# Aquisição Simultânea de Eletroencefalografia e Ressonância Magnética funcional em Epileptologia

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, ICB – UFMG como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Michael John Brammer Co-orientadores: Prof. Marco Aurélio Romano-Silva Prof. Steven Charles Rees Williams

## **Belo Horizonte**

Minas Gerais – Brasil 2004

## Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

#### APOIO FINANCEIRO

Bolsa de Doutorado Sanduiche concedida pelo CAPES

N.Ref: CE 0009/2002

Processo: BEX1066/02-1

Toda a parte experimental dessa tese foi Financiada por

Fundos departamentais do Institute of Psychiatry – King's College London

#### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes, por ter acreditado em mim. Por ter conspirado para que o sonho de um doutorado em neuroimagem no exterior se tornasse possível. Pelas palavras de apoio durante os momentos difíceis e de crítica nos momentos em que me desviei do caminho. Por ser, antes de mais nada, um grande amigo...

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano-Silva, por ter tornado possível a minha ida para o Institute of Psychiatry de Londres. Pela paciência durante os quase dois anos de trabalho no exterior, que em muitas ocasiões esbarrou em sérias dificuldades.

Ao Prof. Dr. Michael John Brammer, por ter me aceito como orientado e por ter me introduzido ao mundo da Ressonância Magnética Funcional. Meus mais sinceros agradecimentos por ter permitido que meu sonho se tornasse realidade.

Ao Prof. Dr. Steven C.R. Williams. Meus mais sinceros agradecimentos por todo o suporte financeiro e científico. Por ter aberto todas as portas do Neuroimaging Research Group para um completo desconhecido. Por ter acreditado no potencial de meu trabalho. Por ter, finalmente, me proporcionado um *insight* sobre os bastidores de um centro de pesquisa de referência em Neuroimagem e de como se fazer pesquisa de ponta nessa área.

iii

Ao Dr. Mike Modo, *me mate*, por sua grande amizade e companheirismo. Por ter me mostrado o lado bom de Londres. Por ter me feito apreciar a boa e velha cerveja quente Inglesa. Por ter sido um aliado científico e um cúmplice filosófico sobre temas corriqueiros da vida no velho continente...

Ao Dr. Nick Jones, por ter me ensinado as bases práticas dos experimentos de Ressonância Magnética Funcional em animais e por ter me guiado pelo labirinto dos processos de análise de imagens.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Massensini. Por ter me ensinado o caminho das pedras da vida de um brasileiro em Londres. Por toda a força e apoio tanto nos assuntos de trabalho quando no lado pessoal. Valeu Fubá...

Finalmente, mas não menos importante, ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Gomez. Por ter me recebido tão bem no programa de pós-graduação em Neurofarmacologia Bioquímica e Molecular. Por toda a disponibilidade e ajuda para resolver os problemas que enfrentei durante minha estadia em Londres. Meu muito obrigado!!! À minha Família, Mãe, Pai e Cláudia, por toda a paciência que tiveram com um filho e irmão ausente. Por todo o apóio, principalmente nos momentos em que fraquejei. Pelos conselhos e pelo conforto de um colo quando precisei (mesmo que só pela internet/telefone). Todo o meu amor...

> Especialmente à minha esposa Ludmila, pela coragem de se aventurar em um mundo completamente novo. Por ter largado tudo e embarcado na maior aventura de nossas vidas. Por todo o amor, carinho, compreensão, cumplicidade, apóio, companheirismo, enfim, por ser tudo em minha vida ...

> > v

"A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvar diante da divindade." *Voltaire* 

"Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistas do que parecia impossível." *Charles Chaplin* 

"Os cães ladram, logo, a caravana passa..." Miguel de Cervantes

"Se Sonhar um pouco é perigoso, a solução não é sonhar menos - é sonhar mais" Marcel Proust

"A imaginação é mais importante que o conhecimento." Albert Einstein

"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las." Aristóteles

"Uma longa viagem começa com um único passo." Lao-Tsé

"Duas coisas indicam fraqueza - calar-se quando é preciso falar, e falar quando é preciso calar-se." *Provérbio Persa* 

"Nenhuma figura é tão fascinante quanto o falso entendido. É o cara que não sabe nada de nada mas sabe o jargão. " *Luis Fernando Veríssimo* 

RESUMO	1
ABSTRACT	2
<u>1 – INTRODUÇÃO</u>	3
1.1) EPILEPSIAS	4
<b>1.1.1)</b> HISTÓRICO	4
1.1.2) CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO	7
A) CONCEITO D) CLASSIEICAÇÃO	/
B) CLASSIFICAÇÃO 1 1 3) ETIOLOCIA EPIDEMIOLOCIA E PROCNÓSTICO	0 11
A) ETIOLOGIA	11
B) EPIDEMIOLOGIA	12
C) PROGNÓSTICO	13
1.2) FISIOPATOLOGIA DAS EPILEPSIAS	14
A)ANORMALIDADES DO SISTEMA INIBITÓRIO GABAÉRGICO	16
B) ANORMALIDADES DOS SISTEMAS EXCITATÓRIOS	18
C) ANORMALIDADES DOS CANAIS IÔNICOS CELULARES	19
1.3) MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIA	21
1.4) EEG	25
1.5) RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL	31
1.5.1) HISTÓRICO	31
1.5.2) PRINCÍPIOS FÍSICOS DE RM	35
1.5.3) CONTRASTE BOLD	39
1.5.4) ANALISE DE IMAGENS DE RMF 1.5.5) DMD E EDU EDGLAG	41
1.5.5) KIVIF E EPILEPSIAS	44
<u>1.6) EEG E RMF</u>	47
1.7) CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES	55
1.8) CONSIDERAÇÕES ÉTICAS SOBRE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	57
2 – OBJETIVOS	59

<u>3 – GRUPOS EXPERIMENTAIS</u>	60
3.1) AQUISIÇÃO SIMULTÂNEA DE EEG E RMF	60
3.1.1) Considerações Preliminares	60
3.1.2) MATERIAIS E MÉTODOS	61
A) ELETRODOS	61
B) PRÉ-AMPLIFICADORES	63
C) FIBRA OPTICA	66
D) CONDICIONADOR DE SINAIS	69 70
E) CONVERSOR ANALOGICO DIGITAL E) MÉTODO DE SUBTRAÇÃO DE ARTEGATOS EL ÉTRICOS DO EEC	70
7) METODO DE SUBTRAÇÃO DE ARTEFATOS ELETRICOS DO EEO 3 1 3) DESULTADOS	71
A) ANÁLISE DOS FEEITOS DO SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE FEG NA QUALIDADE DAS IMAGENS DI	
ri / rivielse bos el el los bosistemix de rigolsição de eleo tar gonelonde das imageno d	73
B) Análise dos Efeitos da Aquisição de Imagens de RMf na qualidade do EEG	79
3.1.4) DISCUSSÃO	87
3.2) CARACTERIZAÇÃO ELETROENCEFALOGRÁFICA DO MODELO ANIMAL DE	<u>c</u>
EPILEPSIA POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PICROTOXINA	<u>90</u>
3 2 1) CONSIDED & CÕES PDELIMINADES	00
3.2.1) CONSIDERAÇÕES I RELIVIIVARES 3.2.2) METODOLOGIA	90
A) GRUPOS EXPERIMENTAIS	91
B) SISTEMA DE REGISTRO DE EEG SUPERFICIAL	91
C) PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	92
3.2.3) RESULTADOS	93
3.2.4) DISCUSSÃO	98
3.3) AVALIAÇÃO POR EEG E RMF SIMULTÂNEOS DO MODELO ANIMAL DE	
EPILEPSIA POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PICROTOXINA	101
3.3.1) Considerações Preliminares	101
3.3.2) METODOLOGIA	102
A) GRUPOS EXPERIMENTAIS	102
B) SISTEMA DE REGISTRO DE EEG SUPERFICIAL	103
C) PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	103
D) PROTOCOLO DE AQUISIÇÃO DE IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL (RMF)	105
E) ANÁLISE DAS IMAGENS DE RMF	108
3.3.3) RESULTADOS	110
A) ANALISE DO EEG OBTIDO DURANTE AQUISIÇÃO DE IMAGENS D) ANÁLISE DE MACENS DE <b>DM</b> E	110
D) ANALISE DE IMAGENS DE KIVIF 3 3 4) DISCUSSÃO	110 110
<i>5.3.7) D</i> 100055AU	110
3.4) AVALIAÇÃO POR EEG PROFUNDO DO MODELO ANIMAL DE EPILEPSIA PO	R

## INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PICROTOXINA

<ul> <li>3.4.1) Considerações Preliminares</li> <li>3.4.2) Metodologia</li> <li>A) Grupos Experimentais</li> <li>B) Sistema de Registro de EEG Profundo</li> <li>C) Procedimentos Experimentais</li> <li>D) Determinação da localização de eletrodos profundos por RM</li> <li>3.4.3) Resultados</li> <li>3.4.4) Discussão</li> </ul>	<ul> <li>126</li> <li>126</li> <li>127</li> <li>128</li> <li>129</li> <li>130</li> <li>137</li> </ul>
3.5) AVALIAÇÃO POR EEG E RMF SIMULTÂNEOS DO MODELO ANIMAL DE	
EPILEPSIA POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA	140
<ul> <li>3.5.1) Considerações Preliminares</li> <li>3.5.2) Metodologia</li> <li>A) Grupos Experimentais</li> <li>B) Sistema de Registro de EEG Superficial</li> <li>C) Procedimentos Experimentais</li> <li>D) Análise de imagens de RMF</li> <li>3.5.3) Resultados</li> <li>3.5.4) Discussão</li> </ul>	<ul> <li>140</li> <li>140</li> <li>141</li> <li>142</li> <li>143</li> <li>143</li> <li>147</li> </ul>
3.6) ANALISE COMPARATIVA DOS MAPAS PARAMETRICOS DOS MODELOS DE PICROTOXINA E PILOCARPINA	150
3.6.1) CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES 3.6.2) METODOLOGIA 3.6.3) RESULTADOS 3.6.4) DISCUSSÃO	150 150 151 156
4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	160
5 – CONCLUSÕES	<u>163</u>
INDICE DAS FIGURAS	<u>165</u>
BIBLIOGRAFIA	175

#### Resumo

As epilepsias são patologias que acometem em torno de 1% da população mundial, pondendo ser consideradas uma das doenças mais importantes do Sistema Nervoso Central, resultando em morbidade significativa. Tratamentos medicamentosos são efetivos em até 70% dos casos, mas nenhum tipo de cura, ou intervenção capaz de interromper a progressão da doença existe na atualidade. Dessa forma, o estudo dos mecanismos epileptogênicos e a busca pela cura das epilepsias, constituem-se em importantes objetivos para a neurologia moderna. O estudo das epilepsias depende da utilização de modelos animais e de ferramentas capazes de avaliar os vários aspectos de sua fisiopatologia (p.e. imuno-histoquímica, eletrofisiologia, microdiálise e neuroimagem). Estudos através de registros de eletroencefalografia (EEG) têm contribuído imensamente no entendimento da dinâmica dos processos epileptogênicos. No entanto, a despeito de sua grande resolução temporal (da ordem de milessegundos), essa técnica carece de resolução espacial adequada. Por outro lado, técnicas de neuroimagem tem sido desenvolvidas com capacidade de avaliar o funcionamento cerebral com resolução espacial da ordem de frações de milímetros, mas com resolução temporal apenas da ordem de segundos. O objetivo dessa tese de doutorado foi desenvolver técnica de aquisição simultânea de EEG e RMf em animais, predominantemente para o estudo das epilepsias. Desenvolvemos técnica de aquisição simultânea de Eletroencefalografia (EEG) e Ressonância Magnética Funcional (RMf) baseada na utilização de amplificadores e filtros posicionados o mais próximo possível dos animais, de forma a minimizarmos os efeitos do aparelho de RMf sobre os registros de EEG; transmissão de dados via fibra óptica possibilitou eliminar artefatos de RF nas imagens de RM. Algorítmo de eliminação de artefatos elétricos baseados em filtros FFT (software) eliminaram, em tempo real, ruídos elétricos provenientes do aparelho de RM nos registros de EEG, possibilitando a identificação adequada de alterações morfológicas. Validamos nossa metodologia em dois modelos diferentes de epilepsia: injeções intraperitoniais de Picrotoxina (um inibidor GABAérgico) e de Pilocarpina (um agonista Colinérgico). Estudando o periodo pré-ictal, onde observamos resposta eletrodecremental no EEG, obtivemos, no modelo de Picrotoxina, áreas de inativação em caudado/putamen e núcleos acumbens e áreas de ativação ao nível de amígdalas laterais, ao passo que padrão inverso foi observado no modelo de Pilocarpina. Análise conjuncional (mostrando semelhanças entre os dois modelos) mostrou extensa área de inativação ao nível de núcleos septais. Além disso, registros de EEG profundo em caudado/putamen, amigdala, hipocampo e córtex, mostraram, em animais tratados com Picrotoxina, um maior percentual de diminuição da amplitude do EEG nos eletrodos de caudado/putamen, sugerindo uma correlação entre variação da amplitude do EEG e contraste do tipo BOLD. Concluímos que a técnica aqui apresentada possibilita a obtenção de registros verdadeiramente simultâneos de EEG e RMf com gualidade adeguada para sua aplicação no estudo das epilepsias.

## Abstract

The epilepsies are a widespread group of conditions with an estimated prevalence of 1% in the total population, being considered one of the most important neurological diseases, resulting in important morbidity. Drug control of seizures is achieved in up to 70% of the cases, but no cure or treatment capable of blocking the progression of the disease is currently available. Therefore, the study of the epileptogenic mechanisms and the quest for the definite cure of this pathology is one of the most important goals of modern neurology. Several animal models of epilepsy are used to study the different kinds of epileptic seizures, each one addressing a particular feature of a certain type of epileptiform disorder. Different methodological tools are also used to assess different aspects of its patophysiology (i.e. imunohistochemistry, electrophysiology, microdialisis and neuroimaging). Electroencephalographic studies (EEG) have provided considerable insights about the dynamics of epileptogenesis. However, besides its great temporal resolution (in the order of milliseconds), this technique lacks spatial resolution. On the other hand, modern functional neuroimaging techniques can assess the brain function with a sub-millimetre resolution, but with a poor temporal resolution. The objective of this PhD thesis was to develop methodology for simultaneous acquisition of EEG and fMRI in animals and its application in epilepsy research. We developed technique for simultaneous acquisition of Electroencephalogram (EEG) and functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) based on amplifiers and filters placed as close as possible to the animals in order to minimize the effects of the MR scanner in the EEG recordings; data transmission via fibre optics led to the elimination of RF artefacts in the MR images. Artefact Elimination Algorithm based on FFT filters (software), applied in real time, cleaned electrical noise induced by the scanner from the EEG, making it possible the adequate identification of morphological alterations. We validated this methodology in two different animal models of epilepsy: intraperitoneal injections of Picrotoxin (a GABAergic inhibitor) and Pilocarpine (a cholinergic agonist). Studying the pre-ictal period, when the EEG recordings showed electrodecremental response, we observed, in the Picrotoxin treated group, inactivation areas in the caudate-putamen and acumbens nuclei and activation areas in the lateral amigdala, whereas an inversed pattern was observed in the Pilocarpine treated group. Conjunctional analysis (depicting similarities between the two groups) showed extensive inactivation in the septal nuclei. Furthermore, depth EEG recordings in the caudate-putamen, amigdala, hippocampus and cortex, showed a greater amplitude decrease percentage in the caudate-putamen in animals treated with Picrotoxin, suggesting a correlation between EEG's amplitude variation and BOLD response. In conclusion, the technique herein described makes it possible to acquire truly simultaneous EEG and fMRI with adequate quality for its application in epilepsy research.

## 1 – Introdução

Durante a introdução abordaremos os principais aspectos teóricos relacionados com nosso trabalho, de forma a oferecer ao leitor conhecimentos básicos suficientes para o bom entendimento das perguntas científicas e dos procedimentos experimentais desenhados para respondê-las.

Iniciaremos com considerações gerais sobre as epilepsias, abordando aspectos históricos, epidemiológicos e clínicos, enfatizando os conhecimentos atuais sobre seus mecanismos fisiopatológicos. Abordaremos em seguida os modelos animais mais utilizados para estudo das epilepsias, dando especial ênfase ao modelo utilizado em nossos trabalhos. Também constam desta introdução considerações gerais sobre os métodos utilizados e suas aplicações (i.e eletroencefalografia e ressonância nuclear magnética funcional), bem como uma revisão sobre os métodos de aquisição simultânea de eletroencefalografia e imagens de ressonância magnética funcional descritos na literatura.

Ao longo dessa introdução abordaremos, quando pertinente, experimentos preliminares realizados em nosso Laboratório que resultaram nas perguntas científicas e nos objetivos desse trabalho.

## 1.1) Epilepsias

#### 1.1.1) Histórico<sup>a</sup>

As epilepsias são uma das entidades patológicas mais antigas da história da humanidade, sendo os primeiros relatos encontrados na medicina Indu do período Védico, entre 4500 e 1500AC.

Na literatura Aiurvédica do Charaka Samhita (datada de 400AC), a epilepsia é descrita como "*apasmara*" que significa "*perda de consciência*". O Charaka Samhita contém várias referências a todos os aspéctos das epilepsias, incluindo sintomatologia, etiologia, diagnóstico e tratamento.

Em contraste com os escritos do Charaka Samhita, encontramos no Tratado de Medicina Babilônico, formado por textos que remontam a 2000AC (Temkin O, 1971), descrições que enfatizam a natureza sobrenatural das epilepsias, associando cada tipo de crise ao nome de um deus ou espírito, em geral malígno. Dessa forma, a maioria dos tratamentos propostos eram de cunho espiritual. É interessante salientar que um dos tratamentos preconizados era a trepanação, ou abertura do crânio (Figura-01). Esse procedimento, segundo os relatos, permitiria que os espíritos malígnos deixassem o corpo da pessoa acometida. Apesar de conceitualmente errado, esse método provou ser efetivo em alguns casos, provavelmente por alívio de uma condição de pressão intra-craniana elevada (p.e. em casos de tumor ou infecção do sistema nervoso central).

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Extraído de www.who.int/mediacentre/factsheet/fs168/en/



Figura 01 – Foto de crânio do período pré-colombiano mostrando trepanação realizada com fins terapeuticos.

Os escritos Babilônicos são os precursores do conceito Grego de "*Doença Sagrada*" para as epilepsias. O termo "*seleniazetai*" era frequentemente usado para descrever pessoas com epilepsia, pois elas eram consideradas como afetadas pelas fases da lua ou pela deusa da lua (Selena), vindo daí o termo "*lunático*" (Wilson and Reynolds, 1990).

Hipócrates, segundo o que consta em seus famosos tratados datados do século 5AC, entitulado "Sobre a Doença Sagrada", acreditava que as epilepsias não eram entidades sagradas, mas sim desordens do cérebro, recomendando tratamentos físicos e postulando que se o distúrbio se tornasse crônico, seria incurável. Desta forma, Hipócrates relaciona, pela primeira vez na história, um distúrbio do funcionamento cerebral com as epilepsias (O'Leary JL and Goldring S, 1976).

Apesar da visão menos espiritualizada sobre as epilepsias encontrada no Charaka Samhita e nos escritos hipocráticos, a percepção de que as epilepsias são na realidade distúrbios do funcionamento cerebral só começou a ser aceita nos séculos XVIII e XIX da era atual (Temkin O, 1971). Os 2000 anos iniciais da

"epileptologia" foram, portanto, dominados por uma visão predominantemente sobrenatural. Ao longo de todo esse período, pessoas portadoras de epilepsia eram encaradas com medo e suspeita e eram sujeitas a enorme estigma social, sendo muitas vezes proscritas e punidas. Algumas, entretanto, conseguiram ter sucesso e tornar-se famosas. Entre outros, podemos citar Julius Caesar, o czar Pedro "O Grande", o papa Pio IX, o escritor Dostoyevsky e o poeta Lorde Byron; entre os brasileiros ilustres estão Machado de Assis e D. Pedro I (para uma lista de outros epilépticos famosos: www.epilepsiemuseum.de).

Já no século XIX, com o surgimento da neurologia como uma nova disciplina distinta da psiquiatria, o conceito de epilepsia como uma doença do cérebro tornouse mais aceita, especialmente na Europa e nos Estados Unidos da America. Isso ajudou a reduzir o estigma associado à doença. A Brometo, introduzida em 1857 como a primeira droga anti-epiléptica eficaz, tornou-se amplamente utilizada nesses países.

Os fundamentos da compreensão moderna das epilepsias como distúrbios da função cerebral podem ser atribuídos aos trabalhos de John Hughlings Jackson. Em 1873 esse neurologista londrino propós que as convulsões epilépticas seriam resultado de descargas eletro-químicas curtas e repentinas ocorridas no cérebro. Ele sugeriu ainda que as características das convulsões dependeriam da localização dessas descargas dentro do cérebro e da função das áreas onde as mesmas foram geradas (McHenry LC, 1969;Taylor J, 1958).

Com a invenção da eletroencefalografia na Alemanha por Hans Berger (Berger H, 1929), a presença de atividade elétrica no cérebro pôde ser observada. Diferentes padrões de ondas presentes em diferentes tipos de convulsões puderam ser estudados e descritos. O EEG viabilizou ainda a localização de uma área

cerebral onde os disparos epileptiformes se originam (i.e. foco epileptogênico) expandindo assim as possibilidades de tratamento neurocirúrgico (Blumer D, 1984;Gibbs FA et al., 1936).

