^{(i)} - C_j^{(i+1)}}{d} + \frac{z_j F D_j}{RT} C_j^{(i)} \frac{V_m^{(i)} - V_m^{(i+1)}}{d} \right)$

6	Correntes iônicas transmembrânicas	$I_j = P_j z_j^2 \frac{FV_m}{RT} \frac{C_j^i e^{\frac{z_j FV_m}{RT}} - C_j^o}{e^{\frac{z_j FV_m}{RT}} - 1}$
7	Co-transporte (KCC)	$\phi_{KCC} = Q_{KCC} \frac{C_K^i C_{Cl}^i - C_K^o C_{Cl}^o}{(K_k + C_K^i + C_K^o)(K_{Cl} + C_{Cl}^i + C_{Cl}^o)}$
8	Co-transporte (NKCC)	$\phi_{NKCC} = Q_{NKCC} \frac{C_{Na}^i C_K^i (C_{Cl}^i)^2 - C_{Na}^o C_K^o (C_{Cl}^o)^2}{(K_{Na} + C_{Na}^i + C_{Na}^o)(K_k + C_K^i + C_K^o)(K_{Cl} + C_{Cl}^i + C_{Cl}^o)^2}$
9	Bomba de Na/K	$I_p = P_p \frac{FV_m}{RT} \frac{C_p^i e^{\frac{FV_m}{RT}} - C_p^o}{e^{\frac{FV_m}{RT}} - 1}$
10	Potencial transmembrânico	$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{P_{Na} C_{Na}^o + P_K C_K^o + P_{Cl} C_{Cl}^i + P_p C_p^o + f}{P_{Na} C_{Na}^i + P_K C_K^i + P_{Cl} C_{Cl}^o + P_p C_p^i + 1} \right)$ $f = - \frac{A_{gj} \sum I_j^{gj}}{A_m} \cdot \left( e^{\frac{FV_m}{RT}} - 1 \right) \cdot \frac{RT}{F^2 V_m} + e^{\frac{FV_m}{RT}}$
11	Varição de volume	$V_i = \frac{V_{total} \left( \sum n_j^i + n_s^i \right)}{\sum n_j^o + n_s^o + \sum n_j^i + n_s^i}$

Tabela III.3 – Símbolos das equações da Tabela 1 e sua descrição (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Símbolo	Descrição
$\nabla$	Operador Gradiente
$D_j^{gj}$	Constante de difusão do íon $j$ nas <i>gap-junctions</i>
$K_{ADP,P}^i$	Constantes de dissociação de ADP e fósforo
$K_{ATP}^i$	Constantes de dissociação de ATP
$K_{Na}^i$ e $K_K^i$	Constantes de dissociação intracelulares de $Na^+$ e $K^+$
$K_{Na}^o$ e $K_K^o$	Constantes de dissociação extracelulares de $Na^+$ e $K^+$
$\lambda$	Tortuosidade do meio extracelular <sup>4</sup>
$\phi$	Fluxo iônico (mM/s)
$\nabla^2$	Operador Laplaciano
$[X]_y$	Concentração do íon X no meio $y$ ( $y = o$ , extracelular; $y = i$ , intracelular). ex:

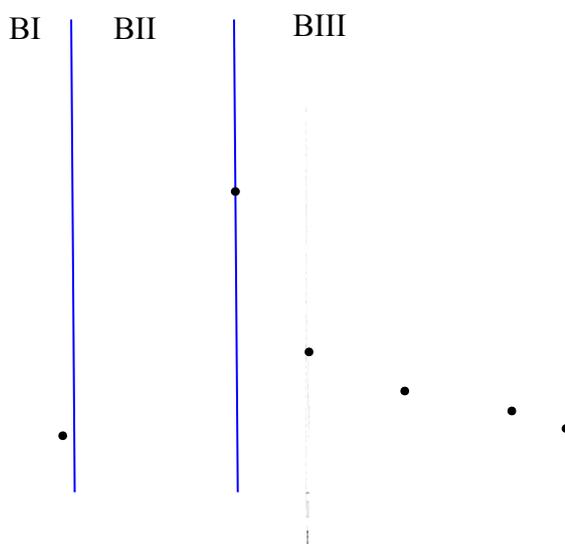
	$[K^+]_o$
$A_{gj}$	Área da <i>gap-junctions</i>
$A_m$	Área da membrana
$C$	Concentração iônica (mM)
$D_j$	Constante de difusão iônica do íon $j$ ( $cm^2/s$ )
$d_n$	Distância entre o centro do corpo celular neuronal $n$ e o ponto onde está sendo calculado o potencial
$F$	Constante de Faraday (96,487 C/mMol)
$I_n^m$	Corrente total de membrana no neurônio $n$
$P_j$	Permeabilidade transmembrânica do íon $j$
$Q_{KCC}$	Constante de proporcionalidade do co-transporte KCC
$Q_{NKCC}$	Constante de proporcionalidade do co-transporte NKCC
$V$	Potencial extracelular
$V_g$	Volume glial
$V_m$	Potencial de membrana
$V_n$	Volume neuronal
$V_{PA}$	Potencial elétrico no compartimento $(x,y,z)$ provocado pelas correntes transmembrânicas
$z_j$	Valência do íon $j$

Os protocolos experimentais demonstrados na seção III.2.4 foram simulados no modelo computacional. Para análise dos resultados da simulação computacional, foram utilizados os mesmos procedimentos de extração do PEE experimental, como indicado nas seções III.3.

## CAPÍTULO IV – RESULTADOS

### IV.1 – Influência do estímulo na refratariedade

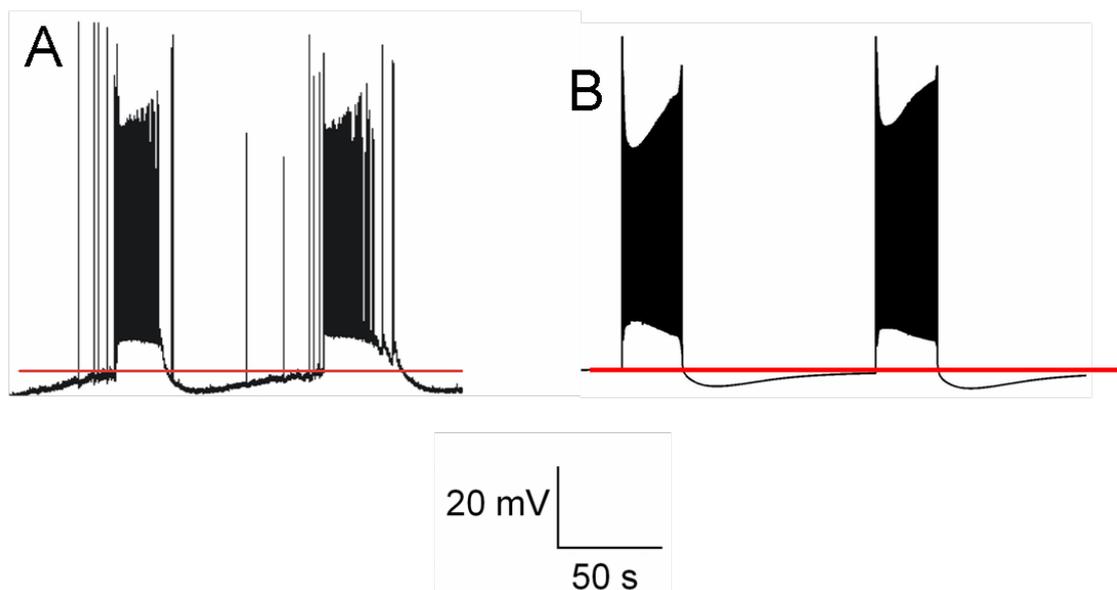
Para o estudo experimental, foram realizados sete experimentos, nos quais foram aplicados 70 pulsos, para 42 dos quais foi possível evocar um novo evento. Observou-se que a possibilidade de se evocar um *burst* depende da intensidade e localização temporal do estímulo. Se o estímulo for dado durante a recuperação do evento espontâneo, correspondendo ao período que denominamos B-I, um estímulo de baixa intensidade é capaz de evitar a finalização da AENS espontânea (figura IV.1). Uma vez finalizado um evento, há um período, BII, onde um novo *burst* não pode ser evocado nem mesmo por estímulos de alta intensidade (figura IV.1). Após o fim desse período, inicia-se BIII, onde um novo evento pode ser evocado e, quanto maior o intervalo entre o estímulo e o final do evento anterior, menor a intensidade necessária para evocar esse novo *burst*, como mostrado na figura IV.1.



**Figura IV.1** – Dependência da localização temporal e da intensidade do estímulo. (A) Quando o estímulo for aplicado antes do término do evento, um estímulo mínimo é capaz de prolongar o evento espontâneo. (B) Período onde não é possível evocar um novo evento. (C) Período onde um novo evento pode ser evocado, e quanto maior o intervalo entre o evento espontâneo, menor a intensidade necessária para evocar um novo evento.

Na figura IV.2, mostra-se o comportamento do potencial intracelular de dois eventos espontâneos obtidos experimentalmente e computacionalmente. As linhas horizontais

nos dois gráficos mostram o possível limiar para disparo em *burst*, traçado para o registro experimental e o limiar calculado para a simulação. Após o fim do primeiro evento epileptiforme, o potencial intracelular se encontra acima do limiar. O potencial intracelular tende a se afastar do limiar, se hiperpolarizando até atingir um mínimo. Após isso, o potencial tende a se aproximar do limiar até ultrapassá-lo, iniciando um novo evento espontâneo. Essa comparação permite identificar os três períodos caracterizados na figura IV.1. Um estímulo de baixa intensidade consegue evocar um novo *burst*, quando aplicado logo após o cessar da salva de potencias de ação, quando o potencial intracelular se encontra ainda bem próximo do limiar (BI). O período no qual não se pode evocar um novo evento (BII) parece estar associado ao período em que o potencial intracelular rapidamente se afasta negativamente do limiar. Num terceiro momento, à medida que o potencial se despolariza gradativamente, um estímulo de menor intensidade é requerido para que um novo evento se inicie (BIII).



**Figura IV.2** – Potencial intracelular de dois eventos epileptiformes espontâneos. (A) Experimental. (B) Computacional. As linhas horizontais nos dois gráficos mostram o possível limiar para disparo de um novo evento.

#### IV.1.2 – Investigação da refratariedade

Para melhor investigar os três períodos identificados, a excitabilidade do tecido foi reduzida manipulando-se a concentração de potássio extracelular até a supressão das atividades espontâneas. Cessadas as atividades espontâneas, pulsos pareados, com intervalos variados de tempo, foram aplicados. Aos primeiros eventos (resposta

máxima) denominamos tipo “A”. Em correspondência, aos referentes à resposta do segundo pulso pareado denominamos tipo “B”. Estas, portanto, dependentes do instante de aplicação do segundo estímulo. Os períodos para evocar eventos do tipo B, da mesma forma que observado no item anterior, podem também ser divididos em três tipos: BI, BII e BIII. A seguir são relatados os tipos de eventos evocados pelo segundo estímulo dos pulsos pareados.

#### Eventos evocados durante o período B-I

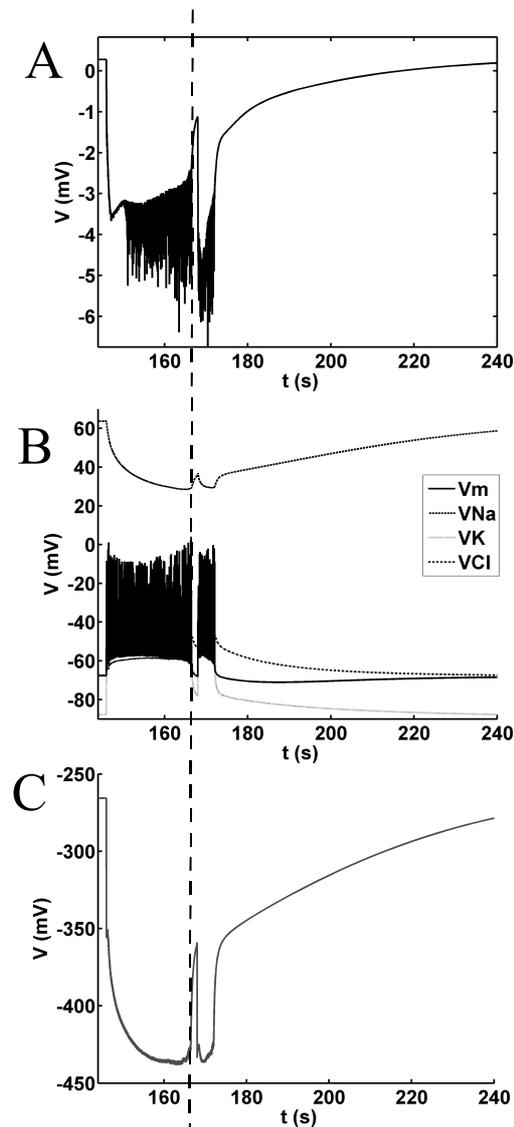
O término do evento epileptiforme é caracterizado pela recuperação da linha de base, com concomitante finalização dos PS's. Durante a fase de recuperação da linha de base, observou-se que um estímulo é capaz de prolongar o *burst* anterior. Na parte superior da figura IV.3, mostra-se, em detalhes, um *burst* obtido experimentalmente, evocado durante a recuperação da linha de base. Na parte inferior da figura, é possível observar as diferenças na amplitude e número dos PS's, evocados pelos primeiro e segundo estímulos.



**Figura IV.3** – Evento epileptiforme, evocado experimentalmente, durante a fase de recuperação (BI) de um evento anterior. A parte superior mostra um evento evocado após o fim da refratariedade do tecido e em seguida um novo evento gerado durante a recuperação na linha de base do potencial elétrico extracelular. Em destaque ao lado pode-se perceber os detalhes do evento evocado durante o período B-I. Na parte inferior é possível observar a diferença nas respostas evocadas imediatamente após os estímulos.

As simulações computacionais mostraram que com o término dos PS's o efluxo de  $\text{Na}^+$  pela bomba supera seu influxo pelos canais iônicos, caracterizando a ocorrência do segundo ponto crítico definido por Almeida et. al. (2008). Após ponto crítico, indicado

por uma linha tracejada vertical na figura IV.4, inicia-se o período B-I. Nesse período, a positividade do potencial de Nernst de  $\text{Cl}^-$  em relação ao potencial de membrana e a redução na negatividade do potencial de Nernst do  $\text{K}^+$ , bem como da bomba de Na/K (figura IV.4 B e C), também em relação ao potencial de membrana, conferem uma excitabilidade pós-evento favorável à deflagração de um novo evento (figura IV.4 A), caracterizada, no item IV.1.1 pela proximidade do limiar, logo após o cessar das salvas de potenciais de ação.



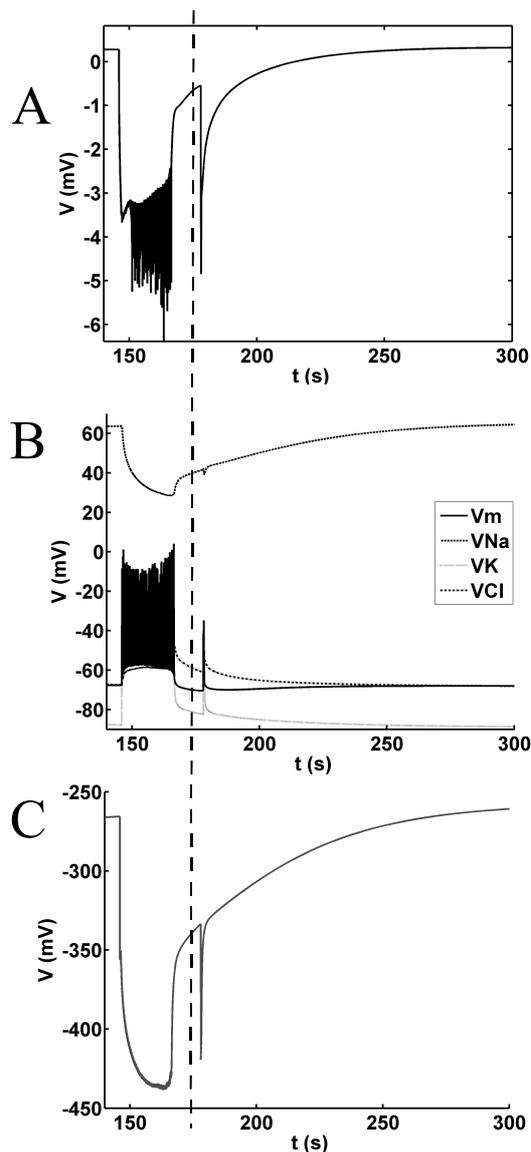
**Figura IV.4** – Evolução da excitabilidade durante o período B-I. (A) Potencial elétrico extracelular. (B) Potencial transmembrânico e reverso dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . (C) Potencial reverso da bomba de Na/K.