Durante a primeira metade do século 20, as principais drogas para o tratamento das epilepsias eram o Fenobarbital (usado pela primeira vez em 1912) e a Fenitoína (inicialmente usada em 1938). Na década de 60, observou-se um aumento considerável na velocidade de desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das epilepsias, baseado em parte numa melhor compreensão dos mecanismos eletro-químicos da atividade cerebral, especialmente dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Em países desenvolvidos, em anos recentes, várias drogas entraram no mercado resultando num controle satisfatório de 70 a 80% dos novos casos diagnosticados tanto em adultos quanto em crianças.

Recentemente, o desenvolvimento de novas técnicas de neuroimagem tem possibilitado uma melhor compreensão da fisiopatologia das epilepsias resultando em avanços no tratamento dos distúrbios epilépticos. Tal tecnologia tem possibilitado a detecção de lesões cerebrais sutis associadas aos distúrbios convulsivos, assim como o estudo da função cerebral de forma não invasiva (RMf, Espectroscopia por RM, PET).

#### 1.1.2) Conceito e Classificação

### a) Conceito<sup>b</sup>

Sempre que se trata das epilepsias, uma diferenciação inicial deve ser feita entre epilepsia e crises tipo-epilépticas.

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Extraído de http://www.ilae-epilepsy.org/Visitors/Centre/ctf/over\_frame.html

Crises tipo-epilépticas, ou convulsões, são eventos paroxísticos e autolimitados resultantes de atividade neuronal rítmica anormal e involuntária, mas com um fator desencadeande identificável (p.e. febre, trauma, hipoglicemia, distúrbios do balanço hidro-eletrolítico etc). Tais crises são tipicamente curtas, com duração de não mais do que 5 minutos, na grande maioria, podendo ser precedidas por um período prodrômico (i.e. pré-crise) sintomático, e seguidas por um longo período pós-crise, durante o qual se observa um retorno lento, mas gradual ao estado de consciência basal. Esse tipo de crise em geral termina de modo espontâneo sem que nenhum tipo de intervenção seja necessário. O período durante as crises é também conhecido como período ictal, sendo o período prodrômico chamado de pré-ictal e o período pós-crise de pós-ictal.

As epilepsias, por sua vez, são um conjunto de distúrbios neurológicos caracterizados por crises espontâneas recorrentes e não induzidas. Ou seja, quando nos referimos às crises, estamos nos referindo a um conjunto de sintomas e quando nos referimos às epilepsias, estamos nos referindo à entidades patológicas.

#### b) Classificação

As epilepsias tem sido classificadas segundo diversos parâmetros: (a) de acordo com a etiologia suposta (b) ou local de origem, (c) com base em sua forma clínica (generalizada ou focal), (d) de acordo com a frequência das crises (isolada, cíclica, prolongada ou repetitiva), ou (e) através de seus correlatos eletroencefalográficos.

A classificação mais adotada é baseada na classificação proposta inicialmente por Gastaut em 1970, posteriormente refinada pela comissão de classificação e terminologia da International League Against Epilepsy (1981)

(Commission of Classification and Terminology of the International League AgainstEpilepsy, 1989;Dreifuss and Henriksen, 1992).

. Essa classificação, baseada principalmente na forma de apresentação clínica das crises e em suas características eletroencefalográficas, tem sido adotada em todo o mundo sendo referida como Classificação Internacional de Crises Epilépticas. A tabela-01 apresenta uma versão modificada dessa classificação.

Crises Parciais
Crise Parcial Complexa
Crise Parcial Simples
Motora
Sensorial
Autonomica
Psíquica
Crise Tônico-Clônica secundariamente generalizada
Crises Generalizadas
Tônico-clônica (tônico-clônica primária)
Ausência
Mioclônica
Clônica
Tônica

Ausência Atípica Espasmo Infantil

Atônica

**Tabela 01** – Classificação de Crises Convulsivas Modificada (ILAE)<sup>c</sup>

O maior mérito dessa classificação está na facilidade de sua aplicação em pacientes epilépticos e em sua utilidade clínica, sendo capaz de prever a resposta dos pacientes a tratamentos epecíficos e, de certa forma, de possibilitar inferências sobre o prognóstico em cada situação.

Segundo essa classificação as crises podem ser divididas em dois tipos: (a) parciais, onde um local ou foco inicial pode geralmente ser determinado e (b)

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Modificado de http://www.ilae-epilepsy.org/Visitors/Centre/ctf/over\_frame.html

generalizadas, onde as crises aparentemente iniciam simultaneamente em todas as áreas do cérebro. Crises que começam de forma focal não raramente evoluem para a forma generalizada, sendo assim classificadas como secundariamente generalizadas.

As crises parciais são subdivididas em: (a) simples, quando não há alterações do estado de consciência e (b) complexas, onde alterações do estado de cosciência são observadas, podendo ou não haver perda da mesma. As crises parciais simples são ainda subdivididas de acordo com suas manifestações clínicas principais em: (a) motoras, (b) sensoriais, (c) autonômicas ou (d) psíquicas. Quando manifestações clínicas sensoriais, autonômicas ou psíquicas antecedem a progressão para perda de consciência, elas são consideradas como prôdromos ou auras. Em essência, as auras são as manifestações iniciais de crises focais ou parciais. Não raro, as auras constituem a única manifestação clínica epiléptica.

As crises generalizadas são de dois tipos: (a) convulsivas e (b) nãoconvulsivas. O estereótipo das crises generalizadas convulsivas (e o mais reconhecido entre o público leigo) são as crises generalizadas tônico-clônicas (antigamente chamadas de Grande Mal). Menos frequentemente as crises generalizadas podem ser puramente tônicas, clônicas ou clônico-tônico-clônicas. A crise generalizada não-convulsiva clássica é a chamada crise de ausência (Pequeno Mal), caracterizada por um período curto de inatividade (em torno de 5-10 segundos), com retorno ao estado normal imediatamente após a crise, mas sem que o paciente tenha consciência do que ocorreu no decorrer da crise.

#### 1.1.3) Etiologia, Epidemiologia e Prognóstico

## a) Etiologia<sup>d</sup>

As epilepsias são frequentemente, mas não sempre, o resultado de uma doença neurológica de base. Qualquer tipo de distúrbio do Sistema Nervoso Central (SNC) pode, em princípio, resultar em epilepsia, mas nem todas as pessoas com a mesma patologia cerebral irão desenvolver uma condição epiléptica. Em vista do fato de que apenas uma porcentagem dos portadores de doença cerebral experimentam convulsões como um dos sintomas da doença, acredita-se que aqueles que realmente desenvolvem crises convulsivas são mais vulneráveis devido a processos bioquímicos ou a alterações na neurotransmissão.

Comumente a causa da epilepsia não pode ser identificada. Nesses casos, a teoria mais aceita é a de que a epilepsia é o resultado de um desbalanço de certos sistemas químicos cerebrais (especialmente de neurotransmissores) causando uma diminuição do limiar convulsivo (vide seção sobre fisiopatologia das epilepsias).

Crianças e adolescentes são mais sucetíveis ao desenvolvimento de epilepsias de causa desconhecida ou de origem genética. Quanto mais velho o paciente na ocasião do diagnóstico, maior a probabilidade de que a epilepsia seja secundária à uma patologia cerebral.

Trauma e infecção do SNC podem resultar em epilepsia em qualquer idade e podem ser responsáveis pela maior incidência de epilepsias em paises em desenvolvimento. Por exemplo, atribui-se a ocorrência de crises focais em paises latino-americanos a calcificações secundárias à presença de cistos de *Taenia solium* (popularmente conhecida como solitária) no cérebro (neurocisticercose); na África, malária e meningite são causas comuns enquanto que na Índia, neurocisticercose e

<sup>&</sup>lt;sup>d</sup> Extraído de http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/en/

tuberculose são responsáveis por um número considerável de casos (Sander and Hart, 1999).

Condições febris na infância, seja qual for a natureza das mesmas, podem desencadear crises convulsivas. Aproximadamente 3% das crianças que apresentaram crises febris na infância irão desenvolver epilepsia na idade adulta.

#### b) Epidemiologia<sup>e</sup>

As epilepsias não conhecem barreiras geográficas, raciais ou sociais. Ocorrem em homens e mulheres e podem começar em qualquer idade, apesar de serem mais frequentemente diagnosticadas na infância, adolescência e na terceiraidade. Qualquer um pode ser afetado por convulsões. De fato, até 5% da população mundial poderá apresentar um episódio convulsivo durante sua vida, mas o diagnóstico de epilepsia é reservado para os casos em que se observam duas ou mais crises espontâneas.

Em vários estudos ao redor do mundo, a prevalência (número total de casos na população num dado momento) das epilepsias tem sido estimada em aproximadamente 8,2 casos por grupo de 1000 pessoas da população geral (Hauser et al., 1991). Entretanto esse valor pode estar subestimado uma vez que alguns estudos realizados em países em desenvolvimento (como Colômbia, Equador, Índia, Libéria, Nigéria, Panamá, Tanzânia e Venezuela) sugerem uma prevalência acima de 10 por 1000 pessoas. Dessa forma, é provável que em torno de 60 milhões de pessoas no mundo sejam portadoras de epilepsia.

Estudos em países desenvolvidos estimam a incidência (número de novos casos por ano) em aproximadamente 50 casos por grupo de 100.000 pessoas (Dreifuss and Henriksen, 1992). Entretanto, mais uma vez, estudos em países em

e Extraído de http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/en/

desenvolvimento apontam para cifras que podem chegar ao dobro desse valor, em torno de 100 casos por 100.000 pessoas.

Umas das causas principais para a maior incidência de epilepsias em países em desenvolvimento é a maior exposição da população a patologias que podem levar ao desenvolvimento de um quadro epiléptico, tais como, neurocisticercose, meningite, malária, complicações pre e perinatais e desnutrição.

#### c) Prognóstico

As epilepsias são associadas a aumento no risco de mortalidade. Morte pode ser relacionada a: (a) doença neurológica de base, tais como tumor ou infecção, (b) convulsões em situações perigosas, levando a afogamento, queimaduras ou traumatismo craniano, (c) *status epilepticus* (crises convulsivas contínuas), (d) morte súbita e inexplicável, ou possivelmente parada cardio-respiratória durante crise e (e) suicídio (Raymond D.Adams et al., 1998).

Estudos, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, mostram que até 70% dos casos recém-diagnosticados de epilepsias conseguem ser tratados com sucesso (i.e., remissão completa e controle das crises por vários anos) através do uso de tratamento medicamentoso adequado. Após 2-5 anos de tratamento com ausência de crises, aproximadamente 70% das crianças e 60% dos adultos podem ter seus tratamentos interrompidos sem reaparecimento dos sintomas.

Entretanto, até 30% dos pacientes podem não responder adequadamente ao tratamento farmacológico. Um fato que aumenta o prognóstico negativo é a presença de doença neurológica de base.

Crises parciais, especialmente se associadas à doença neurológica de base, são mais difíceis de serem controladas do que crises generalizadas.

Crises secundárias não-epilépticas, tais como aquelas relacionadas com patologia neurológica aguda de curta duração (p.e. trauma ou infecção do SNC), podem seguir um curso auto-limitado.

## 1.2) Fisiopatologia das Epilepsias

Durante o "Second Workshop on New Horizons in the Development of Antiepileptic Drugs", realizado em Massachusetts entre 3 e 5 de Dezembro de 2003, foi proposto um novo paradigma de abordagem das síndromes epilépticas focado no estudo dos mecanismo que levam ao desenvolvimento das epilepsias, baseando-se em quatro alvos principais: (1) o estudo de formas de apresenção das epilepsias, (2) o estudo de formas de se interferir no processo de progressão das epilepsias, (3) o estudo da resistência medicamentosa em alguns casos e no desenvolvimento de estratégias para interferir nesse processo e (4) a busca de cura, seja ela através de terapêutica medicamentosa ou não farmacológica (Loscher and Schmidt, 2004).

Entretanto, para que essa mudança de paradigma seja efetiva, é necessário mudar o foco de estudo, que na atualidade se concentra em formas de tratamento das crises, para o entendimento profundo dos mecanismos celulares e moleculares das epilepsias, de forma a se buscar intervir nos processos de gênese e progressão da patologia.

As epilepsias, como visto, são condições crônicas, que se originam em circuitos neurais, sendo que cada neurônio ou grupo neural, dentro desse circuito, participa provavelmente de uma forma particular e complementar em cada um dos estágios do desenvolvimento das epilepsias (Loscher and Schmidt, 2004).

Uma das maiores contribuições para essa visão "circuital" das epilepsias foram os trabalhos de Gloor e col. (Gloor et al., 1977;Quesney et al., 1977). Esses

trabalhos demonstraram, utilizando-se do modelo de epilepsia generalizada por injeções de penicilina em gatos, que as crises eram o resultado de interações entre o neocórtex e estruturas talâmicas. Eles concluiram que o fator desencadeante das crises era o aumento da influência excitatória cortical, mas que estruturas talâmicas eram necessárias para modular essa excitabilidade aumentada de forma a gerar os complexos ponta-onda observados no EEG.

Existem evidências que suportam pelo menos dois outros circuitos "epileptogênicos". A primeira hipótese involve o circuito trisináptico hipocampal, formado por córtex entorrinal, giro denteado e Corno de Amon. Em estudos de estimulação do circuito trissináptico em animais não anestesiados, Herreras e col. observaram presença de atividade epileptiforme reverberante antes que tal atividade se espalhesse para regiões adjacentes (Herreras et al., 1987). Outra hipótese envolve a interação entre estruturas talâmicas de linha média (incluindo os núcleos dorso-medial e reuniens em ratos) e várias regiões do sistema límbico com as quais essas estruturas talâmicas mantém conexões recíprocas (amigdala, córtex piriforme, córtex entorrinal e hipocampo). Neste tipo de circuito, assim como no circuito descrito por Gloor e col. um estado de hiper-excitabilidade partiria de estruturas límbicas sendo então modulado por estruturas talâmicas (Bertram et al., 1998).

Tais circuitos, entretanto, são constituintes normais do cérebro e na maioria das vezes não funcionam de forma a desencadear crises convulsivas ou quadro de epilepsia, subservindo a funções fisiológicas essenciais ao funcionamento adequado do sistema nervoso. Aparentemente, o SNC é uma rede de circuitos neurais com funcionamento altamente restrito por circuitos inibitórios que mantém um rígido controle do sistema (Roberts, 1974;Roberts, 1980). Tais circuitos neurais aparentemente estão sob constante efeito inibitório, predominantemente através do

neurotrasmissor GABA (Ácido gama-amino-butírico). Ocasionalmente, neurônios do tipo marca-passo, presentes nesses circuitos, são liberados por processo de desinibição, passando a exercer assim seu papel excitatório dentro do circuito ao qual pertencem. Tais circuitos excitatórios e inibitórios possuem extensas interconexões, recebendo tanto *feedback* positivo quanto negativo uns dos outros, mantendo assim, um delicado equilíbrio entre excitabilidade e inibição.

Teorias modernas sobre epileptogênese atribuem as causas das epilepsias a três principais processos: (a) distúrbios do funcionamento de canais iônicos, (b) distúrbios da excitabilidade de certos circuitos neurais e (c) alterações do tônus inibitório por distúrbios dos canais iônicos relacionados aos receptores do tipo GABA<sub>A</sub> (Loscher and Schmidt, 2004).

#### a)Anormalidades do Sistema Inibitório GABAérgico

Pode-se demonstrar que o bloqueio farmacológico exógeno da inibição mediada por GABA (o principal neurotransmissor inibitório do SNC) induz atividade epiléptica. Injeções sistêmicas de antagonistas GABAérgicos, tais como Picrotoxina e Bicuculina (De Deyn et al., 1992;Fisher RS, 1989), induzem crises epileptiformes sendo utilizados em modelos animais de epilepsia.

Dessa forma, é razoavel acreditar que distúrbios desse sistema possam ser responsáveis, ou pelo menos participar no desenvolvimento de certos tipos de epilepsias (Meldrum BS, 1989). Evidências em suporte a essa hipótese incluem os estudos de Ribak e col. (Ribak et al., 1982) e Sloper e col. (Sloper et al., 1980). Os trabalhos de Ribak, envolvendo modelo convulsivo por deposição de alumínio no córtex de macacos jovens, mostraram uma redução relativamente maior de sinapses inibitórias do que das excitatórias. Sloper e col. demonstraram uma perda seletiva de terminações GABAérgicas no córtex de macacos jóvens após um período de 30

minutos de hipóxia, sugerindo que esse fosse o mecanismo responsável pela epileptogênese nesses animais.

Entretanto, alguns trabalhos mostraram resultados conflitantes com a hipótese de que a hiperexcitabilidade observada fosse decorrente da perda seletiva de terminações GABAérgicas.

Lloyd e col. (Lloyd et al., 1986) demonstraram resultados variáveis em foco epileptogênico retirado cirurgicamente de pacientes, obtendo, em alguns casos, redução e em outros aumento de terminações GABAérgica. Babb (Babb TL, 1986), investigando 24 casos de tecido ressecado de lobo temporal, não observou nenhuma diminuição em sinapses GABAérgicas nestes tecidos. Em análises de imuno-histoquímica através de marcação com GAD (*glutamic acid decarboxylase –* que se liga a terminações GABAérgicas) de cérebros de animais submetidos à abrasamento hipocampal, Babb e col. (Babb et al., 1989) observaram uma redução da marcação de GAD 24 horas após crise, mas não 3-7 dias após. Tais resultados sugerem que a redução observada precocemente após a crise seria consequência da mesma.

Sloviter (Sloviter, 1987) demonstrou que neurônios GABAérgicos eram mais resistentes à morte celular induzida por estimulação elétrica de hipocampo do que células musgosas e neurônios contendo somatostatina localizados no hilo do giro denteado. A paradoxal preservação preferencial de neurônios GABAérgicos, com concomitante perda da inibição mediada por GABA observadas em modelo de crises intensas repetidas, levou Sloviter a propor a hipótese das "células em cesto dormentes" (Sloviter, 1991). Segundo essa hipótese a morte de neurônios excitatórios no hilo do giro denteado, resultaria em remoção de excitação para as células em cesto GABAérgicas, resultando assim numa diminuição da atividade das

mesmas e uma consequente desinibição dos neurônios com os quais essas células fazem sinapse. Essa desinibição, uma vez iniciada, levaria a um ciclo de hiperexcitabilidade de células granulares com aumento da morte celular resultando no desenvolvimento de uma condição epiléptica anos após o insulto inicial (McNamara JO, 1994).

#### b) Anormalidades dos Sistemas Excitatórios

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC, agindo em diversos tipos de receptores: (a) receptores ionotrópicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxasol-4-propiônico) e Kainato e (b) receptores metabotrópicos. O Glutamato é sempre excitatório quando age sobre receptores ionotrópicos, mas pode ser tanto excitatório quanto inibitório quando age em receptores metabotrópicos. Injeções focais de agonistas desses receptores podem induzir atividade epileptiforme, sendo utilizadas em modelos animais de epilepsias (De Deyn et al., 1992;Fisher RS, 1989). Dessa forma, é provável que hipersensibilidade dos sistemas neurotransmissores excitatórios seja um fator desencadeante de crises epileptiformes corticais focais.

Aumento de liberação de aminoácidos excitatórios é observado tanto no modelo animal de abrasamento límbico quanto em linhagens de animais suscetíveis a epilepsia (EL - *epilepsy-like*) (Meldrum, 1994;Jarvie et al., 1990). Foi observado em camundongos da linhagem EL uma concentração plasmática elevada de glutamato (Janjua et al., 1992). Estudos do modelo de abrasamento límbico mostraram uma função aumentada de receptores do tipo NMDA, aumento da densidade de receptores do tipo Kainato e um aumento da resposta de receptores metabotrópicos ao glutamato (Flavin et al., 1991;Jarvie et al., 1990;Represa et al., 1989;Akiyama et al., 1992).

Estudos preliminares de microdiálise em pacientes epiléticos mostraram um aumento transiente em aminoácidos excitatórios no início das crises (Klancnik et al., 1992;Carlson et al., 1992). Estudos usando microdiálise bilateral de hipocampo em humanos mostrou um aumento da concentração extra-celular de glutamato antes do início de atividade eletrográfica epileptiforme na área do foco (During and Spencer, 1993).

Tecido cirúrgico (ressecção de lobo temporal anterior) avaliado para densidade de receptores glutamatérgicos, demostrou uma variedade de alterações quando comparado com tecido extraído *post morten* de pacientes não epiléticos, sendo observado, predominantemente, um aumento da densidade de receptores do tipo NMDA e Kainato no córtex entorrinal (Geddes et al., 1990;McDonald et al., 1991). Aumento na densidade de receptores do tipo Kainato foi observado no giro denteado de tecido extraído de crianças com diferentes tipos de epilepsias (estudo *post morten*) (Represa et al., 1989).

Assim como nas anomalias dos circuitos inibitórios, acredita-se que intervenções farmacológicas sobre os sistemas excitatórios possam ser eficazes no tratamento de distúrbios epilépticos.