## Pós-descargas evocadas durante o período B-II

Durante o período B-II, um estímulo antidrômico é capaz de evocar uma pós-descarga, porém, não acompanhada de um evento típico não-sináptico. O período B-II se inicia quando há uma recuperação completa na linha de base. Na figura IV.5, mostra-se com detalhes uma resposta experimentalmente típica de BII. Na parte superior, pode-se observar a pós-descarga em resposta ao estímulo, concomitante com a rápida recuperação na linha de base, sem a presença de um burst não-sináptico.

**Figura IV.5** – Resposta experimental ao estímulo elétrico durante B-II . A parte superior mostra que nesse período o tecido não é capaz de evocar uma resposta em *burst*. A parte inferior mostra em detalhe que é possível registrar uma pós-descarga, sendo possível perceber que os neurônios estão fora do seu PRA.

Os resultados computacionais mostram que no período B-II, há uma redução na positividade do potencial de Nernst de  $\text{Cl}^-$  e um aumento na negatividade do potencial de Nernst do  $\text{K}^+$ , em relação ao potencial de membrana. Ambas alterações são intensas o suficiente para reduzir a excitabilidade e, portanto, para aumentar o limiar de disparo de um burst, em detrimento da redução da negatividade do potencial de Nernst da bomba (figura IV.6 C). Isso confere uma diminuição na excitabilidade pós B-I, que desfavorece a deflagração de um novo evento (figura IV.6 A).



**Figura IV.6** – Resultados computacionais para o período B-II. (A) Potencial elétrico extracelular. (B) Potencial transmembrânico e reverso dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . (C) Potencial reverso da bomba de  $\text{Na}/\text{K}$ .

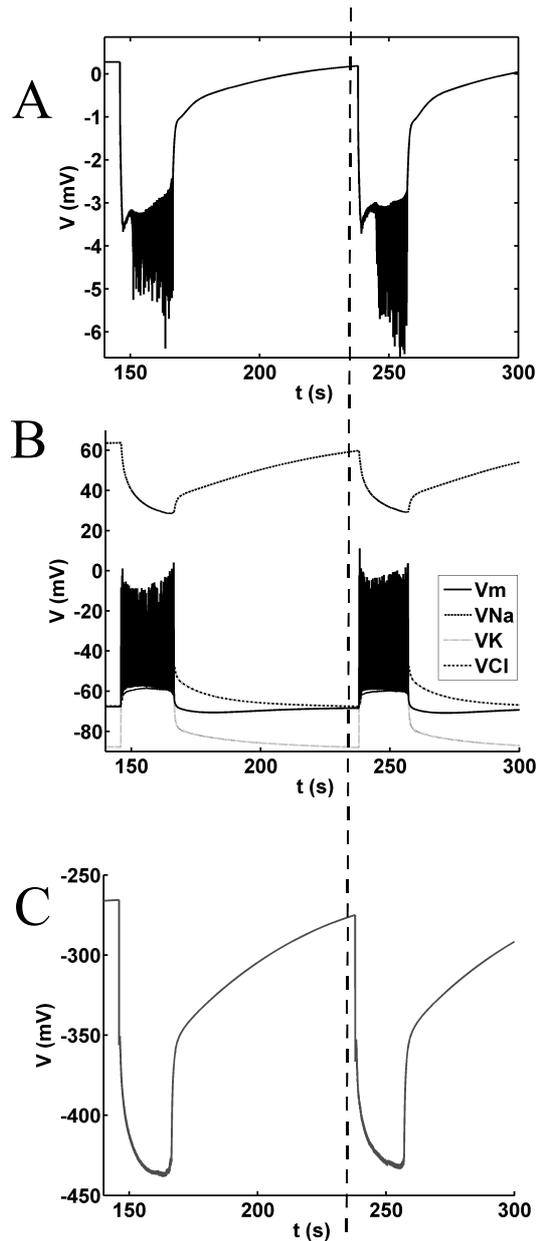
### Eventos evocados durante o período B-III

A partir do término do período B-II, quando o potencial intracelular se aproxima do limiar, observa-se que um estímulo é capaz de evocar um novo evento epileptiforme. Na figura IV.7, mostra-se que com o aumento da diferença temporal entre o término do primeiro evento e o instante de tempo da aplicação do segundo estímulo, favorece-se à deflagração de um segundo evento com características aproximando-se progressivamente da resposta ao primeiro estímulo.



**Figura IV.7** – Bursts evocados durante o período B-III. Nesse período o tecido é capaz de evocar uma resposta em burst. Quanto maior o intervalo temporal do segundo estímulo em relação ao final do primeiro evento, a resposta evocada tem características mais próximas da primeira.

De acordo com as simulações computacionais, o período B-III é marcado por uma redução progressiva na inibição provocada pela bomba de Na/K, que pode ser observada pelo aumento do seu potencial reverso (figura IV.8 C). A linha vertical tracejada na figura IV.8 indica o início desse período, no qual os potenciais de Nernst de  $K^+$  e  $Cl^-$  se encontram mais negativos do que no período B-II, mostrando que a excitabilidade desse período esta ligada a redução na atividade inibitória da bomba de Na/K. Durante esse período, um evento epileptiforme tipicamente não-sináptico pode ser evocado (figura IV.8 A).



**Figura IV.8** – Evolução da excitabilidade durante o período B-III. (A) Potencial elétrico extracelular. (B) Potencial transmembrânico e reverso dos íons  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$ . (C) Potencial reverso da bomba de Na/K.

#### IV.1.2.1 – Excitabilidade e potássio extracelular

A fim de alterar a excitabilidade, experimentos foram realizados para diferentes concentrações de potássio. Foram feitos 7 experimentos com  $[K^+]_o$  igual a 6,6 mM, 8 com  $[K^+]_o$  à 6,0 mM e 8 experimentos para a  $[K^+]_o$  igual a 5,8 mM. Para  $[K^+]_o$  igual a 6,6 mM foram aplicados 75 pulsos pareados, para 6,0 mM foram aplicados 60 e para 5,8 mM foram aplicados 49. O tempo entre o fim dos PS's do primeiro evento e a transição entre os períodos foi calculado. Também foi calculada a soma da duração de todos os

três períodos. Esses tempos para cada  $[K^+]_o$  são mostrados na Tabela IV.1, tanto para os resultados experimentais quanto para os computacionais.

Os resultados experimentais mostram que a transição de BI para BII ocorrendo  $4.27 \pm 0.83$  s,  $4 \pm 0.84$  s e  $4.76 \pm 0.85$  s após o fim do PS, respectivamente, às  $[K^+]_o$  iguais a 5,8 , 6,0 e 6,6 mM. A transição de BII para BIII ocorre  $110.8 \pm 7.14$  s,  $76.5 \pm 3.8$  s e  $53.8 \pm 2.09$  s, respectivamente, para as  $[K^+]_o$  iguais a 5,8 , 6,0 e 6,6 mM. O tempo entre o fim do evento anterior e instante onde é possível evocar um novo *burst* com características semelhantes ao primeiro, mostra dependência à  $[K^+]_o$ , e pode ser observado na figura IV.9. Esse tempo observado foi de  $256.2 \pm 6.04$ ,  $193.6 \pm 11.7$  e  $113.1 \pm 2$ , respectivamente, às  $[K^+]_o$  iguais a 5,8 , 6,0 e 6,6 mM. Com um nível de significância de 5%, não observa-se diferença estatística para a transição do período BI para BII. Para a duração do período B-II, o intervalo de confiança permite identificar diferenças estatisticamente significantes entre os pares de concentrações 5,8/6,0 , 5,8/6,6 e 6,0/6,6. O somatório da duração dos três períodos, para cada  $[K^+]_o$ , mostra diferenças estatísticas entre todos os grupos.

As simulações computacionais mostram que a transição de BI para BII ocorre 1.2 s após o fim do PS para todas as  $[K^+]_o$  simuladas. A transição de BII para BIII ocorre 44.2 s, 24.3 s e 17.1 s, respectivamente para as  $[K^+]_o$  iguais a 5,8 , 6,0 e 6,6 mM. O tempo entre o fim do evento anterior e o instante onde é possível evocar um novo burst, com características semelhantes ao primeiro, foi calculado e mostra dependência à  $[K^+]_o$ , que pode ser observada na figura IV.9. Esse tempo, em dependência das concentrações extracelulares de  $K^+$ , é de 165.2s, 104.3s e 92.1s, respectivamente, para  $[K^+]_o$  igual a 5,8 , 6,0 e 6,6 mM.

Tabela IV.1 – Resultados experimentais e computacionais para os tempos de transição do período BI para BII, BII para BIII e o somatório dos três períodos.

Medida	Experimento (5.8 / 6.0 / 6.6)	Simulação (5.8 / 6.0 / 6.6)
Transição BI/BII (s)	$4.27 \pm 0.83$ / $4 \pm 0.84$ / $4.76 \pm 0.85$	1.2 / 1.2 / 1.2
Transição BII/BIII (s)	$110.8 \pm 7.14$ / $76.5 \pm 3.8$ / $53.8 \pm 2.09$	44.2 / 24.3 / 17.1
BI+BII+BIII (s)	$256.2 \pm 6.04$ / $193.6 \pm 11.7$ / $113.1 \pm 2$	165.2 / 104.3 / 92.1

**Figura IV.9** – Diagrama esquemático dos resultados experimentais e computacionais para os tempos de transição do período BI para BII, BII para BIII e o somatório dos três períodos. As barras horizontais se relacionam às medidas mostradas na Tabela IV.1. O registro eletrofisiológico imediatamente abaixo a barra horizontal corresponde a uma medida que se aproxima do valor correspondente.

Duração do período B-I em função da  $[K^+]_o$

Para as  $[K^+]_o$  de 6,6 mM , 6,0 mM e 5,8 mM, foram registrados experimentalmente 7, 8 e 8 eventos durante esse período, respectivamente. Como pode ser observado na figura IV.9, não foi possível encontrar diferença estatística significativa na duração desse período para diferentes  $[K^+]_o$ . Os resultados computacionais mostram que, imediatamente após o fim do evento, as curvas do potencial transmembrânico tem uma queda com inclinações próximas (figura IV.11 C), mostrando uma insensibilidade na excitabilidade desse período com a variação da  $[K^+]_o$ . Essa insensibilidade é vista nos potenciais de Nernst dos íons e da bomba de Na/K (figura IV.11 B e C). À medida que o potencial transmembrânico se afasta do fim do evento, percebe-se uma mudança na excursão dependente da  $[K^+]_o$ . De acordo com as simulações computacionais, o período B-III é marcado por uma redução progressiva na inibição provocada pela bomba de Na/K, que pode ser observada pelo aumento do seu potencial reverso (figura IV.8 C).

Duração do período B-II em função da  $[K^+]_o$

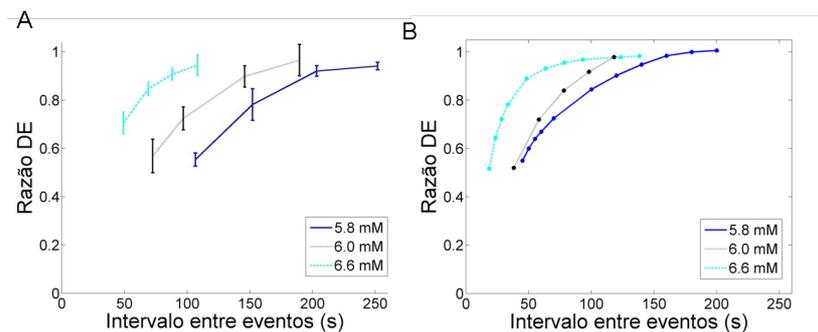
Foram registrados experimentalmente 10 eventos desse tipo quando a  $[K^+]_o$  foi igual a 6,6 mM , 15 eventos com  $[K^+]_o$  à 6,0 mM e 17 eventos com  $[K^+]_o$  à 5,8 mM. A duração desse período tem uma íntima ligação com a  $[K^+]_o$ . Na figura IV.9 mostra-se a relação do período B-II com a  $[K^+]_o$ . É possível observar que com a diminuição na excitabilidade há um aumento na duração desse período. As simulações mostram que o aumento na  $[K^+]_o$  aumenta a excitação provocada pelo íon  $Cl^-$  e diminui a inibição provocada pelo íon  $K^+$  (figura IV.B). Com isso, nos casos em que a  $[K^+]_o$  se encontra elevada, o potencial transmembrânico se encontra mais positivo (figura IV.11 C), facilitando o aparecimento de eventos epileptiformes.

Relação do período B-III em função da  $[K^+]_o$

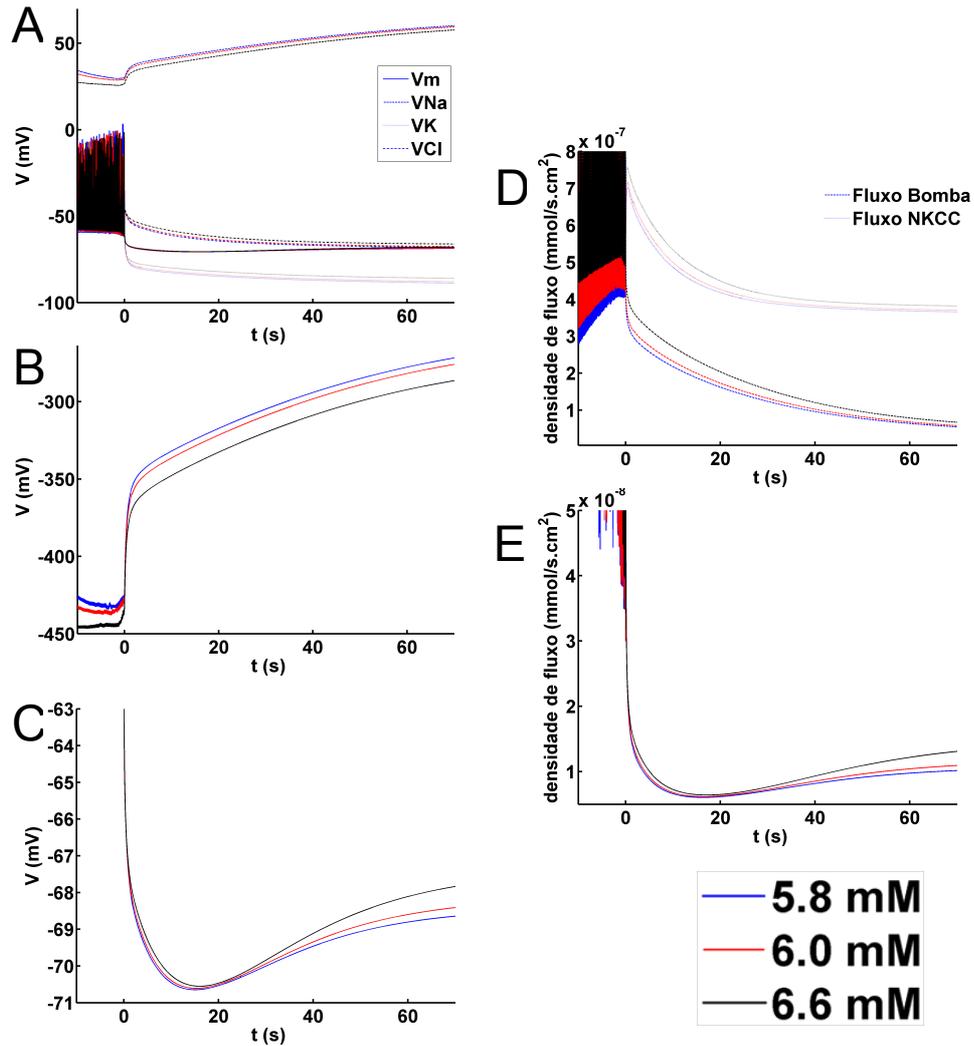
Para as diferentes concentrações de  $K^+$ , 6,6 mM , 6,0 mM e 5,8 mM, foram registrados experimentalmente, respectivamente, 58, 37 e 24 eventos durante esse período.

Como mostrado na figura IV.9, tanto para os resultados experimentais quanto para os computacionais o início do período B-III tem uma forte dependência à  $[K^+]_o$ . Como discutido no item anterior, o início desse período é facilitado pelo aumento nos efeitos excitatórios provocados pelo aumento na  $[K^+]_o$ . O seu fim também é influenciado pela  $[K^+]_o$ , uma vez que seu aumento resulta em um maior influxo de  $Na^+$  pelo cotransportador NKCC e pelos canais (figura IV.11 D e E). Com isso a bomba de Na/K aumenta sua atividade da bomba (figura IV.11 B), antecipando a recuperação dos potenciais de Nernst dos íons (figura IV.11 A).

Outra relação encontrada para esse período foi a de que o aumento no intervalo entre os eventos evocados leva a um aumento na duração do segundo evento (figura IV.10). Essa relação foi encontrada para todas as  $[K^+]_o$ , sendo que para concentrações menores, é necessário um intervalo entre eventos maior para que os dois eventos evocados tenham durações bem próximas. Na figura IV.10 isso é observado por um deslocamento para a direita, à medida que a concentração de  $K^+$  cai.