#### c) Anormalidades dos Canais Iônicos Celulares

Variações no volume dos líquidos intersticiais ou de sua composição iônica exercerem um papel importante na sustentação de padrões irregulares de disparos dos neurônios locais. Desta forma, alterações no transporte transmembrana e no fluxo iônico de Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> etc, são, em diferentes graus, considerados como responsáveis por determinados padrões de disparos. O envolvimento desses íons pode ser demonstrado através da capacidade de fármacos que agem sobre os

canais de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e/ou Ca<sup>2+</sup> em modificar disparos epileptiformes (Honavar M and Meldrum BS, 2002).

Células gliais com capacidade alterada de controlar níveis elevados de K<sup>+</sup> intersticial, tem sido observadas em tecidos durante períodos de disparos sustentados. Acredita-se que a incapacidade dessas células gliais em equilibrar a composição iônica intersticial, seja responsável pela transição entre disparos interictais para atividade ictal plena (Grisar, 1984).

O sistema de transporte aniônico das células gliais exerce um papel importante na regulação da excitabilidade cerebral. Transportadores neuronais aniônicos ativos são necessários para se estabelecer um gradiente transcelular de Cl<sup>-</sup> que é essencial para a atividade neurotransmissora inibitória. Falhas nesses transportadores de Cl<sup>-</sup> tornariam impossível para neurotransmissores tais como GABA provocar hiperpolarização celular na membrana pós-sináptica.

Em resumo, estudos recentes tem demonstrado anormalidades na função cerebral e de sua neuroquímica relacionados com as epilepsias, mas a exata ordem de eventos e sua importância para o processo epileptogênico como um todo ainda necessita ser esclarecida. Para começarmos a responder essas perguntas, estudos com alta resolução temporal e espacial, com a capacidade de avaliar o processo de epileptogênese de forma seriada e não invasiva são necessários. Nos próximos tópicos abordaremos diferentes modelos animais de epilepsias e algumas técnicas para o estudo dos mesmos.

## 1.3) Modelos Animais de Epilepsia

O estudo das epilepsias depende da utilização de modelos animais. Devido à diversidade de tipos de epilepsias, vários modelos vêm sendo desenvolvidos buscando mimetizar características específicas a cada tipo de epilepsia, possibilitando, assim, não só o estudo dos mecanismos epileptogênicos como também de drogas anticonvulsivas.

Para citar apenas alguns exemplos de modelos de epilepsia *in vivo*, temos: (a) eletrochoque, (b) modelos genéticos, como os animais audiogênicos (que têm crises convulsivas quando expostos a sons de alta intensidade) e os babuínos fotossensíveis, (c) estimulação elétrica de áreas específicas, como amígdala lateral e hipocampo, (d) modelos de lesões, (e) modelos de pró-convulsivos sistêmicos, como pentilenotetrazol e picrotoxina e (f) modelos de pró-convulsivos tópicos, como penicilina, bicuculina e ácido caínico (Para uma revisão em modelos animais de epilepsias veja: Fisher (Fisher RS, 1989) e De Deyn e col. (De Deyn et al., 1992)).

De forma geral, as drogas pró-convulsivas utilizadas nos modelos descritos acima atuam inibindo as vias inibitórias GABAérgicas (p.e. bicuculina, estricnina, penicilina, pentilenotetrazol e picrotoxina) ou agindo de forma a mimetizar a ação de neurotransmissores excitatórios (p.e. ácido caínico, Pilocarpina).

Escolhemos os modelos de injeção intra-peritoneal (i.p.) de Pilocarpina e Picrotoxina (PTX) devido a (a) reprodutibilidade dos achados EEGráficos, (b) rapidez da resposta, (c) facilidade de administração, (d) aspectos EEGráficos, incluindo diferentes morfologias em diferentes pontos do EEG, com padrão temporal de alterações descrito previamente na literatura para algumas áreas profundas (Turski

et al., 1983;Mackenzie et al., 2002) e (e) sistema neurotransmissor afetado (Acetilcolina e GABA. respectivamente).

A PTX provoca uma redução da inibição ao ligar-se aos canais de cloro relacionados aos receptores do tipo GABA<sub>A</sub>, bloqueando tais canais quando GABA encontra-se ligado ao seu sítio específico neste receptor (Edmonds, Jr. and Bellin, 1976).

O primeiro relato de estudo eletroencefalográfico dos efeitos de injeção sistêmica de picrotoxina foi feito por Kaplan e Williamson em 1978 (Kaplan and Williamson, 1978). Nesse trabalho os autores estudaram os efeitos de 6 diferentes drogas pró-convulsivas, incluindo a PTX, em gatos implantados com eletrodos de EEG, nos quais foram realizados registros de EEG contínuo e de potenciais evocados somatosensoriais. Foi observado, após administração de PTX, aumento da amplitude dos potenciais evocados e atividade eletroencefalográfica epileptiforme, de forma dose-dependente, sugerindo um aumento global da excitabilidade cerebral.

Quando administrada sistemicamente em mamíferos, a PTX induz crises mínimas e máximas de forma dose-dependente. Em ratos, injeções de 8mg de PTX por quilo de animal induz hiperatividade, tremores e contrações clônicas de patas anteriores, seguidos por extensão tônica das patas posteriores evoluindo para crises generalizadas do tipo tônico-clônica (De Deyn et al., 1992).

Observações realizadas em nosso laboratório, mostraram uma sequência reprodutível de alterações eletroencefalográficas em ratos injetados com PTX. Inicialmente, um período pré-ictal pôde ser observado, caracterizado por uma diminuição da amplitude e frequência do EEG. Em seguida, uma fase de atividade de baixa frequência e alta amplitude precede o aparecimentos dos primeiros

complexos poli-pontas. Em conjunto com o aparecimentos dos fenômenos motores (pilo-ereção, mastigação, mioclonias de face e de orelhas), observa-se o aparecimento de complexos ponta-onda. Tais achados estão de acordo com as descrições desse modelo encontradas na literatura (Mackenzie et al., 2002;Kaplan and Williamson, 1978), mas a presença de alterações pré-ictais não foi observada.

Observamos ainda, em experimentos preliminares de ressonância magnética funcional, áreas específicas de respostas negativas e positivas em imagens em T<sub>2</sub>\* (vide Princípios Físicos de RM), após a administração de PTX em ratos, sugerindo processos inibitórios e excitatórios concomitantes.

O outro modelo adotado em nossos trabalhos foi o de injeções intraperitoneais de Pilocarpina. As alterações eletroencefalográficas locais em hipocampo e amigdala, observadas nesse modelo, foram descritas em 1983 por Turski e col. (Turski et al., 1983). Nesse trabalho, injeções i.p. de 100, 200 e 400 mg de pilocarpina por quilo de peso, induziram alterações eletrográficas e comportamentais progressivas em animais não anestesiados, de forma dose-Após um período de 2-3 minutos injeção, dependente. de resposta eletrodecremental foi observada nos eletrodos corticais e na amigdala, enquanto que ritmo teta dominou a atividade elétrica no hipocampo. Entre 15 e 20 minutos após injeção, ritmo rápido de alta tensão, com presença de disparos em ponta isolados, se sobrepõe ao ritmo teta hipocampal, sem que alterações significativas possam ser observadas na resposta inicial tanto na amigdala quanto no córtex. Atividade eletrográfica epileptiforme progressivamente se espalha para todos os canais de registro entre 30 e 50 minutos pós-injeção. Tais alterações eletrográficas são concorrentes com alterações comportamentais típicas de epilepsia de lobo temporal, que aparecem também de forma progressiva, inicinado-se com automatismos

gustatórios e olfatórios, evoluindo para crise límbica motora, constituída por salivação intensa, mioclonia de patas anteriores, elevações e quedas.

A correlação entre os achados eletroencefalográficos e as áreas de ativação e inativação da ressonância magnética funcional, possibilitaria uma compreensão mais abrangente da dinâmica e dos circuitos neurais envolvidos no desenvolvimento das crises induzidas nesses dois modelos.

## 1.4) EEG

A presença de atividade elétrica em animais foi inicialmente proposta por volta de 1780 quando Luigi Galvani observou a contração de pernas de rãs expostas a correntes elétricas na presença de tempestades com raios (Niedermeyer E, 1999b).

Entretando, mais de um século foi necessário entre as primeiras observações de Galvani e as primeiras tentativas de se registrar e medir a atividade elétrica em animais.

Richard Caton apresentou seus resultados iniciais em 1875 sobre a exploração da atividade elétrica em cérebros expostos de coelhos e macacos. Utilizando-se de um galvanômetro, Caton descreveu pequenas oscilações produzidas ao se posicionar os eletrodos em dois pontos distintos do córtex cerebral ou um eletrodo na substância cinzenta e outro na substância branca do cérebro. Foi de Caton também a primeira descrição de que a substância cinzenta possui um potencial elétrico positivo em relação a estruturas profundas e de que áreas do cérebro apresentam variação negativa em seu potencial em resposta a ativação, sendo essa última observação considerada como uma das primeiras descrições de potenciais evocados (Niedermeyer E, 1999b).

A descoberta do EEG humano é atribuída a Hans Berger. As primeiras observações de atividade elétrica cerebral foram realizadas por Berger em 1924. Berger descreve discretas oscilações observadas no galvanômetro em decorrência do posicionamento de eletrodos na cabeça de pacientes portadores de defeitos ósseos cranianos, o que acreditava-se proporcionar um aumento da amplitude dos potencias observados na superfície. Em 1925 Berger reconhece que tais defeitos

ósseos não eram necessários e, em alguns casos, até prejudiciais à qualidade dos registros. Entre 1926 e 1929 Berger finalmente obtem registros de boa qualidade de atividade eletroencefalográfica do tipo alfa em pacientes. Tais resultados são então publicados em 1929 (Berger H, 1929), sendo essa publicação considerada a primeira descrição de registros de EEG em humanos.

Os modernos sistemas de eletroencefalografia são constituidos, de forma geral, por um conjunto de componentes básicos. Eletrodos, geralmente de pratacloreto de prata, são posicionados ao longo do escalpo utilizando-se pasta eletrolítica para que se obtenha um contato elétrico adequado com a pele. Os eletrodos são então conectados a um conjunto de pré-amplificadores que têm como objetivos principais eliminar pequenas distorções provocadas por movimentos dos cabos e aumentar a amplitude do sinal adquirido. Além disso, em geral, os circuitos pré-amplificadores possuem um estágio que filtra oscilações no potencial DC (corrente contínua) do sinal elétrico. Tais filtros são denominados filtros passa-alta, pelo fato de rejeitarem oscilações com frequências abaixo da frequência de corte (deixando passar aquelas acima dessa frequência). Tipicamente filtros passa-alta possuem frequência de corte na faixa de 0,15 a 1,5 Hz. Uma vez amplificado e filtrado o sinal pode ser conduzido por um longo cabo até o estágio final de amplificação e filtragem. Em EEGs de rotina, uma amplificação de 1000 a 10000 vezes é utilizada. Filtros passa-baixa (i.e. que rejeitam frequências acima da frequência de corte) com frequências de corte na faixa de 60 a 80 Hz eliminam ruídos indesejáveis de alta frequência, assim como filtros do tipo Notch (50 ou 60 Hz, dependendo do país) atenuam ruídos provenientes da rede elétrica. Atualmente, a maioria dos sistemas modernos de EEG possuem um último estágio onde os sinais elétricos analógicos são transformados em sinais digitais, possibilitando a
visualização dos registros em computadores pessoais. A grande importância do processo de digitalização é a possibilidade de utilização de métodos computacionais na análise dos registros de EEG e possibilitar o arquivamento dos resultados e dos registros em meio eletrônico. Além disso, sistemas de registro digital em conjunto com a aquisição de imagens digitais dos pacientes submetidos a registros prolongados são a base do video-EEG moderno (para uma revisão sobre bases tecnológicas de EEG ver Kamp (Kamp A and Lopes da Silva F, 1999)).

O EEG normal de um adulto acordado apresenta uma série de ondas que são descritas de acordo com a faixa de frequência em que elas aparecem. A faixa de frequência das ondas do EEG pode se expandir desde frequências "ultra-baixas" (abaixo de 0.15 Hz) até frequências "ultra-altas" (acima de 100 Hz), mas tais extremos aparentemente não apresentam nenhuma importância fisiológica, apesar de alguns relatos na literatura sugerirem a importância de atividade do tipo gama (acima de 30 Hz) nos processos de sincronização cerebral e a presença de ondas ultra-lentas durantes estados de coma profundo.

De uma forma geral as ondas do EEG podem ser classificadas em diversos tipos de rítmos: (a) rítmo Delta, com frequências abaixo de 3,5 Hz (tipicamente entre 0,1 e 3,5 Hz), (b) rítmo Teta, entre 4 e 7,5 Hz, (c) rítmo Alfa, entre 8 e 13 Hz, (d) rítmo Beta, entre 14 e 30 Hz e (e) rítmo Gama, com frequências acima de 30 Hz. Alguns outros rítmos têm sido propostos, com faixa de frequência semelhantes às descritas acima, mas com distribuição diferenciada ao longo da superfície encefálica. Dessa foram podemos ter rítmo Pi ou rítmo lento posterior, descrito por Dutertre (Dutertre F, 1977) sendo ondas de 3 a 4 Hz de distribuição posterior; rítmo Fi, sugerido por D. Daly (Silbert et al., 1995) para descrever ondas lentas (abaixo de 4 Hz) de distribuição posterior que ocorrem aproximadamente 2 segundos após

fechar os olhos; rítmo Kapa (rítmo tipo Alfa de distribuição temporal anterior) etc. Além disso, várias morfologias de ondas têm sido igualmente descritas: espículas de sono, ondas lâmbda, complexo K, ondas Rô etc (Niedermeyer E, 1999a).

A atividade elétrica cerebral resulta de correntes iônicas geradas por processos bioquímicos ao nível celular. Os principais responsáveis por gerar os padrões eletroencefalográficos observados são os neurônios piramidais corticais. Um dipolo é um elemento com dois sítios diametralmente opostos com cargas também opostas. Íons positivos (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) são absorvidos em uma extremidade do dipolo (também chamado de sink ou dreno) e emanam da extremidade oposta (também referida por source ou fonte). O campo elétrico ao redor de um neurônio piramidal pode ser considerado um dipolo devido à morfologia desse tipo de neurônio, possuindo um longo eixo axonal, e à polarização das conexões sinápticas que acontecem nas extremidades celulares. Potenciais pós-sinápticos (PPS) excitatórios, mais do que os potenciais de ação, são responsáveis pelas ondas registradas pelo EEG. Apesar dos potenciais de ação terem uma amplitude maior, os potenciais sinápticos são mais longos em duração e envolvem uma maior área de membrana celular, permitindo uma somação tanto temporal quanto espacial. Os potencias de ação são de 10 a 30 vezes mais rápidos do que os potenciais póssinápticos o que necessitaria um sincronismo guase perfeito entre potenciais de ação em neurônios vizinhos para que haja somação. Sincronismo e coerência temporal dos potenciais também explicam a relação entre frequência e amplitude. Ondas do tipo Delta podem durar de um guarto a meio segundo, e, mesmo que os geradores estejam de 10 a 30% fora de sincronismo, uma grande proporção dos potenciais geradores estará em relativo sincronismo contribuindo assim para gerar um potencial de grande amplitude (Gloor, 1985).

Os fatores que influenciam a amplitude, morfologia e duração das ondas do EEG são: (a) a distância entre o eletrodo de registro e o gerador de corrente, (b) a duração do potencial pós-sináptico (PPS), (c) o número de PPS simultâneos e (d) a orientação anatômica da camada de células piramidais geradoras de corrente com relação ao eletrodo (Schaul, 1998). O campo elétrico gerado pela camada de células piramidais é chamado de "campo aberto". O potencial de campo ao redor de um campo aberto diminui inversamente com a distância e pode ser, teoricamente, visualizado de qualquer ponto ao longo do volume condutor (i.e. escalpo). Na prática, os sinais registrados nos eletrodos superficiais correspondem à atividade elétrica gerada à aproximadamente 1-2 cm na profundidade do córtex adjacente. Existem, entretanto, estruturas no SNC nas quais as células e seus processos celulares não estão alinhados na forma de dipolos, sendo referidas como "campos fechados". Estruturas no tálamo e tronco cerebral geram campos fechados que não são grandes o suficiente para serem detectados por eletrodos de superfície.

Na realidade, o que observamos nos registros eletroencefalográficos são correntes propagando ao longo do espaço extracelular, que por sua vez são resultante do efeito somatório de inúmeros potenciais sinápticos excitatórios. Apesar dos geradores neurais da atividade registrada através do EEG estarem situados em sua maioria ao longo do córtex, núcleos subcorticais, em especial núcleos talâmicos, são responsáveis por gerar certos rítmos corticais (Steriade et al., 1993;Kandel and Buzsaki, 1993;Engel, Jr., 1996).

Pelo visto anteriormente, podemos inferir a dificuldade em se determinar, apenas através do EEG, se estruturas mais profundas estão apresentando atividade elétrica aumentada ou diminuída em decorrência de um processo anormal (p.e. epiléptico). Dessa forma, torna-se necessário o uso de técnicas de EEG invasivo,

com posicionamente de eletrodos na profundidade do cérebro ou de outras técnicas que forneçam dados funcionais de estruturas profundas.

Nessa última categoria, recentemente um grande número de técnicas foram desenvolvidas com o intuito de observar a atividade cerebral em áreas subcorticais de forma não invasiva, tanto num contexto clínico quanto de pesquisa. Entre outras, podemos citar as técnicas de PET (*positron emission tomography*), SPECT (*single photon emission computerized tomography*), auto-radiografia baseada em 2-Deoxi-Glicose e ressonância magnética funcional.

## 1.5) Ressonância Magnética Funcional

### 1.5.1) Histórico

Comparando-se a quase imediata utilização clínica dos raios-x, logo após sua descoberta em 1896, com os quase 40 anos decorridos entre a descrição inicial do fenômeno de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) e a aquisição das primeiras imagens clinicamente úteis, tem-se uma idéia da complexidade envolvida no desenvolvimento dessa técnica. Apesar do conceito básico da RNM ter sido incialmente proposto em 1936 pelo físico alemão C.J. Gorter (Gorter CJ, 1936), o fenômeno de ressonância magnética não foi observado em materiais em quantidades consideráveis até os trabalhos de Bloch e Purcell logo após a segunda grande guerra (Bloch F et al., 1946;Purcell EM et al., 1947). Nos anos subsequentes, RNM foi utilizada apenas em estudos de física básica e de propriedades químicas de materias, sendo a técnica aplicada apenas a amostras em tubos de ensaio. Entre o final da segunda grande guerra e o início da década de 70, apenas alguns poucos estudos de RNM foram realizados utilizando-se tecidos humanos ou animais (Singer J, 1959;Bratton CB et al., 1965;Jackson JA and Langham WH, 1968;Damadian R, 1971).

O ponto chave para a utilização da RNM na produção de imagens clinicamente úteis foi a proposta, por Lauterbur em 1973 (Lauterbur PC, 1973), de que gradientes magnéticos poderiam ser utilizados para determinar a localização espacial do sinal de RNM, sugerindo a possibilidade de se obter imagens de cortes anatômicos. Mas apenas em 1976 e 77 é que as primeiras imagens do corpo humano foram registradas na Universidade de Nottingham (Mansfield P and Maudsley AA, 1976). Apesar de várias técnicas terem sido propostas inicialmente

para a decodificação espacial dos sinais de RNM, a metodologia mais utilizada foi a da transformada de Fourier (Kumar A et al., 1975), que foi modificada do método originalmente proposto para a realização de espectrografia por RNM. A metodologia mais comum utilizada para a geração de imagens anatômicas foi denominada de *spin-warp* ou *spin-echo* (Edelstein WA et al., 1980).

Algumas das descobertas e trabalhos científicos e tecnológicos chaves que contribuiram direta ou indiretamente para o desenvolvimento da técnica de imagens por ressonância magnética (RM) clínica estão citados na tabela-02. Observando os avanços em variados campos de ciências básicas que resultaram no desenvolvimento dos aparelhos de RM, tem-se uma real idéia da complexidade da técnica.

Equações dos campos elétrico e magnético	Maxwell (1873)
Mecânica estatística dos átmos e moléculas	Maxwell (1860), Boltzmann (1872), Gibbs (1878)
Ondas de rádio	Hertz (1887)
Supercondutividade	Onnes (1911)
Estrutura atômica/núcleo atômico	Rutherford (1911)
Teoria Quântica	Bohr, Schroinger Schröinger e outros (1913-1926)
Magnetismo nuclear	Pauli (1924)
Spin	Uhlenbeck e Goudsmit (1926)
Conceitos de RNM	Gorter (1936)
RNM observada em raios atômicos	Rabi (1939)
RNM observada em sólidos e líquidos	Bloch, Purcell (1946)
Equações de relaxamento de spin (T1, T2)	Bloch (1946)
Mecanismos de relaxação de RNM	Bloembergen, Pound, Purcell (1948)
Spin-echoes	Hahn (1950)
Supercondutores de alto campo	Matthais, Kunzler (1960)
Transformada de Fourrier para RNM	Ernst, Anderson (1966)
Tomografia computadorizada de raios-x	Oldendorf (1961), Hounsfield (1973), Jackson (1968),
	Damadian (1972), Abe(1973)
Campos de gradientes magnéticos para imagens por RNM	Lauterbur (1973)
(zeugmatografia)	
Excitação seletiva de plano anatômico	Mansfield (1974), Hoult (1977)
Imagens humanas usando gradientes	Aberdeen, Nottingham, EMI (1976-1979)
Imagens humanas usando campo de grande intensidade	General Electric, Oxford Instruments (1981)
(1,5T)	
Aplicações clínicas de rotina	Vários (1980-presente)

**Tabela 02** – Alguns marcos técnicos e científicos no desenvolvimento dos aparelhos de RM (Schenck JF and Leue WM, 1998)

A RM tem sido utilizada predominantemente para o estudo anatômico do cérebro. Comparada com técnicas de imagem mais antigas, a RM é claramente superior em contraste e equivalente em resolução espacial ao Raio-X.

Entretanto, várias doenças e distúrbios neurológicos não possuem um substrato anatômico alterado visível macroscopicamente. Tais estados patológicos incluem, por exemplo, os processos isquêmicos hiper-agudos, demência e distúrbios psiquiátricos. Além disso, algumas entidades patológicas não podem ser caracterizadas apenas por alterações anatômicas associadas. Entre elas, podemos citar algumas neoplasias, particularmente após tratamento, infarto cerebral e epilepsias. Finalmente, para o planejamento cirúrgico, é frequentemente útil o estudo não só da anatomia, mas também da função dessas áreas ou de áreas proximas. Em todos os casos descritos anteriormente, a fisiologia local é de maior interesse do que a anatomia.

Ressonância Magnética Funcional (RMf) é o nome dado às técnicas de aquisição de imagens funcionais dos tecidos, usualmente cérebro, através de RNM, mantendo-se a especificidade anatômica. O termo RMf engloba várias técnicas de imagens por RNM, entre elas (a) imagens da mobilidade microscópica de moléculas de água (imagens por difusão), (b) hemodinâmica microvascular (imagens de fluxo sanguíneo e volume sanguíneo cerebral) e (c) técnicas sensíveis ao nível de oxigenação sanguíneo (também chamado de contraste BOLD – Blood Oxygenation Level Dependent). Tais técnicas dependem da aquisição de um plano anatômico em aproximadamente 100 ms, de forma a adquirir uma imagem completa do cérebro (volume) em apenas alguns segundos (tipicamente um volume completo em 2-3 segundos). Apesar dessas técnicas ainda não serem capazes de gerar imagens diretas da atividade neural, a atividade fisiológica do tecido pode ser inferida através da correlação bem estabelecida entre atividade neural, metabolismo celular, e alterações hemodinâmicas associadas (volume sanguíneo cerebral, fluxo sanguíneo cerebral, estado de oxigenação do sangue e índice de difusão de água através dos tecidos cerebrais (Roy CS and Sherrington CS, 1890)).

Como proposto ainda em 1895, as respostas hemodinâmicas cerebrais locais estão intimamente relacionadas à atividade neural (Roy CS and Sherrington CS, 1890;Petersen et al., 1988;Posner et al., 1988). Apesar da RMf ainda não ser sensível diretamente à atividade neural, alterações hemodinâmicas locais podem ser

utilizadas para se inferir o nível de atividade neural. A RMf pode detectar alterações hemodinâmicas, seja através da injeção de contraste paramagnético intravenoso (usualmente compostos a base de Gadolínio), ou através de contraste tecidual intrínseco (BOLD).

Dois mecanismos básicos de contraste tecidual intrínseco são utilizados na obtenção de imagens funcionais. O primeiro mecanismo é o chamado contraste BOLD. Esse tipo de contraste basea-se no fato descrito por Linus Pauling (Pauling L and Coryell C, 1936) de que a deoxi-hemoglobina é paramagnética, enquanto a oxi-hemoglobina perde o paramagnetismo, sendo, desta forma, diamagnética. Thulborn e col. (Thulborn et al., 1982) demonstraram o efeito paramagnético da deoxi-hemoglobina encurtando o valor de T<sub>2</sub> (vide próximo tópico – princípios físicos de RM), o que, em última análise, leva à uma diminuição da intensidade do sinal de RNM em áreas com uma maior concentração relativa de deoxi-hemoglobina. Tal fenômeno já era conhecido dos neurorradiologistas como a causa de áreas hipo-intensas em imagens de ressonância de pacientes que sofreram hemorragia cerebral. Ogawa e col. (Ogawa et al., 1990) propuseram então a utilização desse contraste hemodinâmico intrínseco para a obtenção de imagens funcionais através da técnica de imagens por *gradient-echo* (GE).

### 1.5.2) Princípios Físicos de RM

De uma forma geral, todos os átomos que possuem número impar de prótons em seu núcleo podem apresentar o fenômeno de ressonância magnética. Como os organismos biológicos são compostos em grande parte por água, que por sua vez possui dois átomos de hidrogênio em sua molécula, a maioria dos experimentos e

das técnicas de ressonância nuclear magnética utilizam-se dos núcleos de hidrogênio (um proton em seu núcleo) para gerar os sinais.

De forma simplificada, podemos considerar os átomos de hidrogênio como minúsculos peões, apresentando movimentos de rotação e precessão em torno de seu próprio eixo. Ao posicionarmos átomos de hidrogênio dentro de um campo magnético (B<sub>0</sub>), os eixos de rotação desses átomos, chamados de spin, sofrerão um processo de alinhamento com esse campo magnético. Parte dos spins se alinharão no mesmo sentido do campo magnético enquanto que uma parte ligeiramente menor se alinhará em sentido oposto. Dessa forma, teremos como resultante um diminuto vetor de mesma direção e sentido que o campo magnético principal. Os átomos de hidrogênio estarão então alinhados com o campo magnético e realizando movimentos de precessão com uma frequência que é diretamente proporcional à magnitude do campo magnético principal, frequência essa chamada de frequência de Larmor. Para se ter uma idéia, nos modernos aparelhos de ressonância magnética, a magnitude do campo magnético principal é, em geral, de 1.5 a 3 Tesla (em comparação com o campo magnético da terra que é de aproximadamente 2,0 x  $10^{-5}$  T ou 0.2 gauss).

Consideremos agora que um pulso de rádio-frequência (RF) seja aplicado perpendicularmente à esse vetor de spins resultante, com frequência igual a frequência de Larmor. O que observamos é que os spins gradualmente saem de seu estado de "repouso" em alinhamento com o campo magnético adquirindo uma orientação perpendicular ao mesmo. Além disso, os átomos de hidrogênio em ressonância com o pulso de RF estarão realizando movimento de precessão em sincronia (dizemos que os spins estão em coerência de fase). Nessa situação, os átomos de hidrogênio acumularam energia, estando em um estado de equilíbrio

instável que é mantido pelo pulso de RF. Uma vez retirado o pulso de RF, os spins retornarão rapidamente ao estado de repouso inicial, alinhados com o campo magnético principal, emitindo, nesse processo, energia em forma de RF, proporcional à energia absorvida na primeira fase do processo. Esse sinal de RF é utilizado na geração das imagens.

No processo de realinhamento, dois tempos podem ser descritos. O primeiro tempo, denominado tempo de relaxamento spin-latice (relaxamento longitudinal) ou  $T_1$ , é o tempo gasto pelo conjunto de spins para voltar à situação de equilíbrio inicial. O segundo tempo, chamado de relaxamento spin-spin (relaxamento transverso) ou  $T_2$ , é o tempo gasto para que os spins percam a coerência de fase, ou seja, é o tempo gasto para que ocorra uma completa defasagem dos spins. O processo de retorno ao estado de equilíbrio é influenciado pela inomogeneidade do campo magnético e pelas interações entre spins vizinhos e entre spins e o meio. Dessa forna, átomos de hidrogênio presentes em tecidos diferentes, apresentarão diferentes tempos  $T_1$  e  $T_2$ . Essa diferença é o que proporciona o contraste natural entre diferentes tipos de tecido.

Para que seja possível a obtenção de imagens do corpo, é necessário que algum tipo de decodificação espacial seja empregada. Como a frequência de oscilação dos spins de um mesmo tipo de átomo depende do campo magnético ao qual tais átomos estão sujeitos, pequenas variações controladas no campo magnético resultarão em grupos de spins com frequências discretamente diferentes. Dessa forma, para se conseguir uma decodificação espacial aplicam-se gradientes magnéticos nos três eixos ortogonais de forma a controlar a frequência e a fase dos spins em diferentes posições do corpo. O sinal medido pode ser então analisado através da Transformada Rápida de Fourrier (FFT) revelando os componentes em

frequência do sinal, que serão proporcionais a quantidade de átomos de hidrogênio oscilando em cada frequência específica.

O processo de manipulação dos spins para obtenção de imagens pode ser traduzido em diferentes sequências de imagens. As duas sequências de imagens mais utilizadas são as chamadas *spin-echo* (SE) e *gradient-echo* (GE). De forma bem simplificada as técnicas de SE utilizam-se de pulsos de RF para realinhar os spins dos átomos de hidrogêneo, manipulando assim a forma com que os tecidos liberam a energia, também chamado de decaimento de indução livre (*free induction decay* ou FID), enquanto as técnicas de GE utilizam-se de gradientes magnéticos para obter o FID.

No processo de aquisição das imagens de ressonância magnética, duas variáveis de tempo irão determinar o tipo de contraste a ser obtido nas imagens: são eles TR (tempo de repetição) e TE (tempo de eco). TR é o intervalo de tempo entre duas estimulações consecutivas de um mesmo grupo de átomos. TE é o tempo gasto entre a estimulação de um determinado grupo de átomos e a aquisição do FID. Variando-se esses valores podemos obter imagens com diferentes tipos de contraste. Por exemplo, TR longos, possibilitam que todos os spins retornem ao estado inicial de equilíbrio, resultando assim num número maior de spins suscetíveis a estimulação e, consequentemente, em uma maior amplitude do sinal. Em contraste, longos TE resultam em registro do FID em um ponto onde a maior parte do sinal já foi emitido pelos átomos de hidrogênio, resultando em um sinal de menor intensidade.

Existem três tipos básicos de contraste: (a) imagens sensíveis a  $T_1$ , onde temos TR médio e um TE curto, (b) imagens sensíveis a  $T_2$ , onde temos TR e TE longos, e (c) imagens de densidade de prótons, com TR muito longo e TE curto. Em

geral, as imagens de GE, dependendo dos parâmetros de aquisição, são mais suscetíveis às inomogeneidades do campo magnético principal. Dizemos que tais técnicas produzem imagens com reforço em  $T_2^*$ .

Quando duas substâncias com constantes magnéticas significativamente diferentes são separadas por uma interface bem definida (p.e. sangue na superfície do córtex), observamos uma perda de sinal devido a um aumento da inomogeneidade do campo magnético entre essas duas substâncias. Esse fenômeno é chamado de artefato de susceptibilidade, pois as duas substâncias possuem diferentes susceptibilidades magnéticas.

### 1.5.3) Contraste BOLD

Por que o estado de oxigenação local, e por sua vez o sinal de RNM, aumentam em decorrência do aumento da atividade neural local?

Estudos de PET e outras técnicas (p.e. fluxometria doppler de infra-vermelho), mostraram que a liberação de oxigênio, o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) e o volume sanguíneo cerebral (VSC) aumentam com o aumento da atividade neural local, observando-se um aumento quase que duas vezes maior do FSC em relação ao VSC (Grubb, Jr. et al., 1974). Entretanto, observa-se, pelo menos na maioria dos paradigmas experimentais, uma desproporção entre o aporte e o consumo de oxigênio, com um aumento apenas discreto do consumo (DeYoe et al., 1994;Fox and Raichle, 1986;Fox et al., 1988). O aumento no aporte de oxigênio, sem que haja um aumento substancial do consumo, com um aumento apenas discreto do VSC, leva a uma diminuição relativa da deoxi-hemoglobina tecidual local durante períodos de aumento da atividade neural. Essa diminuição relativa da deoxi-hemoglobina leva a um aumento da intensidade do sinal de RNM em sequências de imagens sensíveis

a variações de sucetibilidade magnética (i.e. imagens em  $T_2$  e  $T_2^*$  - Figura-02) (Kwong et al., 1992).



Figura 02 – Bloco esquemático explicando os mecanimos do contrate do tipo BOLD(DeYoe et al., 1994).

A atividade neuronal focal, através do acoplamento neurovascular, leva a uma interação complexa entre fluxo sanguíneo, volume sanguíneo e consumo de oxigêneo, o que, em última instância determina a intensidade do sinal medido. O resultado final desse processo é uma variação discreta (alguns pontos percentuais a 1,5T), mas prolongada do sinal de RM, em técnicas sensíveis a variações de susceptibilidade (p.e. imagens de *gradient-echo/echo-planar* – GE/EPI; contraste do tipo BOLD). Chamamos de função de resposta hemodinâmica (FRH) a curva de

variação de intensidade do sinal observada em decorrência da resposta hemodinâmica induzida por uma tarefa específica.

O mecanismo preciso de relação entre atividade neuronal e as alterações observadas no contraste do tipo BOLD continuam em debate (Arthurs and Boniface, 2003;Hyder et al., 2002a;Shulman et al., 2002;Aubert and Costalat, 2002a;Hess et al., 2000;Logothetis and Wandell, 2004). Prováveis candidatos incluem potenciais de ação (atividade neuronal individual) e atividade sináptica de uma população de neurônios, sendo que as evidências mais fortes apontam para potenciais póssinápticos como os principais responsáveis (Logothetis and Wandell, 2004).

Fica claro, dessa forma, que a interpretação dos resultados da análise de imagens obtidas por métodos sensíveis ao contraste do tipo BOLD deve ser feita de forma cuidadosa. Além disso, a correlação dessas imagens com medidas objetivas de variáveis fisiológicas (p.e. eletroencefalografia) acrescentaria significado aos resultados observados, devendo ser perseguido de forma a validar os dados obtidos por neuroimagem funcional e optimizar a forma que essas imagens são interpretadas.

#### 1.5.4) Análise de Imagens de RMf

O que se obtem após a realização de um experimento ou exame de RMf é uma série de imagens digitais compostas por uma matriz de valores que representam a intensidade de cada ponto da imagem (ou pixels – *picture elements*). Voxels (volume elements) são a representação tridimensional dos pixels, sendo a terceira dimensão (i.e. espessura), correpondente à espessura dos planos anatômicos obtidos pelo processo de aquisição de imagens. O objetivo da análise de imagens é detectar variações estatisticamente significativas nos valores de voxels

localizados na mesma posição dentro de matrizes de imagens correspondentes (i.e. mesmos planos anatômicos), variações estas que devem ocorrer de acordo com o conjunto de tarefas às quais o indivíduo foi submetido (chamamos ao conjubto de tarefas de paradigmas).

Antes da realização dos testes estatísticos, entretanto, as imagens devem passar por um pré-processamento que visa aumentar o poder estatístico das análises. Os passos básicos do pré-processamento são: (a) realinhamento de imagens, que tem por objetivo corrigir movimentos, que são inevitáveis durante a realização das imagens, (b) suavização, ou *smoothing*, processo no qual valores de voxels vizinhos são combinados entre si (média, mediana etc), com os objetivos de diminuir a presença de "ruído" nas imagens (p.e. se um voxel apresenta um valor muito alto ou muito baixo em relação aos voxels vizinhos, é provável que essa discrepância seja devida a ruídos inerentes ao aparelho. Combinando-se esse voxel com os seus vizinhos, faremos com que seu valor se aproxime dos valores dos demais voxels) e, dependendo do tipo de análise estatística utilizada, fazer com que os valores das intensidade dos pixels tenham uma distribuição gaussiana, e (c) normalização, que consiste em transformar as imagens de um indivíduo em uma imagem padrão, o que permite que vários indivíduos sejam comparados entre si.

Após pré-processamento, as imagens estão prontas para o tratamento estatístico. De uma forma geral, a maioria das técnicas de tratamento estatístico de imagens de RMf baseam-se em alguns pressupostos. Inicialmente, conhecendo-se o paradigma de estimulação podemos inferir a variação esperada do valor dos voxels em áreas onde se suspeita a ocorrência de ativação (ou inativação) de acordo com a tarefa realizada e a FRH. Aqueles voxels nos quais as variações de intensidade ocorram de acordo com o previsto no modelo estatístico e que obedeçam ao limiar

de significância definido, serão considerados como estatisticamente significativos (dependendo do nível de significância estatística do teste). Em seguida, cada voxel é codificado, através de padrões de cores por exemplo, de acordo com o poder estatístico da correlação, resultando assim num mapa de ativação. Finalmente, uma imagem do mapa de ativação é sobreposta à uma imagem de alta resolução do plano anatômico correspondente. A Figura-03 apresenta, de forma esquemática, uma síntese do processo de análise de imagens.



Espaço de "Talairach"

**Figura 03** – Bloco esquemático resumindo os passos principais do processo de análise de imagens (vide texto – Modificado do manual do usuário do aplicativo SPM99<sup>f</sup>).

<sup>&</sup>lt;sup>f</sup> Wellcome Department of Cognitive Neurology. Institute of Neurology. UCL. Reino Unido

### 1.5.5) RMf e Epilepsias

A utilização das imagens de RMf no estudo e na avaliação clínica de pacientes epilépticos encontra-se atualmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, mas constitui-se em promessa de ferramente poderosa para o futuro. Os grandes desafios na utilização de RMf em epilepsia são a dificuldade em se obter imagens no período ictal, devido aos inevitáveis artefatos de imagens produzidos por movimento do paciente (ou do animal no contexto de pesquisa), na dificuldade em se determinar quando o paciente apresenta atividade EEGráfica interictal epileptiforme e na baixa resolução temporal da técnica (da ordem de 3-5 segundos, intrínseca à resposta hemodinâmica) (Ogawa et al., 1990). Entretando, algumas das capacidades da técnica são a excelente resolução espacial (da ordem de frações de milímetros em scanners [i.e. aparelhos de RM] mais modernos de maior potência, i.e. B<sub>0</sub>>3T), ser não invasiva e possibilitar estudo seriado de pacientes (ou de outro modelo experimental) por não utilizar radiação ionizante.

A grande promessa de utilização da técnica de RMf é na avaliação précirúrgica de pacientes portadores de epilepsia refratária aos tratamentos farmacológicos padrão. Nesses pacientes, a RMf pode ser usada na determinação de lateralidade de linguagem, de funções motora-sensoriais e, com menor precisão, de memória, auxiliando assim na localização de áreas eloquentes que devem ser poupadas durante o procedimento cirúrgico. Outra possibilidade é a identificação do foco epileptogênico, possibilitando um melhor delineamento da área a ser ressecada.

Um dos grandes desafios no desenvolvimento da RMf nos estudos das epilepsias está na substituição do teste do Amital Sódico (teste de Wada). Tal técnica consiste em anestesiar seletivamente um hemisfério cerebral por vez,

possibilitando aferir a lateralização de funções de linguagem e memória. Atualmente, tal procedimento é o padrão-ouro na avialiação pré-cirúrgica de pacientes epilépticos, mas devido ao grau de invasividade e aos possíveis riscos da técnica, grande esforço tem sido direcionado no desenvolvimento de paradigmas capazes de gerar respostas sensíveis e específicas nas imagens de RMf.

A utilização de RMf na localização de áreas motoras e sensoriais em pacientes em avaliação pré-cirúrgica constitui um grande avanço em relação às metodologias padrão (i.e. eletrocorticografia e teste do amital). RMf é capaz de localizar com grande precisão áreas atividadas por tarefas motoras e sensoriais, de forma reprodutiva e não invasiva, possibilitando que o cirurgião tenha uma visão tridimensional das áreas eloquentes. Atualmente, a técnica padrão para o mapeamento de áreas eloquentes é o uso do eletrocorticograma (ECoG) intra-cirúrgico, técnica que se utiliza de eletrodos posicionados na superfícies cortical, necessitando-se que o paciente permaneça consciente para que possa realizar tarefas motoras enquanto se colhe o registro da atividade elétrica cerebral (Quesney LF and Niedermeyer E, 1999). Apesar da grande resolução temporal dessa técnica, deve-se salientar a invasividade, sendo realizada apenas durante o ato cirúrgico, e o estresse ao qual o paciente é submetido, tendo de ser mantido consciente durante o procedimento. Nesses casos a avaliação através de imagens de RMf desponta como uma alterantiva atraente.

Atualmente a capacidade da RMf em determinar a lateralização da linguagem é de uma forma geral aceita, e vários artigos recentemente abordaram tal assunto, propondo vários paradigmas para a avaliação dos diversos aspectos do processo de linguagem (Deblaere et al., 2002;Adcock et al., 2003).

Com relação à avaliação da lateralização da memória, a validação da RMf ainda depende do desenvolvimento de paradigmas robustos, capazes de desencadear respostas reprodutíveis relacionadas aos diversos aspectos do processo de aquisição e recuperação de memória (Akanuma et al., 2003). Entretando, considerando-se a relativa inespecificidade do Teste de Wada na determinação da lateralização de memória, acredita-se ser apenas uma questão de tempo para que o mesmo seja completamente substituido pela RMf.

Finalmente, um dos aspectos mais promissores da técnica de RMf é a identificação do foco epileptogênico. Existem basicamente três formas de se realizar RMf para a localização do foco epileptogênico: (a) realização de RMf em pacientes com crises focais clínicas frequentes, até que um número suficiente de disparos seja observado durante a aquisição de imagens, (b) provocando-se as crises em pacientes portadores de epilepsia reflexógena, durante a aquisição de imagens e (c) correlacionando atividade epileptiforme registrada através de EEG contínuo ou intercalado com as imagens de RMf.