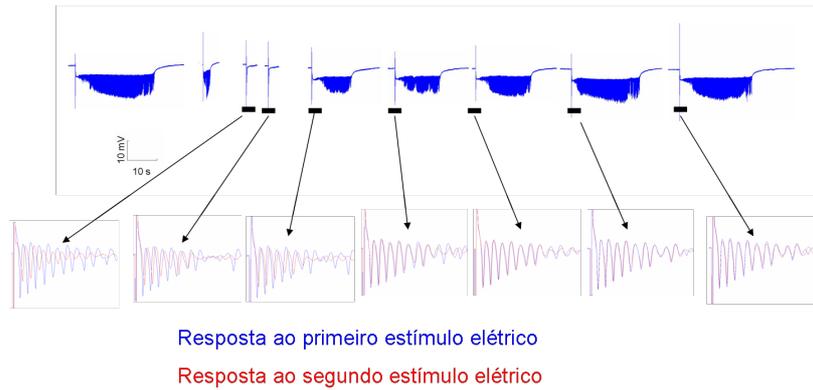
**Figura IV.10** – Relação entre o intervalo entre os bursts evocados pelo pulso pareado e a razão da duração do segundo evento pelo primeiro. (A) Resultados obtidos experimentalmente e em (B) mostra-se os resultados da simulação. Em ambos é possível observar um aumento na duração do segundo evento à medida que o mesmo é evocado para intervalos entre estímulos maiores. Com a variação da  $[K^+]_o$ , observa-se um deslocamento dessas curvas. O intervalo entre eventos onde não há um ponto correspondente retrata o período B-II.



**Figura IV.11** – Dependência de parâmetros que definem a excitabilidade pela  $[K^+]_o$ , em azul, vermelho e preto estão representadas respectivamente as concentrações de 5.8, 6 e 6.6 mM de  $K^+$ . O instante 0 dos gráficos correspondem ao final de cada primeiro evento evocado pelo pulso parado para as diferentes concentrações de  $K^+$ . (A) Potencial transmembrânico e reverso para os íons  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$ . (B) Potencial reverso da bomba de  $Na/K$ . (C) Detalhe da evolução do potencial transmembrânico para as  $[K^+]_o$ . (D) Fluxos de  $Na^+$  pela bomba e pelos cotransportadores NKCC. (E) Fluxo de  $Na^+$  pelos canais iônicos.

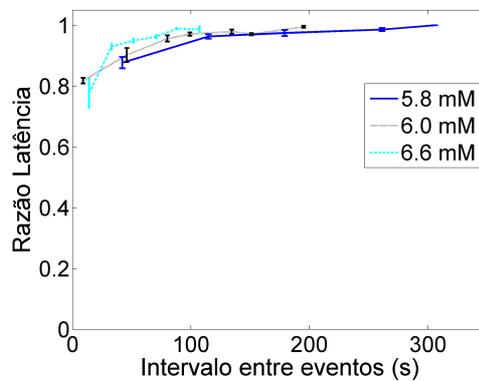
### Population Spikes evocados pelo estímulo

A latência dos spikes evocados pelos primeiro e segundo estímulos foi comparada, isso mostrou que com o aumento do intervalo entre estímulos os spikes evocados tendem a ter uma mesma latência (Figura IV.12).



**Figura IV.12** – Comparação entre os spikes evocados pelos dois estímulos consecutivos em função do intervalos de tempo entre eles. Com o aumento do intervalo inter-estímulos as latências se aproximam. As respostas foram superpostas em função artefato do estímulo. Em azul tem-se a resposta ao primeiro estímulo e em vermelho a resposta ao segundo estímulo.

A diferença da latência (Figura IV.13) para os quintos spikes evocados, normalizada em relação à latência do quinto spike evocado pelo primeiro estímulo demonstra que quanto mais distante os estímulos, mais próximas serão as suas latências. Diminuindo a  $[K^+]_o$  foi possível observar um deslocamento das curvas para a direita.



**Figura IV.13** – Relação da diferença da latência dos spikes evocados pelo intervalo entre os eventos evocados. É possível observar uma aproximação das latências à medida que o estímulo é aplicado a um intervalo de tempo maior. Com a variação da  $[K^+]_o$ , para 5.8, observa-se um deslocamento da curva para a direita.

## CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

O presente estudo, envolvendo manobras experimentais com fatias de hipocampo de rato, demonstra que o intervalo inter-eventos de atividades epileptiformes não-sinápticas é constituído de três períodos, com características distintas de predisposição à sustentação de pós-descargas. Esses períodos foram denominados B-I, B-II e B-III (Figura IV.5). A análise dos resultados experimentais a partir de simulações computacionais permitiu investigar e sugerir mecanismos biofísicos envolvidos em cada um deles.

### Período B-I

Os experimentos mostram que no período B-I, que se dá ao longo da recuperação da linha de base do potencial registrado no espaço extracelular, a resposta a estímulos apresenta características diferentes daquelas do restante do intervalo inter-eventos. Um estímulo, ainda que de intensidade inferior à mínima necessária para deflagração de eventos com o tecido no estado de repouso, tem capacidade de induzir pós-descargas de curta duração (Figura IV.1 A).

Segundo Almeida et al. (2008), o início e o término dos eventos epileptiforme não-sinápticos são caracterizados por pontos críticos: (i) início: o influxo de  $\text{Na}^+$  por canais iônicos supera seu efluxo pela bomba de Na/K; (ii) fim: o efluxo de  $\text{Na}^+$  pela bomba torna-se maior do que o seu influxo por canais iônicos. Para que ocorra o primeiro ponto crítico, o nível de excitabilidade deve ser elevado aproximando o potencial transmembrânico do limiar de disparo de potenciais de ação. De acordo com as simulações de Almeida et al. (2008), esse aumento de excitabilidade ocorre porque o alto nível de  $\text{K}^+$  extracelular reduz o seu potencial de Nernst e acumula  $\text{Cl}^-$  no meio intracelular. Ambas as alterações causam a despolarização de membranas neuronais. No caso do segundo ponto crítico, durante o evento epileptiforme, o acúmulo de  $\text{K}^+$  extracelular e, principalmente, de  $\text{Na}^+$  intracelular ativa a bomba de Na/K progressivamente. O aumento da atividade da bomba de Na/K é acompanhado de um aumento do seu efeito eletrogênico, que consiste de uma carga positiva sendo transportada do sentido intra - extracelular, a cada ciclo de bombeamento de uma unidade de Na/K-ATPase. O efeito eletrogênico força uma redução do potencial

transmembrânico, que, por sua vez, reduz a permeabilidade dos canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem. Em síntese, o efeito eletrogênico atua como uma retroalimentação negativa, a favor da repolarização neuronal. Analisando o período B-I por meio de simulações com o modelo de Almeida et al. (2008), observa-se que a atividade da bomba de Na/K é elevada, apresentando um potencial de equilíbrio muito negativo. Apesar dessa forte inibição e do fato de que as membranas neuronais são progressivamente repolarizadas, durante esse período, o potencial de membrana ainda permanece com valores relativamente próximos do limiar de disparo de potenciais de ação. Isso ocorre porque os gradientes iônicos de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , íons com permeabilidades mais elevadas durante o período inter-eventos, ainda não foram restabelecidos, resultando em potenciais de equilíbrio mais positivos para esses íons (Figura IV.12). Portanto, estimulações menos intensas durante B-I, comparadas com B-II, são capazes de provocar o primeiro ponto crítico, causando a abertura dos canais de  $\text{Na}^+$ , e deflagrar um novo evento epileptiforme.

A duração do período B-I mostra-se insensível às alterações provocadas no nível de  $\text{K}^+$  extracelular, como mostram os resultados experimentais. De acordo com as simulações computacionais, o período B-I termina com a repolarização celular. O restabelecimento do potencial de Nernst de  $\text{K}^+$  para valores mais negativos contribui para essa repolarização. Durante B-I, após o término do evento, o potencial de Nernst do  $\text{K}^+$  é restabelecido pelo aumento da  $[\text{K}^+]_i$  e, principalmente, pela redução da  $[\text{K}^+]_o$ , as quais foram alteradas durante o evento. Segundo as simulações, a duração do período B-I depende do nível de alteração dos gradientes de concentração de  $\text{K}^+$  durante o evento, e não da  $[\text{K}^+]_o$  da solução de perfusão extracelular.

## Período B-II

A principal característica desse período é a refratariedade absoluta à deflagração de pós-descargas típicas de um evento epileptiforme, mediante a estimulação antidrômica. Embora as respostas possam ser ainda consideradas pós-descargas, sendo que PS's ocorrem para além da duração do estímulo, as pós-descargas não tipificam um evento epileptiforme não-sináptico, com DC e a superposição de PS's. A identificação de B-II concorda com os achados de Xiong et al. (2000), que, embora não tenham alertado para as características que distinguem B-I de B-II, descreveram um período, ao longo de

cerca de 20 s após um evento espontâneo, onde os eventos evocados foram descritos apenas como bursts curtos.