Por não fornecerem uma indicação direta das alterações elétricas cerebrais em decorrência da atividade epileptiforme, as duas primeiras técnicas são de pouca utilidade. Para que seja possível uma correlação real entre atividade elétrica e RMf, é desejável que se obtenham registros de EEG de boa qualidade simultâneos à aquisição das imagens funcionais. Tal tópico será abordado a seguir.

## 1.6) EEG e RMf

A grande vantagem em se associar duas técnicas, tais como EEG e RMf, para se estudar atividade cerebral espontânea e alterações dessa atividade basal secundária ao uso de drogas ou outros tipos de condições, está em se aproveitar as potencialidades de cada uma das técnicas, numa tentativa de suprir as fraquezas de cada técnica isoladamente.

Dessa forma, a promessa da associação entre EEG e RMf é a de fornecer uma técnica que possua grande resolução tanto espacial quanto temporal. Dados fornecidos pelos registros de EEG podem ser utilizados para estabelecer quando determinado tipo de atividade (p.e. complexos ponta-onda isolados em meio a EEG basal normal) ocorre, ditando assim a forma como as imagens de RMf serão analisadas (determinando o paradigma que irá orientar a análise estatística). Por outro lado, dados da RMf servem para restringir as possíveis soluções existentes para o cálculo dos geradores de atividade eletroencefalográfica, permitindo assim que se determine o foco através da análise do EEG.

Entretando, a realização de registros elétricos simultâneos à aquisição de imagens de RM é uma tarefa técnica das mais complexas.

Os problemas técnicos de se registrar atividade elétrica dentro de um aparelho de ressonância magnética, podem ser divididos em três categorias: (a) segurança do paciente, (b) efeitos do sistema de EEG sobre as imagens de RM e, (c) efeitos do aparelho de RM sobre o sistema de EEG.

Além dos problemas básicos inerentes a qualquer tipo de exame de RM (i.e., problemas com objetos metálicos magnéticos dentro do aparelho de RM, risco de vida para pacientes portadores de marca-passos e de próteses metálicas

magnéticas), outros aspectos da segurança devem ser levados em conta ao se realizar registros eletrofisiológicos dentro de um aparelho de RM. Existem, basicamente, dois tipos de risco. Inicialmente, o pulso de RF utilizado para se defletir os spins dentro do corpo do paciente, podem também induzir correntes elétricas nos eletrodos de EEG/ECG/EMG, levando assim a queimaduras. Outra fonte potencial de risco de queimadura são os campos de gradientes magnéticos. Sabemos, pela Lei de Faraday, que em todo corpo condutor submetido a um campo magnético variável, teremos uma corrente induzida que é proporcional à área transversal desse corpo condutor exposta ao campo magnético e à intensidade desse campo magnético. Apesar do risco real, a utilização de simples resistores entre os eletrodos e os pré-amplificadores é suficiente para eliminar o problema. Além disso, o uso de pré-amplificadores alimentados à pilha e a conexão dos mesmos ao sistema de registro através de cabos de fibra óptica, diminuem ainda mais os riscos ao paciente (Lemieux et al., 1997).

O impacto do sistema de registro de eletrofisiologia sobre o aparelho de RM é observado basicamente na qualidade das imagens obtidas na presença de eletrodos e de equipamentos eletrônicos dentro do aparelho de RM. Eletrodos metálicos produzem uma diminuição do sinal de RM por efeito de susceptibilidade magnética, isto é, diminuindo a homogeneidade do campo magnético local, ou através da absorção de energia de RF (tanto na fase de deflecção dos spins quanto na fase de detecção do sinal induzido nos tecidos). Dessa forma, dependendo do tipo de material utilizado nos eletrodos, poderemos obter imagens completamente comprometidas por esses artefatos de imagem. Outra fonte de artefatos de imagens está nos circuitos eletrônicos utilizados para se registrar eletrofisiologia. Se tais circuitos emitirem sinais de rádio-frequência em uma faixa de frequência que

coincida com a frequência de utilização do aparelho de RM (frequência de Larmor), as imagens resultantes apresentarão artefatos na forma de linhas horizontais ou verticais. Esses artefatos resultam da captação, pelo aparelho de RM, dos sinais de RF produzidos pelos circuitos eletrônicos dos equipamentos de eletrofisiologia. Outra possível fonte de artefatos de RF são cabos de conexão interligando o interior da sala do scanner com o exterior. Tais cabos, funcionando como antenas, podem conduzir sinais de RF do lado de fora para o lado de dentro da sala do scanner, resultando nos artefatos de RF descritos anteriormente. De uma forma geral, esses problemas são resolvidos através da utilização de eletrodos adequados, blindagem dos circuitos eletrônicos, cabos de fibra de carbono, conexão via fibra óptica e uso de aparelhos alimentados a pilha.

Finalmente, o problema técnico mais importante e de mais difícil solução é a interferência do processo de aquisição de imagens nos registros de eletrofisiologia. Essa interferência é observada na forma de artefatos nos registros eletrofisiológicos, que podem ser decorrentes de vários processos: (a) movimento dos cabos de registro dentro do campo magnético do aparelho de RM (segundo a lei de Faraday), (b) pequenas oscilações dos eletrodos decorrentes de pulsação sanguínea (também conhecidos como "balistocardiogramas") e (c) correntes induzidas pelos gradientes magnéticos durante o processo de aquisição das imagens.

As primeiras tentativas de se registrar EEG dentro de um aparelho de RMf foram feitas por lves e col., em 1993 (lves et al., 1993). Nesse trabalho eles descrevem modificações realizadas no sistema de registro de EEG para que as imagens de RMf não fossem afetadas por artefatos provenientes do mesmo, preocupando-se apenas com o registro de EEG entre aquisições de imagens para o controle fisiológico dos pacientes.

Em 1995, Bush e col. (Busch et al., 1995) descreveram a utilização de eletrodos de calomel para o registro de potenciais DC e EEG em animais durante estudos de RM.

Warach e col. (Warach et al., 1996) descreveram, em 1996, técnica para aquisição de RMf utilizando-se o sinal do EEG para iniciar a aquisição das imagens (RMf gatilhada por EEG). Com o sistema descrito, eles conseguiram obter imagens de boa qualidade, que mostraram, em dois pacientes portadores de epilepsia, áreas ativadas no cérebro (contraste BOLD) em concordância com atividade epileptiforme observada ao EEG.

Em 1997, Lemieux e col. (Lemieux et al., 1997) descreveram os riscos para pacientes submetidos a aquisição de EEG dentro do aparelho de RM, bem como os procedimentos para a aquisição segura.

Em 1998, Muri e col. (Muri et al., 1998) descreveram o registro de RMf e potenciais evocados visuais simultaneamente. Registros de potenciais visuais foram obtidos através de processo de promediação, onde a média de vários registros é calculada, resultando na rejeição de sinais aleatórios e reforço dos sinais acoplados ao estímulo. Técnica de promediação foi também utilizada para a remoção de artefatos de balistocardiograma.

Allen e col. (Allen et al., 1998) estudaram os artefatos de pulso (AP), artefatos correlacionados ao fluxo sanguíneo, presentes no EEG de pacientes posicionados dentro do aparelho de RM, na ausência dos gradientes magnéticos. Após o estudo da distribuição dos AP nos canais de EEG e da característica espectral desses sinais, os autores propuzeram metodologia, através de programa de computação, para a remoção desse tipo de artefato.

Em 1999, Felblinger e col. (Felblinger et al., 1999) descreveram metodologia para remoção de artefatos provocados por gradientes magnéticos em registros de ECG. Apesar da metodologia ter sido descrita originalmente para registros eletrocardiográficos, os autores sugeriram que a mesma metodologia poderia ser utilizada para outros tipos de registro eletrofisiológico, incluindo EEG. Tal metodologia basea-se na aquisição de um sinal proveniente do aparelho de RM, que informa a um programa de computação o exato momento em que cada gradiente (x, y ou z) é ativado. Com esses dados, o programa produz um modelo esperado dos artefatos para cada canal, subtraindo o mesmo do sinal de ECG.

Bonmassar e col. (Bonmassar et al., 1999), descreveram metodologia para registro simultâneo de EEG/Potenciais Evocados e RMf, utilizando 64 canais de EEG para criar um filtro espacial, através de programa de computação. Após aplicação desse filtro, os sinais resultantes eram limpos o suficiente para permitir a obtenção de potenciais evocados visuais. Além disso, áreas ativadas mostradas nas imagens de RMf estavam de acordo com os potenciais visuais evocados registrados no EEG.

Sijbers e col. (Sijbers et al., 1999) descreveram metodologia para remoção de artefatos de gradiente de registros de EEG, através da utilização de redução adaptativa de ruído. Os autores mostraram preservação adequada dos componentes de frequência, através de análise espectral (FFT) do EEG filtrado pela técnica proposta.

Baunmann e col. (Baumann and Noll, 1999) descreveram a confecção de um capacete de EEG com 64 eletrodos. Utilizando-se de análise de imagens de fantasma (esfera preenchida com água/sulfeto de cobre), eles estudaram o impacto de diferentes componentes do capacete nas imagens de RM, substituindo aqueles

componentes que produziam artefatos. Esse processo de substituição de componentes resultou em imagens com perda apenas discreta de sinal.

Logothetis et col. (Logothetis et al., 1999) descreveram o primeiro registro simultâneo de RMf e EEG unitário e multiunitário em primatas. Os autores utilizaramse de três bobinas posicionadas ortogonalmente como sensores de campo magnético, sendo o sinal gerado por elas usado para eliminar os artefatos de gradientes dos sinais de EEG.

Allen e col. (Allen et al., 2000), descreveram um sistema de registro de EEG destinado a aquisição de sinais elétricos dentro do aparelho de RM, durante aquisição de imagens. Tal sistema foi baseado na construção de pré-amplificador, filtro passa alta e estágio amplificador final capaz de registrar, com boa resolução e sem saturação, tanto os diminutos sinais de EEG quanto os artefatos induzidos pelos gradientes magnéticos. Os sinais registrados foram então digitalizados e programa de computação foi desenvolvido para a eliminação dos artefatos de gradientes. O algoritmo de subtração de artefatos baseou-se na aquisição da média dos artefatos magnéticos (por processo de promediação) e subsequente subtração do mesmo do sinal registrado. Em seguida, algorítmo de redução adaptativa de ruído foi utilizado para filtrar artefatos remanescentes (principalmente balistocardiograma).

Kruggel e col. (Kruggel et al., 2000) descreveram metodologia para aquisição de potenciais evocados visuais intercalados com aquisição de imagens de RM (GE/EPI). Os autores analisaram o impacto do EEG sobre as imagens de RMf e vice-versa e descreveram metodologia para minimizar esse efeitos de forma efetiva, através de modificações no equipamento de EEG e de filtragem *post hoc* dos sinais de EEG.

Van Audekerkea e col. (Van Audekerkea et al., 2000) construiram um sistema para aquisição de EEG e RMf simultaneamente em ratos anestesiados. Esse sistema baseou-se no uso de bobinas de RF de superfície associadas com eletrodos de fibra de carbono para a aquisição de EEG de superfície. A metodologia utilizada para remoção de artefatos do EEG foi a descrita por Sijbers e col. (Sijbers et al., 1999) baseada no uso de redução adaptativa de ruídos.

Hoffmann e col. (Hoffmann et al., 2000) descreveram metodologia de filtragem baseada na análise espectral, para a remoção de ruídos provenientes dos gradientes magnéticos em imagens do tipo eco-planar (EPI). Essa metodologia baseou-se no fato de que os artefatos elétricos induzidos pelos gradientes se restringem a faixas estreitas de frequência e suas harmônicas. A partir desse princípio um algorítmo de reconhecimento dessas frequências foi utilizado resultando na subsequente subtração dessas frequências do sinal de EEG. Apesar do comprometimento de alguns componentes de frequência, tal metodologia resultou em registros limpos com preservação morfológica, possibilitando a identificação adequada de atividade epileptiforme (i.e., poli-pontas, ponta-ondas etc).

Goldman e col. (Goldman et al., 2000), descreveram sistema de aquisição de EEG e RMf simultâneos, com especial atenção à confecção de capacete de eletrodos baseado em cabos de fibra de carbono dispostos em pares trançados, de forma a diminuir os espaços livres entre cabos, obtendo assim uma redução significativa dos artefatos magnéticos. A metodologia utilizada para remoção de artefatos do EEG foi bastante simples, baseada na substituição de trechos de EEG afetados por artefatos provenientes do aparelho de RM por zeros (foi utilizada sequência de imagens intercaladas por período de silêncio – método intercalado –

baseado em GE/EPI), e na substração da média dos artefatos de balistocardiogramas do sinal de EEG.

Lemieux e col. (Lemieux et al., 2001) descreveram a realização de EEG e RMf simultâneos em paciente epilépticos, correlacionando atividade epileptiforme espontânea com as imagens funcionais, sendo capazes de produzir um mapa de ativação mostrando o foco epileptogênico. Tal foco foi demonstrado estar de acordo com dados derivados de localização de gerador através do EEG, confirmando a utilidade da metodologia na localização de foco em pacientes epilépticos.

Vários outros artigos foram publicados recentemente descrevendo, basicamente, métodos para aumentar a eficácia dos processos anteriormente propostos. Salek-Haddadi e col. (Salek-haddadi et al., 2003) publicaram excelente revisão sobre aquisição simultânea de EEG e RMf abrangendo todos os aspectos metodológicos.

### 1.7) Considerações Preliminares

A idéia da realização dessa tese de doutorado surgiu de resultados obtidos durante meus trabalhos de mestrado onde sentimos a necessidade do desenvolvimento de técnica capaz de observar o funcionamento de áreas específicas do cérebro, com resolução espacial suficiente para distinguir diferentes estruturas e núcleos no cérebro do nosso modelo experimental (ratos), em resposta a drogas epileptogênicas.

A realização de estudos eletrofisiológicos, apesar de sua grande resolução temporal, carece de resolução espacial adequada. Daí a idéia da utilização de ressonância magnética funcional para avaliar os efeitos de drogas epileptogênicos em modelos animais de epilepsia.

Não é nosso intuito, entretanto, advogar que a RMf seja um substituto completo de técnicas de eletrofisiologia, mas sim, um complemento visando aumentar a resolução espacial do EEG. Além disso, estudos de RMf, como veremos ao longo dessa tese de doutorado, fornecem um indicativo de quais áreas estão envolvidas em determinados processos cerebrais, sendo essas áreas, candidatas ao implante de eletrodos de EEG profundo. Dessa forma, inicialmente correlacionamos os dados de EEG superficial com as imagens de ativação hemodinâmica por contraste BOLD da RMf para escolhermos as áreas candidatas a posterior estudo detalhado por EEG invasivo.

Grande parte do tempo gasto na realização dessa tese foi dedicado ao aprendizado de técnicas de neuroimagem funcional por ressonância magnética, técnica essa completamente nova para mim e ainda inexistente no Brasil em pesquisa básica e apenas em seus estágios iniciais em ambiente clínico.

Um tempo ainda maior foi necessário, uma vez dominadas as técnicas de aquisição de RMf convencional, para que a técnica de aquisição de EEG simultâneo pudesse ser desenvolvida ao ponto de utilização simples e confiável, tendo sido esse um dos objetivos principais dessa tese de doutorado.

Nosso foco de interesse, ao determinarmos e desenharmos os protocolos experimentais, foi voltado para as alterações pré-ictais identificáveis nos modelos experimentais utilizados. Em estudos pilotos com o modelo de picrotoxina, observamos, em 100% dos animais, resposta eletrodecremental precedendo o início da atividade epileptiforme. Esse mesmo tipo de resposta pôde ser observada em nossos trabalhos de mestrado com a utilização de toxina escorpiônica (dados não publicados) que possui mecanismo de ação completamente diferente da picrotoxina (retardo da inativação de canais de sódio versus inibição GABAérgica) e em outros modelos animais de epilepsia, como por exemplo, o modelo de injeção sistêmica de Pilocarpina (Fisher RS, 1989). Considerando-se o grande número de trabalhos na literatura dedicados à tentar predizer o acontecimento de crises epileptiformes através da análise do EEG (Lehnertz et al., 1999;Lehnertz et al., 2003;Litt and Echauz, 2002), acreditamos ser a área de estudo de alterações pré-ictais essencial para um melhor entendimento dos mecanismos epileptogênicos e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas.

Decidimos manter, ao longo do texto, o original em inglês de alguns termos técnicos referentes ao método de neuroimagem. Acreditamos que isso facilitará ao leitor por ocasião de consulta à literatura científica sobre esse assunto.

# 1.8) Considerações Éticas Sobre Experimentação Animal

Procuramos observar, durante a realização dos protocolos experimentais, os padrões internacionais quanto à utilização de animais em pesquisa: "3R's – *Replace, Reduce and Refine*" com o mínimo de sofrimento animal possível. (para regulamentação sobre cuidado animal em pesquisa ver http://grants.nih.gov/grants/policy/regulatoryburden/animalcare.htm).

Pensando nisso, realizamos grupos experimentais com o menor número possível de animais, o suficiente para a realização confiável das análises estatísticas. Extraímos, de cada procedimento experimental, a maior quantidade de dados observáveis e passíveis de análise.

Os processos de sacrifício (i.e. deslocamento de coluna cervical ou guilhotina) utilizados em nossos trabalhos são rápidos e provocam sofrimento relativamente pequeno, além de serem amplamente empregados em trabalhos científicos internacionais.

Os animais foram sempre mantidos em gaiolas limpas, com acesso livre a comida e água, com ciclo claro e escuro fisiológico e controlado. O ambiente foi mantido com baixo nível de ruídos e com ventilação e temperatura controladas de forma a induzir o menor estresse possível e permitir condições adequadas de vida.

Cuidados com o manuseio também foram tomados, de forma a estressar o mínimo possível os animais e minimizar o desconforto dos mesmos.

Ambiente de absoluto respeito à vida animal foi e é cultivado em nosso Laboratório, de forma a conscientizar todos os componentes de nossa equipe sobre a importância dos cuidados com os animais. Seminários ministrados por veterinários

e cursos de bioterismo e cuidado animal fazem parte do treinamento das pessoas vinculadas ao Laboratório.

Finalmente, todos os trabalhos foram realizados sob a licença pessoal número 70/18068 e licença de projeto número 70/5831, emitidas pelo *Home Office* do Reino Unido, sendo todos os procedimentos experimentais aprovados de acordo com o *Animals (Scientific Procedures) Act 1986* (Reino Unido).

# 2 – Objetivos

a) Desenvolver metodologia para aquisição simultânea de EEG e RMf em modelos animais de epilepsia, com as seguintes características:

- 1 Sistema robusto, capaz de manter funcionamento confiável durante extenso período de tempo e resistente à manipulação constante;
- 2 Baixo custo tanto de produção quanto de manutenção;
- 3 Fácil contrução, utilizando-se componentes comuns e amplamente disponíveis no mercado;
- 4 Flexível, podendo ser utilizado para a realização de outros tipos de registro eletrofisiológicos (p.e. EMG, ECG, PE) e em ambiente clínico.

 b) Validar a técnica desenvolvida no modelo animal de epilepsia por injeção intraperitoneal de Pilocarpina;

c) Estudar o modelo animal de epilepsia induzida por Picrotoxina utilizando a metodologia de EEG e RMf;

 d) Avaliar as áreas com respostas positivas e negativas nas imagens de RMf através de EEG profundo;

e) Comparar as respostas obtidas nos experimentos de RMf nos dois grupos.

## 3 – Grupos Experimentais

## 3.1) Aquisição Simultânea de EEG e RMf

### 3.1.1) Considerações Preliminares

Como descrito anteriormente na introdução desse trabalho, várias técnicas para aquisição e filtragem de sinais de EEG adquiridos simultaneamente a imagens de RMf foram descritas, cada qual com vantagens, desvantagens e aplicações específicas. Entretanto, poucos grupos se dedicaram ao desenvolvimento de sistemas específicos para o estudo de modelos animais de epilepsia, sendo que não há atualmente nenhum sistema disponível comercialmente. Daí a necessidade de se desenvolver nosso próprio sistema.

Levamos em consideração, além disso, que tal sistema deverá ser adotado em experimentos futuros a serem desenvolvidos por nosso grupo no Brasil. Sendo assim, toda a metodologia aqui desenvolvida poderá ser diretamente aplicada em nossos laboratórios com pouca ou nenhuma alteração.

Dessa forma, durante a elaboração do projeto de construção do nosso sistema mantivemos em mente três objetivos principais: facilidade de fabricação e de utilização do sistema, baixo custo e flexibilidade.

Além disso, tentamos desenvolver um sistema que possibilitasse a aquisição não só de EEG, mas também de outros tipos de registros eletrofisiológicos (p.e. potenciais evocados, ECG, EMG).

Finalmente, buscamos construir um sistema cujos princípios pudessem ser utilizados também para realização de registros em pacientes num contexto clínico.

### 3.1.2) Materiais e Métodos

#### A) Eletrodos

Como visto anteriormente, dois problemas básicos têm que ser considerados na escolha e confecção dos eletrodos de registro.

Inicialmente, devemos escolher materiais que produzam o mínimo possível de artefatos de susceptibilidade, evitando assim o comprometimento da qualidade das imagens.