As simulações computacionais sugerem que o restabelecimento progressivo dos gradientes de concentração de  $K^+$  e  $Cl^-$  faz com que o potencial transmembrânico, para cada unidade funcional, fique cada vez mais negativo, resultando numa redução da excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, no início do período B-II. Durante esse período, o potencial transmembrânico atinge valores mais negativos, resultando na necessidade de estimulações mais intensas para deflagração de eventos epileptiformes. Como a intensidade da estimulação não pode ser aumentada intensamente para as manobras experimentais (pois, causaria lesões no tecido), esse é um período refratário a eventos epileptiformes. Konnerth et al. (1986) e Jensen e Yaari (1997) atribuem à bomba de Na/K a responsabilidade pela refratariedade. Reforçando essa hipótese, nas simulações, durante o período B-II, a bomba é o principal mecanismo que controla o nível de excitabilidade neuronal. Pois, apesar do fato de que os potenciais de Nernst de  $K^+$  e  $Cl^-$  ficam mais negativos continuamente, a excitabilidade neuronal começa a aumentar novamente, como sugere o aumento do potencial transmembrânico. Portanto, esse aumento de excitabilidade é devido à redução da inibição provocada pela bomba de Na/K, cujo potencial de equilíbrio fica mais positivo progressivamente (Figura IV.13). O término do período B-II (transição B-II/B-III) ocorre quando a excitabilidade, elevada pela redução da atividade da bomba, é suficiente para que estimulações deflagrem eventos epileptiformes.

Alterações na concentração extracelular de  $K^+$  mostram ter um efeito significativo sobre a ocorrência da transição B-II/B-III. Para as três concentrações estudadas, embora envolvendo uma pequena alteração, indo de 6.6 mM a 5.8mM, o ponto de ocorrência de B-II/B-III se deslocou em mais de 60%. Diferentemente a duração de B-I/B-II, a ocorrência de B-II/B-III é delimitada pela ocorrência do primeiro ponto crítico das respostas a estímulos. As simulações apresentadas, bem como a literatura (KONNERTH *et. al.*, 1986), mostram que o nível de potássio extracelular tem grande influência sobre a excitabilidade neuronal. De acordo com as simulações, se o  $K^+$  extracelular é reduzido, as correntes inibitórias têm efeito mais proeminente, dificultando a ocorrência do primeiro ponto crítico, que caracteriza a deflagração do evento epileptiforme não-sináptico.

### Período B-III

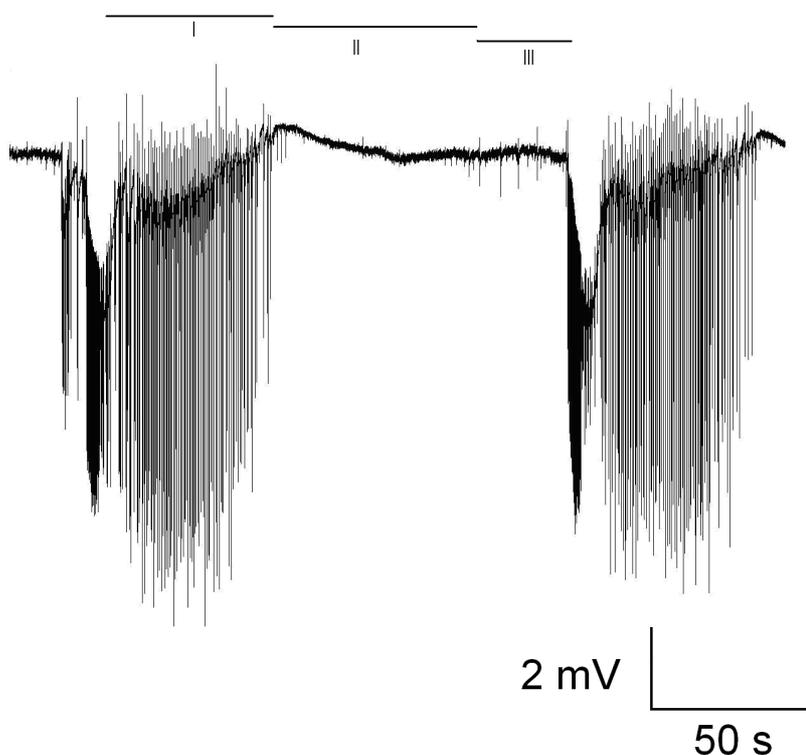
Ao longo de B-III, para maiores intervalos inter-estímulos, observa-se uma tendência a pós-descargas que reproduzem a resposta ao primeiro evento, sendo preservadas as amplitudes dos PS's e da componente DC. Na medida em que o intervalo inter-estímulos aumenta, aumenta a duração do evento, tendendo à duração do primeiro evento. Essas observações estão de acordo com os resultados de Xiong et al. (2000). Esses autores descreveram que quando o estímulo é aplicado no meio do intervalo inter-eventos, o evento deflagrado tem duração mais curta que os eventos espontâneos. Já eventos deflagrados imediatamente antes de eventos espontâneos apresentam longa duração, semelhantemente aos espontâneos. O estudo realizado por Xiong et al. (2000) associa medidas do pH intracelular. Os registros mostram que somente quando o pH intracelular atinge os níveis de repouso, mais altos, os eventos passam a ter duração típica de um evento espontâneo. Por outro lado, sem descrever alterações de pH, as simulações indicam que é possível explicar as alterações da duração dos eventos baseando somente em alterações dos gradientes iônicos (portanto, dos potenciais de Nernst) e da atividade da bomba de Na/K. Segundo as simulações, quanto mais próximo de um evento espontâneo, mais próximos dos valores de repouso estarão os potenciais de Nernst dos íons e menor a atividade da bomba. Portanto, quanto mais próximo de um evento espontâneo for induzido um outro evento, por estimulação, maiores serão os acúmulos de  $K^+$  extracelular e  $Cl^-$  intracelular e o influxo de  $Na^+$  por canais dependentes de voltagem, ambos intensificando a despolarização celular. Nesse caso, a bomba de Na/K gasta mais tempo para repolarizar a membrana celular e superar o influxo de  $Na^+$  por canais. Portanto, o segundo ponto crítico (fim do evento) leva mais tempo para ocorrer e a duração do evento é maior, quando a estimulação é feita mais perto (antes) do evento espontâneo.

Nos experimentos, o aumento da concentração de  $K^+$  na solução de perfusão causou a redução da duração do período B-III. Explicando esse comportamento por meio das simulações, o aumento da  $[K^+]_o$  extracelular resulta num maior influxo de  $Na^+$ , por canais iônicos (devido à despolarização celular) e por meio do NKCC, acumulando mais esse íon no meio intracelular. Consequentemente, há uma ativação maior da bomba de Na/K durante o intervalo inter-eventos, resultando numa recuperação mais rápida dos gradientes iônicos.

## CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo fornecem evidências de que os mecanismos não-sinápticos devem atuar de forma modulatória sobre a excitabilidade neuronal, atuando como gênese dos três períodos, BI, BII e BIII, observados.

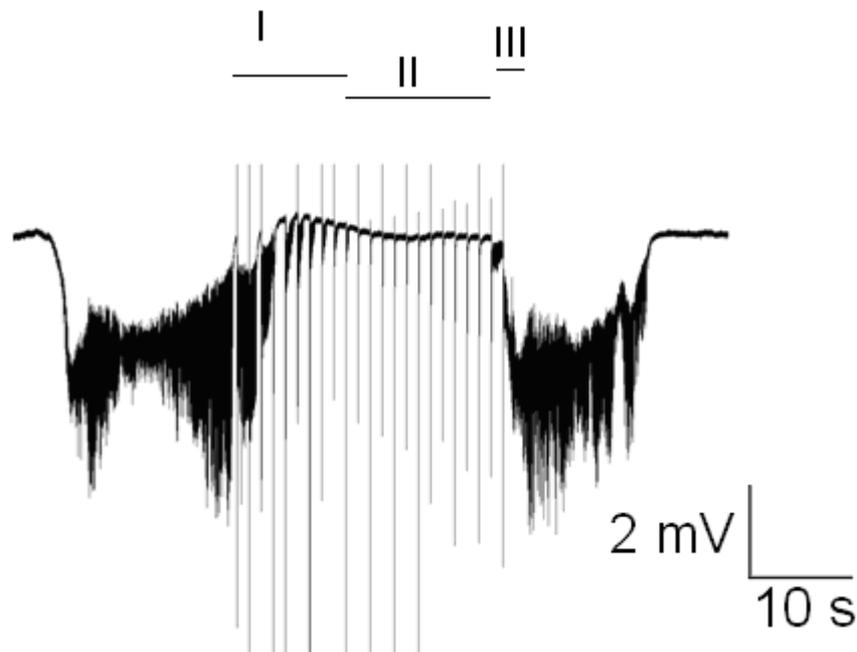
Cada um desses períodos deve modular as atividades epileptiformes observadas, quando de suas induções na presença das conexões sinápticas. Estudos preliminares foram desenvolvidos, em função dos resultados obtidos na presente dissertação, e permitiram identificar que, no caso de AE induzidas em CA1 (figura VI.1), em que PEPS, advindos de CA3, estimulam essa região, pode-se perceber a existência de três respostas distintas, que podem ser identificadas com os diferentes estados de estimulação, identificados como BI, BII e BIII. No caso de BI, a excitabilidade favorece a susceptibilidade à ocorrência de eventos, sendo responsável pela sustentação de eventos pós-ictais (figura VI.1 I). Para BII, caracterizado por uma redução da excitabilidade, os eventos espontâneos são suprimidos, caracterizando a depressão interictal (figura VI.1 II). E, finalmente, para BIII, quando a excitabilidade é recuperada, e surgem os eventos pré-ictais (figura VI.1 III).