Em segundo lugar, devemos levar em consideração a segurança do paciente no que diz respeito ao risco de queimaduras por aquecimento dos eletrodos.

Em nossos trabalhos optamos pelo uso de eletrodos superficiais de fibra de carbono (Goodfellow, UK). Tal material, além de não produzir artefatos de susceptibilidade identificáveis nas imagens obtidas por ressonância magnética, possui baixa resistência elétrica (na faixa de apenas alguns ohms), sendo bons condutores de eletricidade. Além disso, como não são bons condutores de calor, eletrodos de fibra de carbono são ideais no que diz respeito à segurança do paciente, ajudando a prevenir queimaduras por corrente elétrica induzida. Entretando, uma das desvantagens desse tipo de material é a impossibilidade de se soldar o mesmo à conectores metálicos, o que dificulta a sua manipulação.

Para resolver esse problema, desenvolvemos o eletrodo descrito na Figura-04. Uma pequena quantidade de fibra de carbono (Goodfellow - fornecido em forma multi-filamentar) com 10 cm de extensão, é introduzida dentro de um tupo de polietileno (Western Laboratory Service – 800/100/100/100), com aproximadamente 9 cm. Uma das extremidades da fibra de carbono é então colada ao tubo de polietileno com Superbonder®. Enquanto isso, outro tubo de polietileno (Western Laboratory Service – 800/100/260/100) é colado à metade de um conector de

circuito integrado (Tyco/Electronics/Augat – 808-AG11DESL) de 8 pinos. Para que o contato entre a fibra de carbono e o conector seja perfeito, os tubos PE50 são preenchidos com uma pequena quantidade de mercúrio metálico que serve como meio condutor entre as fibras de carbono e o conector. Finalmente, o tubo de polietileno contendo as fibras de carbono é introduzido dentro do tubo de polietileno contendo o mercúrio metálico, sendo fixado ao mesmo através de Superbonder®.



**Figura 04** – Eletrodos de fibra de carbono. À esquerda, foto de eletrodo de fibra de carbono desenvolvido para realização de EEG simultâneo com RMf. O eletrodo mostrado na foto possibilita a realização de registros em dois canais, sendo o eletrodo central usado como referência e os das extremidades como eletrodos de registro. À direita, desenho esquemático mostrando os componentes do eletrodo.

Após confecção os eletrodos são testados para condutividade, através da medida individual da resistência de cada canal. Eletrodos que apresentaram resistência superior a 50 ohms foram descartados.

O uso de eletrodos de superfície no lugar de eletrodos implantáveis, elimina a necessidade de procedimento cirurgico e perfuração do crânio, o que pode resultar em artefatos de imagens pela presença de espaço morto ou por acúmulo de sangue,
principalmente em experimentos agudos onde os eletrodos são implantados imediatamente antes dos procedimentos experimentais.

#### **B)** Pré-Amplificadores

Como descrito na introdução desse trabalho, o primeiro estágio de um sistema de registro de EEG, após os eletrodos, consiste em circuito que visa aumentar a amplitude desses sinais algumas vezes (em geral em torno de 10 vezes) de forma que possam ser conduzidos a uma distância relativamente grande sem que sejam corrompidos por ruído externo, resuntando assim numa melhora da relação sinal ruído (RSR). Considerando-se que o ambiente onde nossos registros foram adquiridos (i.e. dentro do aparelho de ressonância magnética) é extremamente ruidoso, em termos elétricos, o posicionamento dos pré-amplificadores é um aspecto crítico na configuração do sistema de registro.

Dessa forma, uma das principais soluções adotadas pelo nosso sistema consistiu em tentar amplificar o sinal de EEG com o mínimo de contaminação originária de artefatos provenientes do aparelho de RM. Partindo do princípio de que a corrente induzida é diretamente proporcional à magnitude do campo magnético e à área do volume condutor exposta à esse campo, tentamos posicionar o primeiro estágio de amplificação o mais próximo possível da extremidade dos eletrodos. Além disso, como descrito anteriormente na introdução, utilizamos cabos trançados de forma a eliminar ao máximo a presença de áreas livres. Mantendo-se o comprimento total dos cabos/eletrodos o menor possível, evita-se ainda que os mesmo funcionem como "antenas" para a captação de radiofrequência (RF) proveniente do aparelho de ressonância. Em nossas condições experimentais (4,7T), os pulsos de RF são da ordem de 200 MHz, o que resulta num comprimento de onda em torno de 1,5 metros ( $\lambda$ =C/f, onde  $\lambda$  é o comprimento de onda em metros, C é a velocidade da luz em

metros por segundo e f a frequência em Hertz). Devemos, portanto, tentar manter o comprimento dos cabos/eletrodos menor do que um quarto desse valor, ou seja, menor do que aproximadamente 37,5 cm.

O objetivo principal foi o de manter o estágio de pré-amplificação à não mais do que 25 cm da extremidade dos eletrodos. Os cabos de conexão entre os eletrodos de fibra de carbono e o pré-amplificador foram confeccionados com cabo composto por dois pares trançados blindados por carcaça metálica (Belden – 1804A). Apesar da presença de material metálico dentro do aparelho de RM, o mesmo é composto por material não magnético (cobre estanhado) resultando em efeito não detectável nas imagens (ver seção 3.2). A extremidade do cabo destinada à conexão com o eletrodos foi soldada ao conector de circuito impresso de 8 pinos (do mesmo tipo usado nos eletrodos). A extremidade destinada à conexão com o circuito pré-amplificador foi "crimpada" ao conector tipo telefônico de 4 vias (Molex – 90075-0027). A extensão final do cabo deveria ter em torno de 15 cm, o que, contando com os 10 cm dos eletrodos, resultou em 25 cm, dentro dos limites requeridos (Figura-05).



**Figura 05** – Foto mostrando cabo de conexão usado dentro do aparelho de ressonância magnética. Podemos observar o conector do tipo circuito integrado em uma das extremidades e tipo telefônico na extremidade oposta. O fio preto saindo da extremidade do conector do tipo circuito integrado é soldado a uma agulha (G25) que é inserida no tecido subcutâneo do animal de forma a possibilitar o aterramento do mesmo.

Medições prévias, mostraram que os eletrodos de fibra de carbono poderiam gerar um potencial de ponta da ordem de  $\pm$  20 a  $\pm$  30 mV. Devido a isso, escolhemos um primeiro estágio de amplificação de 10 vezes, o que resultaria num potencial DC de base da ordem de  $\pm$  200 a  $\pm$  300 mv, potencial esse perfeitamente dentro dos limites do estágio pré-amplificador, da ordem de  $\pm$  6 V.

Para eliminar as oscilações DC devidas aos potenciais de ponta dos eletrodos, logo após o estágio pré-amplificador, foi utilizado um filtro RC do tipo passa alta, com frequência de corte de 1.56 Hz. Com isso, obtivemos registro com linha de base estável. A escolha da frequência de corte foi feita com base na relação custo-benefício entre rápido retorno à linha de base após transientes e a preservação de informação de baixa frequência nos registros de EEG.

Após filtragem, os sinais passam por um segundo estágio de amplificação de 200 vezes, resultando numa amplificação total de 2000 vezes (Figura-06). Essa amplificação, de acordo com registros prévios, permitiria o adequado registro dos sinais de EEG (da ordem de 10 a 500 uV, incluindo aqui atividade epileptiforme), assim como dos artefatos gerados pelos gradientes magnéticos (que podem alcançar até 1 mv de acordo com as condições experimentais), sem que houvesse risco de saturação dos amplificadores (com resultante perda de informação dos sinais). Por outro lado, obtivemos amplificação suficiente para que a amplitude dos sinais registrados fossem suficientemente grandes para serem transmitidos pelos transmissores de fibra óptica.



**Figura 06** – Desenho esquemático do circuito eletrônico pre-amplificador adotado. Podemos observar o filtro RC do tipo passa-alta com frequência de corte de 1.56 Hz, posicionado entre os dois estágios amplificadores. A amplificação total fornecida por esse circuito é de 2000 vezes. PB = frequência de corte do filtro passa-baixa; Ref = sinal referência.

De forma a reduzir ao máximo o tamanho das placas de circuito impresso e, consequentemente, a área de superfície condutora sobre as mesmas (reduzindo assim a corrente induzida no circuito), todos os componentes eletrônicos usados foram de montagem de superfície. Os amplificadores operacionais utilizados (INA126, National Instruments) possuem um modo de rejeição comum adequado ao tipo de registro e ao ruído ambiente, além de terem uma impedância de entrada da ordem de 10<sup>9</sup> ohms, tendo sido cuidadosamente escolhidos por essas características. Tais características são críticas para se obterem sinais com o menor ruído possível, ao mesmo tempo impedindo que correntes significativas pudessem ser induzidas nos eletrodos, fornecendo a proteção requerida para evitar queimaduras nos animais.

### C) Fibra Óptica

Após amplificação do sinal de EEG e de se eliminar os possíveis níveis DC do sinal, o mesmo deve ser enviado para fora do scanner de forma a ser tratado e convertido em sinal digital passível de visualização e manipulação em computador pessoal.

Como visto anteriormente, um dos problemas da aquisição de eletrofisiologia e RMf é a indução de artefatos de RF nas imagens tanto gerados pelos circuitos eletrônicos quanto veiculados pelos cabos de transmissão de dados/sinais. A Figura-07A mostra imagens obtidas em nossos experimentos com equipamento de EEG convencional. As setas vermelhas mostram artefatos de imagens produzidos por contaminação de RF. Além das linhas correspondentes aos artefatos de RF podemos notar que o fundo das imagens aparenta ser significativamente mais "ruidosa" do que imagens do mesmo animal obtidas na ausência do sistema de EEG, resultando em bordas menos precisas e perda de contraste entre os tecidos (Figura-07B).

Α



В



**Figura 07** – Imagens de ressonância magnética de rato obtidas com sequência gradiente-echo. Em A podemos ver imagens com presença de artefatos de RF (setas vermelhas), provocados pelo sistema de registro de EEG convencional e ruído de fundo comprometendo qualidade das images. Em B podemos ver imagens do mesmo animal (mesma sequência de imagem) na ausência do sistema de registro, mostrando eliminação completa dos artefatos.

Dessa forma, adotamos a transmissão de dados analógicos através de fibra óptica, que, devido ao fato de não utilizar-se de cabos metálicos para transmissão de sinais, não conduz sinais de RF. A decisão de se utilizar sinais analógicos decorreu do fato de se eliminar assim a necessidade de introduzir conversores analógico-digitais dentro do aparelho de RM. Tais circuitos se utilizam de temporizadores que geram sinais de RF que poderiam contaminar os sinais de RM.

Transmissores analógicos de fibra óptica (HFBR-1416 – Agilent Technologies) foram posicionados na mesma placa que os circuitos amplificadores descritos no ítem anterior. Escolhemos esse modelo de transmissor devido a seu baixo custo, disponibilidade e características de transmissão e de alimentação.

Os sinais são então enviados para fora do aparelho de RM por meio de cabos de fibra óptica de 5 m de extensão (Molex – 91.11.522.0050E) até um circuito receptor.

O circuito receptor foi construído baseado no receptor analógico de fibra óptica HFBR-2416 (Agilent Technologies) A Figura-08 mostra desenho esquemático da placa de circuito impresso desenvolvida, bem como desenho esquemático de todo o circuito e foto do sistema.



**Figura 08** – Circuito amplificador/transmissor. O desenho esquemático do circuito completo (A) mostra o estágio pré-amplificador, com o filtro RC passa-alta, o transmissor de fibra óptica e o receptor de fibra óptica. O circuito receptor, apesar de estar no mesmo desenho esquemático, localiza-se no exterior do aparelho de ressonância. Em B, desenho esquemático da placa de circuito impresso desenvolvida para a montagem dos circuitos com componentes de montagem de superfície e em C foto do sistema posicionado próximo ao animal, durante experimento real. PB = frequência de corte do filtro passa baixa; Ref = sinal referência; -V = polo negativo da alimentação; +V = polo positivo da alimentação; Tx = transmissor de fibra óptica; Rx = receptor de fibra óptica.

Os circuitos amplificador/transmissor e receptor foram alimentados independentemente através de baterias de 6 e 3 V respectivamente.

# D) Condicionador de Sinais

Dependendo to tipo de registro eletrofisiológico a ser realizado, necessitamos

realizar um condicionamento do sinal "cru" de forma a filtrar componentes fora da

faixa de frequência de interesse. Uma faixa de frequência entre 0,15 e 80 Hz é adequada para a maioria das aplicações em eletroencefalografia.

Além disso, os sinais provenientes do receptor de fibra óptica, na faixa de poucos mV, necessitam ser amplificados antes da etapa de digitalização de forma a melhorar a resolução do registro.

Em nossos trabalhos utilizamos o condicionar programável de sinais CyberAmp 380A (Axon Instruments). Tal equipamento permite a programação dos filtros (passa-alta, passa baixa e notch) e da amplificação de forma individual em cada canal.

Os parâmetros utilizados nos experimentos de EEG e RMf foram: (a) filtro passa-alta = 1 Hz, (b) amplificação inicial de 10 vezes, (c) filtro passa-baixa = 80 Hz, (d) amplificação final de 200 vezes e (e) filtro *notch* ativado em 50 Hz (frequência de transmissão de energia no Reino Unido).

### E) Conversor Analógico Digital

O último estágio na aquisição dos registro de EEG consiste na digitalização dos sinais previamente condicionados.

Utilizamos o conversor analógico/digital (A/D) MP100 (Biopac Systems Inc). Tal equipamento fornece uma resolução de 12 bits (aproximadamente 4.8 mV/bit) com taxa de aquisição de até 5000 registros por segundo. Para visualização e processamento dos sinais digitais, utilizamos o software Acq*Knowledge*® versão 3.7.1, fornecido com o sistema de conversão A/D.

Para os registros de EEG durante aquisição de imagens de RMf, utilizamos frequência de amostragem de 500 registros por segundo. Os seguintes canais foram registrados: (a) EEG hemisfério esquerdo, (b) EEG hemisfério direito, (c) EEG

hemisfério esquerdo ou direito filtrado (vide próximo ítem), (d) temperatura retal do animal e (e) respiração.

Realizamos registro filtrado de apenas um dos canais de EEG de forma a diminuir o tamanho final do arquivo e o espaço ocupado no disco rígido do computador de registro, uma vez que os canais de EEG poderiam ser individualmente filtrados após a realização dos registros. A importância de se ter o registro em tempo real do EEG está no controle adequado das condições experimentais, permitindo a detecção de problemas durante a realização dos experimentos.

#### F) Método de Subtração de Artefatos Elétricos do EEG

De uma forma geral, todos os passos descritos anteriormente são comuns a qualquer tipo de registro de EEG, talvez com a exceção do sistema de fibra óptica, que, entretanto, é utilizado em alguns sistemas modernos de eletroencefalografia para aumento da qualidade dos sinais e diminuição dos riscos para os pacientes.

Entretanto, os sinais registrados durante a aquisição dos registros de RMf são contaminados por artefatos provenientes dos gradientes magnéticos e dos pulsos de RF, como discutido anteriormente na introdução desse trabalho.

Dessa forma, tivemos que desenvolver metodologia para subtração desses artefatos. Dois aspectos ditaram qual metodologia deveria ser empregada: (a) facilidade de implementação e disponibilidade e (b) adequação ao processo de aquisição de imagens de nosso aparelho de RM.

Com esses dois aspectos em mente, resolvemos adotar uma solução semelhante à descrita por Hoffmann e col. (Hoffmann et al., 2000), isto é, definição das frequências de contaminação e subtração das mesmas do sinal de EEG através da aplicação de filtros digitais do tipo *band-stop*.

Apesar da aparente superioridade dos outros métodos sobre a metodologia de subtração das frequências contaminantes, tais métodos são mais aplicáveis à imagens adquiridas através de sequências de imagens do tipo eco-planar, onde um volume cerebral completo é registrado em apenas alguns segundos. Isso é essencial para que o processo de promediação ou de redução adaptativa de ruído possa ser utilizado de forma ótima. A técnica de imagem usada em nossos trabalhos (*gradient-echo* sensível à T<sub>2</sub>\*) possui velocidade limitada, com aquisição de um volume completo em aproximadamente um minuto. Isso inviabilizaria a utilização das metodologias anteriormente citadas, sendo a remoção seletiva de frequências de contaminação a solução ideal.

Além disso, nosso maior interesse era a preservação da morfologia do EEG, o que pode ser conseguido de forma adequada com a metodologia utilizada.

Finalmente, o fato de o software utilizado para os registros possuir também capacidade de tratamento digital dos sinais através da aplicação de filtros do tipo passa-baixa e *band-stop* (filtragem de uma faixa de frequência específica), inclusive em tempo real, significa que nenhum tipo de software teve que ser desenvolvido pelo grupo, sendo já disponível no pacote de registro por nós utilizado. Deve-se ainda salientar que o sistema MP100 é amplamente utilizado em instituições de pesquisa.

Dessa forma, inicialmente realizamos estudos pilotos para determinar as frequências de contaminação produzidas pela aquisição das imagens de RMf (Vide Resultados). Após a determinação dos contaminantes, aplicamos um algorítmo simples de filtragem que constituía em 3 passos: (a) aplicação de filtro passa-baixa em 60 Hz, de forma a reforçar a filtragem de sinais de alta frequência, (b) aplicação de filtro *band-stop* em 38 Hz e (c) aplicação de filtro *band-stop* em 76 Hz. Como a

digitalização do sinal foi feita à 500 registros por segundo, componentes de frequência acima de 250 Hz não são significativos no sinal. O sinal resultante é praticamente indistinguível do sinal registrado na ausência da aquisição de imagens, sendo adequado, portanto, para a identificação de morfologias associadas a processos epileptiformes (vide resultados).

#### 3.1.3) Resultados

# A) Análise dos Efeitos do Sistema de Aquisição de EEG na Qualidade das Imagens de RMf

Para mostrarmos os efeitos de diferentes tipos de eletrodos na qualidade das imagens de ressonância comparamos eletrodos metálicos convencionais e eletrodos de fibra de carbono desenvolvidos em nossos trabalhos com imagens obtidas na ausência de eletrodos. A Figura-09 mostra imagens adquiridas com eletrodos convencionais de EEG (i.e. eletrodos metálicos de cobre), com eletrodos de fibra de carbono e sem eletrodos. Em A podemos observar a presença de extenso artefato de imagem (artefato de susceptibilidade) resultante da utilização de eletrodos metálicos. Tais imagens apresentam comprometimento completo das regiões cerebrais localizadas imediatamente abaixo e ao redor dos eletrodos. Em B podemos ver imagens obtidas com mesmo protocolo de imagem, mas com utilização de eletrodos de carbono. Nenhum tipo de artefato de susceptibilidade, decorrente da utilização dos eletrodos de carbono, pode ser identificado. Em C podemos ver imagens obtidas com o mesmo protocolo utilizado em A e B na ausência de eletrodos. Esses resultados mostram que os eletrodos de fibra de carbono são

efetivos na eliminação de artefatos de susceptibilidade, sendo qualitativamente comparáveis a imagens obtidas na ausência de eletrodos.



Α

В





**Figura 09** – Comparação entre imagens obtidas com diferentes tipos de eletrodos e sem eletrodo. Extenso artefato de susceptibilidade (seta vermelha em A) pode ser observado quando as imagens são adquiridas na presença de eletrodo metálico, mas nenhum artefato identificável aparece na presença de eletrodos de fibra de carbono (B). As imagens obtidas na presença de eletrodos de fibra de carbono (B) são qualitativamente comparáveis àquelas obtidas sem eletrodos (C), em termos de ausência de artefatos.

Para determinar os efeitos dos circuitos eletrônicos e dos eletrodos sobre a qualidade das imagens de ressonância funcional, realizamos uma série de

experimentos com "fantasma" (vide metodologia de aquisição de imagens – seção 3.3.2-B), composto por tubo de plástico com diâmetro de aproximadamente 2 cm preenchido com solução fisiológica (NaCl 0,9%), usando a mesma sequência e parâmetros a serem utilizados nos experimentos com animais (*gradiente-echo* sensível a  $T_2^*$ ), com imagens adquiridas em duas condições: (a) fantasma sem a presença de circuito e cabos dentro do scanner e (b) fantasma com todo o equipamento de EEG conectado e funcionante, incluindo eletrodos de fibra de carbono fixados sobre a superfície do fantasma da mesma forma que nos experimentos com animais (vide seção sobre aquisição simultânea de EEG e RMf em animais).

Uma série de 15 volumes (cada volume composto por 40 planos anatômicos "coronais") foram colhidos de forma randomizada (com ou sem EEG) sendo o cálculo da relação sinal ruído (RSR) feito de acordo com a seguinte fórmula: RSR=I<sub>sinal</sub>/DP<sub>sinal</sub> (onde I<sub>sinal</sub> é média da intensidade dos voxels dentro de uma região de interesse dentro do fantasma e DP<sub>ruído</sub> é o desvio padrão da intensidade dos voxels dentro da mesma região de interesse). Obtivemos sempre valores dos cinco planos anatômicos centrais (planos 18 a 22), sendo o valor para cada experimento igual à média dos valores nesses 5 planos. As regiões de interesse (circulares) foram sempre traçadas no centro do plano anatômico, com raio aproximadamente igual a metade do raio do fantasma. A Figura-10 mostra em A imagens de fantasma obtidas sem a presença do sistema de EEG. O retângulo vermelho mostra os planos anatômicos usados no cálculo da RSR. Em B imagens do mesmo fantasma obtidas na presença de todo o sistema de EEG. Podemos observar ausência de diferença detectável na qualidade das imagens com ou sem o sistema de EEG.





**Figura 10** – Cálculo de relação sinal ruído em "fantasma" preenchido com solução salina fisiológica. As imagens obtidas na ausência do sistema de registro de EEG (A) não são qualitativamente diferentes daquelas obtidas na presença do sistema (B). O retângulo vermelho indica os planos anatômicos utilizados para o cálculo da relação sinal ruído.

A medida da intensidade e do desvio padrão da intensidade do sinal foi realizada através do software xdispanal (Department of Medical Physics & Bioengineering - UCL) em ambiente UNIX.

Inicialmente realizamos comparação, através de teste-t, da diferença de intensidade do sinal dentro da área de interesse (Gráfico-01). Enquanto nas imagens do fantasma sem o sistema de EEG encontramos uma intensidade de 16537  $\pm$  393 (média  $\pm$  desvio padrão), nas imagens obtidas na presença de todo o sistema a intensidade foi de 16388  $\pm$  414 (média  $\pm$  desvio padrão). O teste-t não mostrou diferença estatística entre os valores das intensidades médias nas duas condições (p=0,78).

#### Intensidade Média do Sinal



**Gráfico 01** – Comparação entre as médias das intensidades dos sinais de imagens de "fantasma" preenchido com solução fisiológica salina obtidas na ausência e na presença do sistema de EEG. A intensidade média do sinal das imagens obtidas na ausência do sistema de EEG foi de  $16537 \pm 393$  (média  $\pm$  desvio padrão) enquanto que na presença do sistema de EEG, obtivemos intensidade de  $16388 \pm 414$  (média  $\pm$  desvio padrão). Não foi observada diferença estatisticamente significativa (p=0,78; teste-t não pareado) entre os sinais medidos nas duas condições (barras de erro indicam erro padrão).

Da mesma forma, não observamos diferença estatisticamente significativa (p=0,48) entre os desvios padrão da intensidade do sinal nas duas condições experimentais, sem e com o equipamento de EEG, sendo os desvios padrões respectivamente de  $663 \pm 127$  e  $700 \pm 148$  (média  $\pm$  desvio padrão).



**Gráfico 02** – Comparação entre os desvios padrão das médias das intensidades dos sinais de imagens de "fantasma" preenchido com solução fisiológica salina obtidas na ausência e na presença do sistema de EEG. O desvio padrão na ausência do sistema de EEG foi de  $663 \pm 127$  (média  $\pm$  desvio padrão), enquanto que na presença do sistema foi de  $700 \pm 148$ . Não foi observada diferença estatisticamente significativa (p=0,48; teste-t não pareado) entre os desvios padrão da média das intensidades dos sinais medidos na duas condições (barras de erro indicam erro padrão).

Finalmente, calculamos a relação sinal ruído para as duas condições experimentais, obtendo  $25,5 \pm 1,2 = 24,5 \pm 1,5$  para as imagens sem e com sistema de EEG, respectivamente. O teste-t (p=0,62) mostrou ausência de diferença estatística significativa entre os dois grupos.



**Gráfico 03** – Comparação entre relação sinal ruído (RSR) calculada para imagens de "fantasma" preenchido com solução fisiológica salina obtidas na ausência e na presença do sistema de EEG. Não foi observada diferença estatisticamente significativa (p=0.62; teste-t não pareado) entre a RSR das imagens obtidas na ausência do sistema de EEG ( $25,5 \pm 1,2$ ; média  $\pm$  desvio padrão) e na presença do mesmo ( $24,5 \pm 1,5$ ; média  $\pm$  desvio padrão) (barras de erro indicam erro padrão).

Dessa forma, concluímos que, apesar de uma tendência de maior "ruído" nas imagens obtidas na presença do sistema de EEG (de aproximadamente 4%), nenhuma diferença significativa foi observada na presença do sistema, indicando que a qualidade das imagens é preservada mesmo durante realização de registro de eletroencefalografia simultânea com a aquisição das imagens de RMf.

A Figura-11 compara imagens do tipo *gradient-echo* obtidas ambas com sistema de registro de EEG dentro do scanner. Em A observamos imagens adquiridas na presença de sistema de EEG convencional (sem trasmissão de sinais por fibra óptica, mas com eletrodos de fibra de carbono). Podemos observar presença de artefatos de RF, além de fundo evidentemente mais ruidoso do que o

observado em B, que mostra imagens obtidas com mesmos parâmetros de imagens utilizados em A mas com o sistema de registro de EEG desenvolvido por nós.

В



**Figura 11** – Comparação entre qualidade de imagens obtidas na presença de sistema de EEG convencional (A) e na presença do sistema de EEG desenvolvido por nós (B). Em A podemos observar presença de artefatos de RF nas imagens (linhas claras no topo dos planos anatômicos) bem como ruído de fundo, quando as imagens são adquiridas na presença de sistema de EEG convencional. Por outro lado, nas imagens adquiridas na presença do nosso sistema de EEG, não há evidências de artefatos de RF, sendo a qualidade das imagens comparável àquelas obtidas na ausência de sistema de EEG.

# B) Análise dos Efeitos da Aquisição de Imagens de RMf na qualidade do EEG

Como visto na introdução deste trabalho, o registro de EEG de qualidade dentro de um aparelho de ressonância magnética apresenta uma série de desafios metodológicos. Basicamente, podemos citar como principais problemas (a) a segurança do paciente, no que diz respeito à possibilidade de queimaduras por corrente induzida nos eletrodos, (b) artefatos elétricos nos registros de EEG devido à movimentos dos cabos e dos eletrodos dentro do campo magnético principal do

Α

aparelho e (c) artefatos elétricos nos registros de EEG devido aos campos magnéticos gerados pelos gradientes magnéticos e pelos pulsos de RF durante a aquisição das imagens.

Com relação ao risco de indução de calor nos eletrodos e consequente queimadura de tecidos, eliminamos esse problema através do uso de eletrodos de carbono e da utilização de amplificadores com alta impedância de entrada (10<sup>9</sup> Ohms), o que elimina a possibilidade da indução de corrente no sistema capazes de gerar calor nos eletrodos.

Com relação aos artefatos de movimento, ao longo de nossos trabalhos, realizamos todos os registros de EEG e RMf silmultâneos em animais anestesiados, fixos firmemente à um sistema de contenção através de parafusos auriculares. Apesar disso, nenhum outro tipo de contenção foi aplicado às demais partes do corpo, possibilitando que movimentos respiratórios fossem um grande gerador de artefatos nos registros de EEG devido a pequenos movimentos dos cabos. A Figura-12A mostra a presença desses artefatos em experimento típico realizado dentro do aparelho de RM sem presença de gradientes (sem aquisição de imagens). O traçado superior mostra monitorização da respiração do animal enquanto que o traçado inferior mostra o registro de EEG. Podemos observar que neste experimento o EEG esta contaminado por artefatos provocados por movimentos dos cabos e dos eletrodos dentro do aparelho de ressonância provocados pelos movimentos respiratórios do animal.



**Figura 12** – Artefato provocado por movimento dos cabos/eletrodos dentro do campo magnético do aparelho de ressonância magnética e solução adotada. Em A podemos observar no registro de EEG (traçado inferior) presença de artefatos coincidentes (linhas tracejadas mostrando dois exemplos) com movimentos respiratórios do animal (traçado superior). Após fixação dos cabos à base do aparato de contenção do animal (B), observamos eliminação desses artefatos. Os registros foram obtidos na ausência de aquisição de imagens.

Para eliminarmos esses artefatos realizamos a fixação dos cabos à base do aparato de contenção do animal (Figura-13), mantendo, dessa forma, os cabos sob o animal e impedindo a movimentação dos mesmos. Além disso, o circuito pré-amplificador/transmissor foi fixado à base do aparato de contenção através de velcro®. A Figura-12B mostra registro realizado na mesma condição mostrada na Figura-12A, mas com a fixação dos cabos, demonstrando a eficácia desse sistema na eliminação de artefatos de respiração.



**Figura 13** – Fixação dos cabos à base do aparato de contenção animal. Em A podemos ver a fixação da conexão entre os eletrodos e o cabo. Em B podemos ver a extremidade oposta do cabo fixada ao aparato de contenção. Podemos observar, abaixo do conecctor tipo telefônico, o velcro® utilizado para fixar o circuito pré-amplificador/transmissor.

Os artefatos elétricos induzidos pelos gradientes magnéticos constituem-se no principal desafio à realização de EEG de qualidade durante a aquisição de imagens. Pelos princípios já discutidos na introdução deste trabalho, sabemos que todo campo magnético variável induz uma corrente em qualquer corpo condutor submetido à esse campo magnético. A amplitude dessa corrente é proporcional à variação da intensidade do campo e à área do corpo condutor. Já que a intensidade do campo magnético é uma propriedade inerente à metodologia de imagem, o único recurso para tentarmos minimizar os artefatos de corrente induzida seria diminuir ao máximo à área condutora exposta aos gradientes. Além disso, diminuindo-se o comprimento dos cabos e o tamanho dos circuitos, diminuimos também os artefatos induzidos pelos pulsos de RF (vide seção sobre confecção dos eletrodos 3.1.2-A). Assim, nosso primeiro passo foi a construção de um sistema que diminuisse ao máximo a amplitude dos artefatos induzidos através da limitação das dimensões dos circuitos, cabos e eletrodos.

Dessa forma, como já exposto anteriormente, idealizamos um sistema de aquisição onde a distância entre o local de contato dos eletrodos com a cabeça dos animais e o primeiro estágio amplificador fosse a menor possível. Isso resultou na obtenção de registros com artefatos apenas algumas vezes maiores do que a amplitude do sinal de EEG (em torno de 2,4 vezes maior). A Figura-14 mostra como esse processo é efetivo na redução dos artefatos induzidos pelos gradientes magnéticos. Em A observamos registro realizado com sistema de registro onde o primeiro estágio pre-amplificador foi posicionado a aproximadamente um metro do animal; B corresponde a registro realizado com distância ponta do eletrodo/pré-amplificador de apenas 25 cm. Podemos confirmar, dessa forma, que a diminuição dessa distância é efetiva na diminuição dos artefatos.



**Figura 14** – Artefatos induzidos nos registros de EEG pela ação dos gradientes magnéticos durante aquisição de imagens de ressonância magnética. Em A podemos observar registro efetuado com cabo/eletrodos com um metro de extensão. Nessas condições, observamos presença de artefatos elétricos várias vezes mariores do que o registro basal de EEG. Diminuindo-se a extensão do cabo/eletrodos para apenas 25 cm, obtemos diminuição significativa da amplitude dos artefatos nos registros de EEG (B).

O segundo passo foi determinar de que forma o processo de aquisição de imagens interferia nos registros de EEG.

Para respondermos à essa questão realizamos uma série de registros de EEG durante a aquisição de imagens, variando-se alguns dos parâmetros de aquisição. Observamos que em um experimento padrão a distribuição de frequência desses artefatos estava em torno de 38 Hz e seus harmônicos (i.e. 76, 114 e 152 Hz). Essa frequência corresponde à aquisição de 40 planos anatômicos em 1,05 segundos (f = 1/(TR/número de fatias), i.e. f = 1/(1,05/40) = 38 Hz; onde TR = tempo de repetição). Essa relação pôde ser confirmada variando-se o número de planos anatômicos, mas mantendo-se o tempo de repetição (Figura-15).



**Figura 15** – Análise espectral dos registros de EEG obtidos durante aquisição de imagens com diferentes números de planos anatômicos, mas com mesmos TR (tempo de repetição). O componente principal observado obedece à relação f=1/(TR/ns) (onde TR é o tempo de repetição e ns é o número de planos anatômicos), sendo os demais componentes suas harmônicas. A presença de componente em 50 Hz corresponde a interferência proveniente da frequência da rede elétrica (que é de 50 Hz no Reino Unido).

Dessa forma, uma vez determinadas as frequências correspondentes aos artefatos, aplicamos o algoritmo de remoção de artefatos descrito anteriormente (metodologia). A Figura-16 mostra o resultado da aplicação desse algorítmo em registro real de EEG obtido simultaneamente à aquisição de imagens de RMf. Podemos observar como os artefatos induzidos pelos gradientes magnéticos (porção à esquerda da linha tracejada) são progressivamente eliminados por esse processo, ao mesmo tempo mantendo as características morfológicas principais do EEG, resultando em traçado praticamente indistinguível do registro obtido quando a aquisição de imagens é interrompida (porção à direita da linha tracejada).



**Figura 16** – Algorítmo de remoção de artefatos em traçados obtidos durante (à esquerda da linha tracejada) e após (à direita) aquisição de imagens de RMf. Os passo A, B e C correspondem a aplicação de filtro passa-baixa de 60 Hz, filtro band-stop de 38 Hz e filtro band-stop de 76 Hz, respectivamente. Podemos observar como os artefatos são progressivamente removidos do traçado de EEG, resultando em traçado qualitativamente indistinguível daquele obtido no período sem atividade do aparelho de ressonância.

A Figura-17 mostra registro de EEG de caso típico onde o traçado superior apresenta registro não filtrado do EEG e o traçado inferior apresenta o mesmo registro após aplicação do algorítmo de filtragem. O algorítmo de filtragem é aplicado em tempo real, não havendo nenhum tipo de atraso entre a aquisição dos dois traçados. Cabe ressaltar que o traçado filtrado mantem as caracterísitcas morfológicas do traçado original, o que pode ser observado na Figura-17 durante registro na ausência de aquisição de imagens (porção mais à esquerda dos traçados).



**Figura 17** – Resultado da aplicação do algorítmo de filtragem de registro de EEG realizado simultaneamente à aquisição de imagens de RMf. O traçado superior corresponde à registro de EEG não filtrado e o inferior ao mesmo registro após aplicação do processo de remoção de artefatos. No início dos registros, antes do início da aquisição de imagens, podemos observar que as características morfológicas do traçado original são preservadas no traçado filtrado. Após início da aquisição de imagens, o traçado original apresenta artefatos induzidos pelos gradientes magnéticos, enquanto que os mesmos não são visíveis no traçado corrigido

Dessa forma demonstramos ser possível a aquisição de EEG de qualidade

adequada para a identificação de alterações morfológicas simultâneo à aquisição de

imagens de ressonância funcional.

#### 3.1.4) Discussão

Pelo que demonstramos nos resultados dessa seção, consideramos que a técnica adotada para realização de EEG simultâneo com RMf é adequada aos objetivos dos nossos estudos.

Um dos pontos de crítica à técnica de eliminação de artefatos de gradientes através da aplicação de filtros do tipo *band-stop* é a perda de informação do EEG contida na frequência de corte e nas frequências imediatamente vizinhas à ela. Como veremos na seção seguinte sobre caracterização eletroencefalográfica do modelo animal de epilepsia induzida por Picrotoxina em animais anestesiados, o EEG em nossas condições experimentais possui pouca informação em frequências superiores à 30 Hz. Além disso, mostramos que a técnica é perfeitamente capaz de preservar, pelo menos visualmente, as principais características morfológicas do EEG. Considerando-se que o principal objetivo da realização de EEG simultâneo à RMf foi o de determinar o momento exato em que episódios epileptiformes ocorriam, de forma a utilizarmos essa informação para traçarmos o nosso "paradigma" para as análises de imagens (vide seção 3.3.2-E), a informação eventualmente perdida durante o processo de eliminação de artefatos foi considerada desprezível.

No que diz respeito à qualidade das imagens obtidas na presença do sistema de aquisição de EEG, mostramos que a relação sinal ruído não foi significativamente diferente daquela obtida na ausência do sistema. Apesar de existirem várias formas de cálculo da RSR, resolvemos adotar a fórmula que considera a intensidade do sinal e o desvio padrão do mesmo, por ser essa a fórmula que melhor reflete as variações de sinal e ruído dentro da região de interesse. Além disso, como veremos no ítem de análise de imagens, as imagens adquiridas em experimentos com animais são mascaradas de forma a preservar apenas o cérebro eliminando as

demais áreas, diminuindo assim a influência dos tecidos adjascentes e do ruído de fundo nas análises.

O fato de os artefatos elétricos observados durante os registros de EEG coincidirem com a frequência do gradiente de seleção de plano anatômico (*slice selection*) pode ser explicado pelo fato de a frequência de ação desse gradiente estar dentro da banda de frequência preservada pelo processo de filtragem, sendo os efeitos dos demais gradientes eliminados pelo processo de filtragem, podendo o gradiente de seleção de plano anatômico ser considerado como o único gerador de artefatos. A presença das harmônicas deve-se ao fato de que em todo registro longo o suficiente, tem-se o aparecimento de harmônicas de um componente de frequência que se mantém estável ao longo do tempo (Hoffmann et al., 2000) o que é o caso dos artefatos produzidos pela ação dos gradientes magnéticos do aparelho de ressonância. Tais gradientes obedecem à uma sequência pré-estabelecida pelo método de imagem adotado, se repetindo de forma idêntica a cada volume de imagem (TR x 64, onde 64 é o tamanho da matriz de imagem no sentido de decodificação de fase). O resultado é um ruído previsível e estável ao longo de todo o registro.

Outra crítica ao sistema de registro decorre da utilização de fibra óptica. Detectamos uma diminuição gradual da amplitude dos sinais registrados ao longo do tempo. Tal diminuição foi decorrente da perda de "carga" da bateria que alimentava o sistema de transmissão. Uma solução para esse problema seria a utilização de fonte de alimentação de corrente contínua regulada. Por outro lado, antecipamos que a utilização de fonte de alimentação conectada à rede elétrica poderia introduzir ruído de RF no sistema, anulando a vantagem da utilização do transmissor de fibra óptica. Dessa forma, optamos por manter a alimentação dos circuitos através de

bateria, desde que a mesma fosse checada antes de cada seção de registro. Todos os registros foram obtidos com bateria apresentando tensão nunca menor que ±5.8V o que garantiu registros estáveis durante toda a realização dos protocolos experimentais.

O objetivo de se desenvolver sistema flexível o suficiente para que outros tipos de registros eletrofisiológicos, i.e. EMG, ECG e Potenciais Evocados, não foi levado à frente por limitação de tempo e de fundos. Entretanto, alguns experimentos foram realizados tanto na tentativa de obtenção de ECG quanto de Potenciais Evocados Somatossensoriais por estimulação de pata anterior. Tais experimentos mostraram-se promissores, apesar da evidente necessidade de ajustes para cada tipo de registro (dados não mostrados).

Finalmente, com relação à possibilidade de se utilizar esse sistema em pacientes, realizamos alguns pilotos para a detecção de reflexo de piscamento provocada por estimulo auditivo de grande volume (120 dB) durante a aquisição de imagens de ressonância magnética funcional por EPI, obtendo resultados também bastante promissores.

Concluimos, dessa forma, que os objetivos principais de desenvolvimento foram atingidos e que a possibilidade de aprimoramento da técnica para outras aplicações são realistas.

3.2) Caracterização Eletroencefalográfica do Modelo Animal de Epilepsia por Injeção Intraperitoneal de Picrotoxina

### 3.2.1) Considerações Preliminares

Em nossos trabalhos de RMf, foi condição *si ne qua non* a imobilização dos animais através de procedimento anestésico por dois motivos. Inicialmente, precisávamos manter os animais imóveis durante a realização das imagens de RM, de forma a diminuirmos o impacto de movimentos sobre a qualidade de images. Segundo, de acordo com as leis de experimentação animal vigentes no Reino Unido (*Animal Act 1986*), experimentos de RMf só podem ser realizados com animais sob anestesia.

No entanto, poucos estudos existem na literatura abordando distúrbios epilépticos em animais anestesiados (Busch et al., 1995;Brinker et al., 1999;Sim and Chua, 1989;Sawamura et al., 2002), sendo que nenhum estudo foi realizado, até o momento, envolvendo animais anestesiados onde crises epileptiformes foram induzidas por Picrotoxina.

Portanto, devido às características particulares dos protocolos experimentais de registro de EEG simultaneamente à aquisição de imagens de RMf, foi necessário realizar, sob as mesmas condições experimentais adotadas nesses protocolos, caracterização eletroencefalográfica do modelo de Picrotoxina de forma a avaliar o impacto da anestesia no desenvolvimento das crises convulsivas e caracterizar os registros de EEG basal e ictal nos animais sob anestesia.

# 3.2.2) Metodologia

#### A) Grupos Experimentais

Ratos Wistar machos, pesando entre 350 e 400 g, fornecidos pelo biotério central da BioMedical Sciences Unity - Queen Mary and Westfield University, foram distribuídos aleatoreamente em três grupos: (a) 4 animais anestesiados com uretana (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à 10 minutos de registro de EEG superficial em dois canais (hemisférios direito e esquerdo, respectivamente) previamente a injeção i.p. de 1 ml/Kg de salina (grupo controle salina) seguido por 30 minutos de registro de EEG, (b) 5 animais anestesiados com uretana (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à 10 minutos de registro de EEG superficial em dois canais (hemisférios direito e esquerdo, respectivamente) previamente à injeção i.p. de 1 ml/Kg de veículo (etanol 20% em salina - grupo controle veículo) seguido por 30 minutos de registro de EEG e (c) 5 animais anestesiados com uretana (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à 10 minutos de registro de EEG superficial em dois canais (hemisférios direito e esquerdo, respectivamente) previamente a injeção i.p. de 10 mg/Kg de Picrotoxina (solução de 10 mg/ml diluídos em solução 20% de etanol em salina - grupo experimental) seguido por 30 minutos de registro de EEG. Os registro de EEG foram realizados sem interrupção entre os períodos pré e pós injeção.