**Figura VI.1** – Potencial elétrico extracelular experimental de uma AE induzida na região CA1. É possível observar atividades pós-ictais (I), seguidas por uma depressão interictal (II) e logo após atividades pré-ictais (III).

Quando estímulo antidrômicos, aplicados numa frequência de 2 Hz, durante indução de AENS em CA1 (figura VI.2), as respostas ao estímulo seguem comportamento semelhante aos observados na figura VI.1. Próximo ao final do evento, as respostas se assemelham a eventos pós-ictais, que são seguidas por uma depressão nas respostas ao estímulo, e bem próximo a um evento ictal, o resultado dos estímulos são respostas pré-ictais. Os resultados sugerem a seguinte associação:

BI ↔ atividades pós-ictais; BII ↔ depressão interictal e BIII ↔ atividades pré-ictais.



**Figura VI.2** – Potencial elétrico extracelular uma AENS induzida na região CA1. No período interictal são aplicados estímulos antidrômicos. É possível observar que as respostas aos estímulos variam ao longo do período interictal. Em (I) as respostas são semelhantes à atividades pós-ictais, em (II) essas respostas se assemelham a depressão interictal e em (III) observa-se respostas tipo atividades pré-ictais .

## CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, J. N., 2002, “Recent advances in epileptogenesis”, *Current Science*, v. 82, p. 679-688.
- ALMEIDA, A.C., RODRIGUES, A.M., SCORZA, F.A., CAVALHEIRO, E.A., TEIXEIRA, H.Z., DUARTE, M.A., SILVEIRA, G.A., ARRUDA, E.Z., 2008, “Mechanistic hypotheses for nonsynaptic epileptiform activity induction and its transition from the interictal to ictal state-Computational simulation”, *Epilepsia*, v. 49, n. 7, p. 1-17.
- AMARAL, D. G., WITTER, M. P., 1989, “The Three-Dimensional Organization of the Hippocampal Formation: A Review of Anatomical Data”, *Neuroscience*, v. 31, pp. 571-591.
- BENNETT, M. V. L., 1996, “Gap-junctions as Electrical Synapses”. In: SPRAY, D. C., DERMIETZEL, R. (eds), *Gap Junctions in the Nervous System*, pp. 61–77, R. G. Landes Company, Austin.
- BENNETT, M. V. L., SPRAY, D. C., 1985, *Gap Junctions*, Cold Spring Harbor.
- BINDMAN, L. J., LIPPOLD, O. C. J., REDFEARN, J. W. T., 1964, “Relations between the Size and Form of Potentials Evoked by Sensory Stimulation and the Background Electrical Activity in the Cerebral Cortex of the Rat”, *J. Physiol. Lond.*, v. 171, pp. 1-25.
- CARLEN, P. L., SKINNER, F., ZHANG, L., NAUS, C., *et al.*, 2000, “The Role of Gap Junctions in Seizures”, *Brain Res. Rev.*, v. 32, pp. 235-241.
- CARVALHO, R. S., 2003, “*Transições Espontâneas de Burstings Epileptiformes para Depressão Alastrante*”. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del-Rei, MG, Brasil.

- DE LA PRIDA, M.L., HUBERFELD, G., COHEN, I., MILLES, R., (1998) "Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts", *Neuron*, v. 49, p. 1-12.
- D'AMBROSIO, R., GORDON, D.S., WINN, R.H., (2002) "Differential Role of KIR Channel and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pump in the Regulation of Extracellular K<sup>+</sup> in Rat Hippocampus", *Journal of Neurophysiology*, v. 87, n. 1, p. 87-102.
- DICHTER, M.A., AYALA, G. F., 1987, "Cellular mechanisms of epilepsy: a status report", *Science*, v. 237, p. 157-164.
- DIETZEL, I., HEINEMANN, U., HOFMEIER, G., *et al.*, 1982, "Stimulus-Induced Changes in Extracellular Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> Concentration in Relation to Changes in the Size of the Extracellular Space", *Exp. Brain Res.*, v. 46, pp. 73-84.
- DINGLEDINE, R., DODD, J., KELLY, J. S., 1980, "The in Vitro Brain Slice as a Useful Neurophysiological Preparation for Intracellular Recording", *J. Neurosci. Methods.*, v. 2, pp. 323-62.
- DUDEK, F. E., YASUMUURA, T., RASH, J. E., 1998 "Non-Synaptic Mechanisms in Seizures and Epileptogenesis", *Cell Biology International*, v. 22, pp. 793-805.
- ENGEL, J., 1989, *Seizures and Epilepsy*, 1<sup>a</sup> ed., Philadelphia, USA, F. A. Davis Company.
- ENGEL J, J., 1995, "Introduction to temporal lobe epilepsy", *Epilepsy Research*, v. 26, p. 141-150.
- FISHER, R. S., SCHACHTER, S. C., 2000, "The Postictal State: A Neglected Entity in the Management of Epilepsy", *Epilepsy Behav.*, v. 1, p. 52-59.
- FISHER, R.S., VAN EMDE, B.W., BLUME.W., *et al.*, 2005, "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the ILAE and the International Bureau for Epilepsy (IBE)", *Epilepsia*, v.46, pp.470-472.
- HATTON, G. I., DORAN A. D., SALM, A. K., *et al.*, 1980, "Brain Slice Preparation: Hypothalamus", *Brain Res. Bull.*, v. 5, pp. 405-414.

- HEINEMANN, U., 1987, "Basic Mechanism of the Epilepsies", *A Textbook of Clinical Neurophysiology*, pp. 497-525.
- HEINEMANN, U., KANN, O., SCHUCHMANN, S., 2006, "An Overview of In Vitro Seizure Models in Acute and Organotypic Slices", In: *Models of seizures and epilepsy*, Ed: Academic Press. p. 35-44.
- HEINEMANN, U., KONNERTH, A., PUMAIN, R., *et al.*, 1986, "Extracellular Calcium and Potassium Concentration Changes in Chronic Epileptic Brain Tissue", *Adv. Neurol.*, v. 44, pp. 641-661.
- HILLE, B., 1992, "Elementary Properties of Ions Solution". In: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2<sup>nd</sup> ed., chapter 10, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F., 1952, "A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction in Nerve", *J. Physiology*, v. 117, pp. 500-544.
- HSU, D., 2007, "The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead", *Prog Brain Res*, v. 163, p. 601-613.
- 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.
- JEFFREY, S. S., P. R., PATRYLO, DUDEK, F. E., 1992, "Prolonged Field Bursts in the Dentate Gyrus: Dependence on Low Calcium, High Potassium, and Nonsynaptic Mechanisms.", *J. Neurophysiol.*, v. 68, pp. 2016-2025.
- JENSEN, M. S., YAARI, Y., 1997, "Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy" *Journal Neurophysiology*, v. 77, p. 1124-1133.

- JONES, R. S., LAMBERT, J. D., 1990, "Synchronous Discharges in the Rat Entorhinal Cortex in Vitro: Site of Initiation and the Role of Excitatory Amino Acid Receptors", *Neuroscience*, v. 34, pp. 657-670.
- KIM, U., MCCORMICK, A., 1998, "Functional and Ionic Properties of a Slow Afterhyperpolarization in Ferret Perigeniculate Neurons In Vitro", *Journal of Neurophysiology*, v. 80, n. 3, p. 1222-1235.
- KONNERTH, A., HEINEMANN, U. YAARI, Y., 1984, "Slow Transmission of Neural Activity in Hippocampal Area CA1 in Absence of Active Chemical Synapses", *Nature*, v. 307, pp. 69-71.
- KONNERTH, A., HEINEMANN, U. YAARI, Y., 1986, "Nonsynaptic Epileptogenesis in the Mammalian Hippocampus in Vitro. I. Development of seizurelike activity in low extracellular calcium", *J. Neurophysiol.*, v. 56, pp. 409-423.
- LEÃO, A. A. P., 1944, "Spreading Depression of Activity in Cerebral Cortex", *J. Neurophysiol.*, v. 7, pp. 359-390.
- LEE, K. S., SCHUBERT, P., HEINEMANN, U., 1984, "The Convulsant Actions of Adenosine: A Postsynaptic, Dendritic Action by Possible Endogenous Anticonvulsant", *Brain Res.*, v. 321:160-164.
- LIPTON, P., WHITTINGHAM, T. S., 1979, "The Effect of Hypoxia on Evoked Potentials in the in Vitro Hippocampus", *J. Physiol.*, v. 287, pp. 427-438.
- LOPES DA SILVA, F. H., 1990, "Anatomic Organization and Physiology of the Limbic Cortex", *Physiological Reviews*, v. 70, pp. 453-511.
- LOTHMAN, E. W., STRINGER, J. L., BERTRAM, E. H., 1992, "The Dentate Gyrus as a Control Point for Seizures in the Hippocampus and Beyond", *Epilepsy Res. Suppl.*, v. 7, pp. 301-313.
- LUX, H. D., HEINEMANN, U., DIETZEL, I., 1986, "Ionic Changes and Alterations in the Size of the Extracellular Space during Epileptic Activity", in *Basic Mechanism of Epilepsies: cellular and molecular aspects*, Advances in Neurology, v. 44, Raven Press, New York.

- MACNAMARA, J. O., 1994, "Cellular and Molecular Basis of Epilepsy", *The Journal of Neuroscience*, v. 14, pp. 3413-3425.
- MACVICAR, B. A., DUDEK, F. E., 1982, "Electrotonic Coupling between Granule Cells of Rat Dentate Gyrus: Physiological and Anatomical Evidence", *J. Neurophysiol.*, v. 47, pp. 579-592.
- MCCORMICK, D., CONTRERAS D., 2001, "On The Cellular and Network Bases of Epileptic Seizures", *Rev. Physiol.* v.46, pp. 815-847
- MCGARAUGHTY, S., COWART, M. JARVIS, M. F., BERMAN, R. F., 2005, "Anticonvulsant and Antinociceptive Actions of Novel Adenosine Kinase Inhibitors", *Curr Top Med Chem*, v. 5, p. 43-58.
- MERRILL, D. R., BIKSON, M., JEFFERYSC, J. G., 2005, "Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols", [\*J Neurosci Methods\*](#), v. 141, p. 171-198.
- 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.
- PAN, E., STRINGER, J. L., 1997, "Role of potassium and calcium in the generation of cellular bursts in the dentate gyrus.", *J. Neurophysiol.*, v. 77, pp 2293-2299.
- PATRYLO, P. R., SCHWEITZER, J. S., DUDEK, F. E., 1994, "Potassium-Dependent Prolonged Field *Bursts* in the Dentate Gyrus: Effects of Extracellular Calcium and Amino Acid Receptor Antagonists", *Neuroscience*, v. 61, pp. 13-19.
- SARKISIAN, M.R.,2001, "Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders", *Epilepsy & Behavior*, v. 2, pp. 201-216.
- SCHARFMAN, H. E., SOLLAS, A. L., SMITH, K., JACKSON, M. B., GOODMAN J., 2002, "Structural and Functional Asymmetry in the Normal and Epileptic Rat Dentate Gyrus", *The Journal of Comparative Neurology*, v. 454, pp. 424-439.
- SCHWEITZER, J. S., PATRYLO, P.R., DUDEK, F.E., 1992, "Prolonged Field Bursts in the Dentate Gyrus: Dependence on Low Calcium, High Potassium, and

- Nonsynaptic Mechanisms”, *Journal of Neurophysiology*, v. 68, n. 6, p. 2016-2025.
- 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”,
- SOMJEN, G. G., 1979, “Extracellular Potassium in the Mammalian Central Nervous System”, *Annual Review of Physiology*, v. 41, p. 159-177
- SOMJEN, G. G., GIACCHINO, J. L., 1985, “Potassium and Calcium Concentrations in Interstitial Fluid of Hippocampal Formation during Paroxysmal Responses”, *J. Neurophysiol.*, v. 53, pp. 1098-1108.
- SRIDHARAN, R., 2002, “Epidemiology of epilepsy”, *Current Science*, v. 82, p. 664-670.
- STERIADE, M., TIMOFEEV, I., 2004. “Neocortical seizures: initiation, development and cessation”, *Neuroscience*, v. 123, p. 299-336.
- STRINGER, J. L., LOTHMAN, E. W., 1992, “Bilateral Maximal Dentate Activation Is Critical for the Appearance of an Afterdischarge in the Dentate Gyrus”, *Neuroscience*, v. 46, pp. 309-314.
- STRINGER, J. L., WILLIAMSON, J. M., LOTHMAN, E. W., 1989, “Induction of Paroxysmal Discharges in the Dentate Gyrus: Frequency Dependence and Relationship to Afterdischarges Production”, *J. Neurophysiol.*, v. 62, pp. 126-135.
- STRINGER, J. L., WILLIAMSON, J. M., LOTHMAN, E. W., 1991, “Maximal Dentate Activation Is Produced by Amygdala Stimulation in Unanesthetized Rats”, *Brain Res.*, v. 542, pp. 336-342.
- TAYLOR, C. P., DUDEK, F. E., 1982 “Synchronous Neural Afterdischarges in Rat Hippocampal Slices without Active Chemical Synapses”, *Science*, v. 218, pp. 810-812.

- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., RODRIGUES, A.M., COSTAS,N.L., DUARTE, M.A., 2008, “Identifying essential conditions for refractoriness of Leão’s spreading depression – Computational modeling”, *Computational Biology and Chemistry*, v. 32, n. 4, pp. 273-281.
- TEIXEIRA, H. Z., ALMEIDA, A. C. G., INFANTOSI, A. F. C., et al., 2001, “Descrição Matemática da Dinâmica Iônica em Tecidos Neurais”, *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 7, n. 2, pp. 85-96.
- TIMOFEEV, I., STERIADE, M., 2004, “Commentary neocortical seizures: initiation, development and cessation”, *Neuroscience*, v. 123, p. 299-336.
- VAILLEND, C., MASON, S.E., CUTTLE, M F., ALGER, B. E., 2002, “Mechanisms of Neuronal Hyperexcitability Caused by Partial Inhibition of Na-K-ATPases in the Rat CA1 Hippocampal Region”, *J. Neurophysiol.*, v. 88, p. 2963-2978.
- VELAZQUEZ,J.L.P., CARLEN,P.L., 2000, “Gap junctions, synchrony and seizures”, *Trends Neuroscience*, v. 23, p. 68-74.
- WALLACE, R. H., WANG, D. W., SINGH, R., SCHEFFER, I. E., GEORGE A. L. Jr, PHILLIPS, H. A., 1998, “Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>- channel beta1 subunit gene SCN1B, *Nat Genet*, v. 19, p. 366-370.
- WALTER, H., LAMBERT, J. D. C., JONES, R. S. G., et al, 1986, “Epileptiform Activity in Combined Slices of the Hippocampus Subiculum and Entorhinal Cortex during Perfusion with Low Magnesium Medium”, *Neuroscience Letters*, v. 69, pp. 156-161.
- WALZ, W., 2000, “Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium”, *Neurochem Int.*, v. 36, p. 291-300.
- XIONG, Z., SAGGAU, P., STRINGER, J.L., (2000), “Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity” *Journal of Neuroscience*, v.20, n. 4, p. 1290-1296.

- 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.
- XIONG, Z., STRINGER, J. L., 2001, "Prolonged Bursts Occur in Normal Calcium in hippocampal Slices After Raising Excitability and Blocking Synaptic Transmission", *J. Neurophysiol.*, v. 86, p. 2625-2628.
- YAARI, Y., KONNERTH, A., HEINEMANN, U., 1986, "Nonsynaptic Epileptogenesis in the Mammalian Hippocampus in Vitro. II. Role of Extracellular Potassium", *J. Neurophysiol.*, v. 56, pp. 424-438.
- ZIEMANN, A. E., SCHNIZLER, M. K., ALBERT, G. W., SEVERSON, M. A., HOWARD, M. A., WELSH, M. J., WEEMIE, J. A., 2008, "Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a", *Nat Neurosci.*, v. 11. p. 816-822.

# 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](#)