Todas as soluções foram preparadas no dia dos experimentos, possibilitando assim uma melhor homogeneidade de resultados.

#### B) Sistema de Registro de EEG Superficial

De forma a obtermos caracterização mais próxima possível às condições experimentais exigidas nos protocolos de registro simultâneo de EEG e RMf,

utilizamos o mesmo sistema de registro de EEG desenvolvido para a realização dos experimentos dentro do aparelho de ressonância magnética, descrito na seção 3.1.

#### C) Procedimentos Experimentais

Inicialmente, os animais foram anestesiados através de injeção i.p. de uretana (1,4 g/Kg). Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados sobre cobertor térmico controlado por termômetro retal (Harvard Instruments), tendo a temperatura controlada em 37,5 ± 0,3 °C, e fixados a estereotáxico (Kopf). A seguir, procedeu-se tricotomia da cabeça e posterior limpeza da pele com álcool, de forma a eliminar tecido epidérmico morto e possibilitar uma superfície adequada de contato para os eletrodos de EEG. Após limpeza da pele, realizou-se fixação de par de eletrodos de fibra de carbono superficiais (fixos à uma matriz de acrílico), através de micropore®. Uma pequena quantidade de gel eletrolítico é aplicada à ponta dos eletrodos de EEG superficial.

Os eletrodos de fibra de carbono foram conectados ao pré-amplificador através de cabo de par-trançados, sendo o sinal amplificado e convertido em sinais ópticos através de sistema de fibra-óptica. Os sinais foram então transmitidos através de par de cabos de fibra óptica de 5 metros para o receptor de fibra óptica, convertidos novamente para sinais elétricos e então transmitidos para o sistema de condicionamento de sinais (CyberAmp). Após condicionamento dos sinais, conforme descrito na seção 3.1, os sinais analógicos foram convertidos em registros digitais (MP100) sendo então visualizados em computador pessoal.

Todos os parâmetros de registro foram mantidos exatamente iguais aos parâmetros a serem utilizados nos protocolos de ressonância funcional (Amplificação total de 200 vezes – amplificação total efetuada após aplicação dos

filtros; filtro passa alta em 1 Hz; filtro passa baixa em 80 Hz; *Notch filter* ativado; frequência de amostragem de 500 registros/seg).

Todos os registros de EEG tiveram duração total de 40 minutos ininterruptos, divididos em 10 minutos pré-injeção e 30 minutos pós-injeção.

Após os registros, os animais foram sacrificados por descolamento da coluna cervical.

# 3.2.3) Resultados

Foram observadas crises eletrográficas em todos os animais injetados (i.p.) com 10 mg de picrotoxina por quilo de peso. Além da crise eletrográfica, foram observados em todos os animais crise motora iniciando-se com mioclonias de face e de orelhas e movimentos mastigatórios, progredindo para piloereção e espasmos clônicos de intensidade progressiva, culminando em espasmos clônicos violentos ao final dos experimentos.

O tempo médio para início das crises foi de  $17,3 \pm 1,5$  minutos (média  $\pm$  desvio padrão). O início das crises foi definido como a primeira ocorrência de polipontas recorrentes com duração de mais de 10 segundos.

A Figura-18 mostra evolução das alterações eletrográficas de animal típico.

A with an intersected of the provident in the provident of the second of



**Figura 18** – Evolução das alterações eletroencefalográfica em animal típico do grupo injetado (i.p.) com Picrotoxina. O padrão do EEG basal em animais anestesiados é caracterizado por ausência de rítmo predominante (A). Em B podemos observar resposta eletrodecremental pré-ictal evoluindo para crise epileptiforme eletrográfica culminando em *status epilepticus* (SE) no final dos experimentos (C).

Na Figura-18A podemos observar padrão do EEG basal do animal. Ao contrário do EEG de animais não anestesiados, não é observado, no caso dos animais anestesiados com uretana, rítmo predominante, o que pode ser confirmado pela ausência de componente principal em frequência na análise dos registros por Transformada Rápida de Fourrier (Figura-20A). Resposta eletrodecremental foi observada após injeção i.p. de picrotoxina momentos antes da ocorrência do primeiro episódio epileptiforme, com tempo médio de início de 9,4 ± 1,3 minutos (média ± desvio padrão) (Figura-18B), sendo esse fenômeno observamos em todos os animais. Após resposta eletrodecremental, o EEG evoluiu para atividade epileptiforme iniciando com ondas de alta amplitude e baixa frequência, seguida por poli-pontas com frequência de aproximadamente 2 Hz (Figura-18C), passando para poli-pontas de maior amplitude e frequência (em torno de 3 Hz) culminando em "trens" de disparos de alta amplitude com frequência em torno de 5 Hz.

A Figura-19 mostra traçado de EEG de animal típico em janela temporal englobando todo o experimento (40 minutos de registro). A resposta

eletrodecremental ocorre de forma abrupta (seta), sendo seguida por alterações epileptiformes progressivas como descrito no parágrafo anterior.



**Figura 19** – Traçado de EEG de animal típico injetado com Picrotoxina, mostrando a evolução temporal das alterações. Podemos observar, aproximadamente no centro do registro (seta), resposta eletrodecremental que ocorre de forma abrúpta, seguida por alterações epileptiformes progressivas, culminando em *status epilepticus* eletrográfico.

Realizamos, em seguida, avaliação da amplitude do EEG em três intervalos diferentes do registro: (a) média das amplitude em bloco de 60 segundos medido imediatamente antes da injeção de picrotoxina, (b) média das amplitudes em bloco de 60 segundos durante resposta eletrodecremental pré-ictal e (c) média das amplitudes em bloco de 60 segundos 2 minutos após início de *status epilepticus* (SE). Os valores das amplitudes médias (pico-a-pico) foram normalizados utilizando-se amplitude média (pico-a-pico) medida no início dos registros (bloco de 60 segundos). Essa normalização foi realizada devido às variações inerentes ao sistema de transmissão de fibra óptica descritas na discussão da seção 3.1.

O Gráfico-04 mostra as amplitudes médias dos EEGs obtidos nos experimentos de injeção de picrotoxina, controle salina e controle veículo. No grupo tratado com Picrotoxina, o teste-t (pareado) mostrou diminuição estatisticamente significativa da amplitude do EEG durante resposta eletrodecremental (pré-lctus) (p<0.0001), quando comparado com o EEG basal (pré injeção). Diferença significativa foi também observada entre EEG basal e EEG ictal (p<0.001).

As amplitudes do EEG nos grupos controle salina e controle veículo foram calculadas em intervalos correspondentes aos intervalos utilizados para a medida das médias das amplitudes no grupo experimetal de injeção de picrotoxina, ou seja, 60 segundos antes da injeção – pre injeção –, 60 segundos obtidos após 10 minutos de injeção – pre "Ictus" – e 60 segundos após 18 minutos de injeção – "Ictus". Não foi observada diferença estatisticamente significativa (teste-t pareado considerando intervalos dois a dois) entre nenhum dos intervamos nos dois grupos controle. A Tabela-03 mostra os valores referentes aos três intervalos para os três grupos além dos percentuais de variação entre os intervalos pré injeção e pre-ictal e pre injeção e ictal.



**Gráfico 04** – Comparação entre a variação das amplitudes corrigidas médias nos momentos préinjeção, pré-ictus e ictus, entre os grupos experimentais. O grupo experimental injetado com Picrotoxina apresentou diminuição significativa (\*p<0,0001; teste-t pareado) da amplitude média do EEG durante o período pré-ictal comparado com o período pré-injeção. No período ictal, aumento significativo (\*\*p<0.001; teste-t pareado) foi observado na amplitude média do EEG dos animais tratados com Picrotoxina, comparando-se com a amplitude média do EEG basal (pré-injeção). Nenhuma variação significativa foi observada nos grupos controle. (barras de erro indicam erro padrão).

	Amplitude Pré-Injeção	Amplitude Pré-Ictus	Amplitude Ictus	% Variação Pré-Ictus	% Variação Ictus
Picrotoxina	0,933 ± 0,106	0,594 ± 0,143*	2,568 ± 0,320**	-65.41 ± 50.75	63.03 ± 7.73
Controle Salina	0,933 ± 0,100	0,960 ± 0,154	0,945 ± 0,121	2.25 ± 5.43	0.87 ± 7.26
Controle Etanol	1,045 ± 0,127	0,995 ± 0,092	1,063 ± 0,093	-5.18 ± 11.42	1.58 ± 9.76

**Tabela 03** – Valores de amplitude média corrigida do EEG para os grupos injetado com Picrotoxina (n=5), Controle Salina (n=4) e Controle Etanol (n=5), nos intervalos pré-injeção, pré-ictus e ictus e variação percentual das amplitude entre pré-injeção e pré-ictus e pré-injeção e ictus. Diferença estatisticamente significativa foi observada apenas no grupo injetado com Picrotoxina entre o período pré-injeção e os demais períodos (\*p=0,008, \*\*p=0,0003)

Finalmente, a Figura-17 mostra a análise espectral de EEG de animal típico do grupo experimental injetado com Picrotoxina. Podemos observar que o EEG basal dos animais anestesiados (Figura-20A) não apresenta nenhum componente dominante de frequência no intervalo pré-injeção. Entretanto, no intervalo pré-lctus (Figura-20B), podemos observar aparecimento de componentes de frequência predominantes em torno de 5 Hz (setas). Durante o período ictal (Figura-20C) observamos componentes em torno de 7,5 Hz (setas). Além disso, não observamos componentes em frequência significativos acima de 30 Hz. Esse fato é importante no que diz respeito às limitações impostas pela técnica de eliminação de ruídos utilizada nos registros simultâneos a RMf.



**Figura 20** – Análise espectral (FFT) dos registros de EEG de animal típico do grupo injetado com Picrotoxina. Em A observamos ausência de componente dominante em frequência em trecho de EEG retirado do período pré injeção. Durante o período de resposta eletrodecremental (B), componentes dominantes aparecem em frequências em torno de 5 Hz. Durante *status epilepticus* eletrográfico, vários componentes podem ser vistos na análise espectral, sugerindo sobreposição de diferentes padrões eletrográficos.

### 3.2.4) Discussão

De acordo com o observado nos experimentos descritos acima, obtivemos progressão das crises provocadas por Picrotoxina semelhante ao descrito na literatura (Mackenzie et al., 2002;Kaplan and Williamson, 1978), inclusive com latência entre injeção e início das crises semelhante (King GA, 1978). Apesar disso, análise espectral dos traçados de EEG realizados sob anestesia por Uretana não mostrou dados significativos tanto nos traçados basais quanto nos traçados préictais e ictais. Dessa forma, uma análise espectral como a realizada por Mackenzie e col. (Mackenzie et al., 2002), abrangendo as faixas de frequência correspondentes aos principais rítmicos eletroencefalográficos (de 1 a 100 Hz), não foi possível. Entretanto, cabe ressaltar a tendência de aparecimento de componente em torno de 2 Hz no período pré-ictal. Esse fenômeno, observado em todos os animais do grupo experimental, pode sugerir uma sincronização dos circuitos neurais durante o
processo de progressão para crise epileptiforme eletrográfica. Processos de sincronização neural (Engel, Jr., 1996), predominantemente através da modulação de núcleos talâmicos (Steriade et al., 1993) tem sido propostos como um dos mecanismos epileptogênicos.

Além da preservação das características eletroencefalográficas das crises, observamos também componentes motores correlacionados com a atividade epileptiforme eletrográfica. Tais comportamentos (mioclonias faciais e espasmos clônicos) são exatamente os mesmos observados em crises induzidas por Picrotoxina em modelos de animais não anestesiados (Fisher RS, 1989;De Deyn et al., 1992;Mackenzie et al., 2002).

Não observamos na literatura descrições de resposta eletrodecremental préictal relacionadas ao modelo de Picrotoxina. Apesar disso, esse tipo de fenômeno foi observado no modelo de Pilocarpina (Turski et al., 1983) e no modelo de injeções intracerebroventriculares de Tityustoxina (dados de nosso laboratório ainda não publicados), ambos em animais não anestesiados. Entretanto, o(s) mecanismo(s) responsável(eis) por tal fenômeno permanecem desconhecidos. O papel de alterações eletroencefalográficas pré-ictais como componentes indispensáveis ao processo de gênese das crises epilépticas continua em debate, mas trabalhos sobre análise de EEG através de métodos não lineares e Teoria do Caos, com o objetivo de predizer a ocorrência de crises eletrográficas (Lehnertz et al., 1999;Lehnertz et al., 2003;Litt and Echauz, 2002) apontam para tais fenômenos pré-ictais como constituintes comuns às epilepsias. Além disso, alguns padrões eletrográficos específicos, tais como complexos ponta-onda, são utilizados na clínica neurológica, sendo inclusive considerados patognomônicos de crises de ausência.

O estudo de tais alterações pré-ictais, através de metodologia com alta resolução temporal/espacial, poderia abrir novas perspectivas sobre o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento dos estados epilépticos, resultando assim em intervenções terapêuticas destinadas à interromper a progressão do processo epileptogênico, objetivo esse advogado recentemente como sendo um dos principais a serem perseguidos pelos centros de pesquisa em epilepsia (Loscher and Schmidt, 2004).

Concluímos, finalmente, que o regime anestésico adotado (i.e. Uretana), apesar de interferir no padrão eletroencefalográfico basal dos animais, não interfere significativamente nem na evolução eletrográfica e nem nos componentes motores das crises induzidas por Picrotoxina, sendo, dessa forma, um regime anestésido adequado aos nossos experimentos. Além disso, o uso de Uretana não induz alterações respiratórias ou cardiovasculares significativas (Hara and Harris, 2002), fato esse essencial na realização de estudos de RMf, onde tais alterações, caso presentes, podem levar à uma modificação das respostas hemodinâmicas cerebrais o que constitui-se no princípio básico do contraste do tipo BOLD, resultando em interpretação errônea dos dados experimentais.

# 3.3) Avaliação por EEG e RMf Simultâneos do Modelo Animal de Epilepsia por Injeção Intraperitoneal de Picrotoxina

# 3.3.1) Considerações Preliminares

Uma vez caracterizado o modelo de Picrotoxina, através da realização de registros de EEG de superfície, partimos para a realização de protocolo de aquisição simultânea de EEG de superfície e imagens de RMf. Os objetivos principais desse protocolo foram dois.

Inicialmente, ficou patente, a partir dos dados dos experimentos de registro superficial realizados na bancada, a ocorrência de alterações pré-ictais culminando em atividade ictal generalizada. A definição de quais áreas cerebrais estariam envolvidas nesse fenômeno através de registros de EEG superficial carece de resolução espacial adequada. Dessa forma, o objetivo inicial dos experimentos de aquisição simultânea de EEG e RMf foi o de lançar mão da alta resolução espacial da técnica de neuroimagem para avaliar quais áreas estariam envolvidas nas alterações pré-ictais. Nesses experimentos, a aquisição simultânea de EEG é essencial para que possamos correlacionar as imagens obtidas pela RMf com as alterações observadas na atividade elétrica cerebral. Dessa forma, utilizamos os dados do EEG para traçarmos o "paradigma" de análise das imagens de RMf (vide introdução).

Nosso segundo objetivo foi o de validar a técnica de aquisição simultânea de EEG e RMf desenvolvida, utilizando o modelo de Picrotoxina previamente caracterizado.

# 3.3.2) Metodologia

# A) Grupos Experimentais

Ratos Wistar machos, pesando entre 350 a 400 g, fornecidos pelo biotério central da BioMedical Sciences Unity - Queen Mary and Westfield University, foram distribuídos aleatoreamente em dois grupos: (a) 5 animais anestesiados com (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à aproximadamente uretana 11.5 minutos (correspondentes a 10 volumes de imagens de RMf) de registro de EEG superficial em dois canais (hemisférios direito e esquerdo, respectivamente) e aquisição de imagens de ressonância magnética funcional, previamente a injeção i.p. de 1 ml/Kg de salina (grupo controle salina) seguido por aproximadamente 33,5 minutos (correspondentes a 30 volumes de imagens de RMf) de registros, (b) 5 animais anestesiados com uretana (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à aproximadamente 11,5 minutos (correspondentes a 10 volumes de imagens de RMf) de registro de EEG superficial em dois canais (hemisférios direito e esquerdo, respectivamente) e aquisição de imagens de ressonância magnética funcional, previamente a injeção i.p. de 10 mg/Kg de Picrotoxina (solução de 10 mg/ml diluídos em solução 20% de etanol em salina - grupo experimental) seguido por aproximadamente 33,5 minutos (correspondentes a 30 volumes de imagens de RMf) de registros. Todos os registros foram realizados sem interrupção entre os períodos pré e pós injeção, resultando na aquisição de aproximadamente 45 minutos de EEG e 40 volumes de imagens de RMf por animal.

Todas as soluções foram preparadas no dia dos experimentos, possibilitando assim uma melhor homogeneidade de resultados.

### B) Sistema de Registro de EEG Superficial

Utilizamos o sistema de registro de EEG desenvolvido para a realização dos experimentos dentro do aparelho de ressonância magnética, descrito na seção 3.1.

Além disso, o algorítmo de remoção de artefatos foi aplicado em tempo real em todos os registros, resultando em traçados de EEG adequados em todos os experimentos.

### **C)** Procedimentos Experimentais

Inicialmente, os animais foram anestesiados através de injeção i.p. de uretana (1,4 g/Kg). Uma vez anestesiados, os animais foram submetidos a tricotomia do abdomen e implantação de cânula intra-peritoneal (escalpe G25 dobrado a 90°, Figura-21A) de forma a possibilitar que as injeções fossem realizadas de forma remota sem a necessidade de interrupção dos experimentos. Em seguida, procedeuse tricotomia da cabeça e posterior limpeza da pele com álcool, de forma a eliminar tecido epidérmico morto e possibilitar uma superfície adequada de contato para os eletrodos de EEG. Após limpeza da pele, os animais foram fixados à suporte de acrílico compatível com o aparelho de ressonância, através de parafusos auriculares e barra para fixação da arcada dental superior. Realizou-se então fixação dos eletrodos de fibra de carbono (fixos à matriz de acrílico), através de micropore® posicionada ao redor da cabeça (Figura-21B). Uma peguena guantidade de gel eletrolítico é aplicada à ponta dos eletrodos de carbono de forma a fornecer uma interface de contato adequada ao registro de EEG superficial. Deve-se, entretanto, evitar o uso de gel eletrolítico em excesso devido ao risco de se produzir artefatos de susceptibilidade nas imagens de RMf.



**Figura 21** – Fotos mostrando (A) canulação da cavidade peritoneal através de escalpe dobrado a 90° suturado ao abdomen e (B) fixação dos eletrodos (fixados à matriz de acrílico) através da aplicação de micropore®. Além disso, podemos observar nessa figura a fixação do animal ao aparato de contenção através de parafuso auricular.

Os eletrodos de fibra de carbono foram conectados ao pré-amplificador através de cabo de par-trançados, sendo o sinal amplificado e convertido em sinais ópticos através do sistema de fibra-óptica.

Finalmente, um balão preenchido com água destilada e conectado a transdutor de pressão (Biopac Systems Inc. – RX104A) posicionado no exterior do aparelho de ressonância, através de tubo de polietileno também preenchido com água destilada, foi posicionado sobre a região torácica do animal e mantido nessa posição através de uma cinta de velcro de forma a possibilitar a monitorização dos movimentos respiratórios dos animais durante a realização dos experimentos. Além disso, os animais foram também conectados a cobertor térmico controlado por termômetro retal (Harvard Instruments) sendo a temperatura controlada em 37,5  $\pm$  0,3 °C.

Uma vez realizada fixação em aparato de contenção, os animais foram posicionados dentro do aparelho de ressonância. Os sinais de EEG foram transmitidos para o exterior através de par de cabos de fibra óptica de 5 metros para o receptor de fibra óptica, posicionado fora da linha de 15 gauss (linha que indica a intensidade do campo magnético ao redor do scanner), convertidos novamente para

sinais elétricos e então transmitidos para o sistema de condicionamento de sinais (CyberAmp). Após condicionamento dos sinais, conforme descrito na seção 3.1, os sinais analógicos foram convertidos em registros digitais (MP100) sendo então visualizados em computador pessoal.

Os parâmetros de registro de EEG foram os seguintes: amplificação total de 200 vezes – amplificação total efetuada após aplicação dos filtros; filtro passa alta em 1 Hz; filtro passa baixa em 80 Hz; *Notch filter* ativado; frequência de amostragem de 500 registros/seg. Além dos registros de EEG registramos também a temperatura retal e os movimentos respiratórios.

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical.

# D) Protocolo de aquisição de Imagens de Ressonância Magnética Funcional (RMf)

Todos os experimentos de ressonância funcional realizados em nossos trabalhos foram feitos em scanner de 4,7T Oxford 200/300 MkII (Oxford Instruments), acoplado a bobinas de gradiente hpag18 (Oxford Instruments) com abertura de 12 cm e potência máxima de 100 mT/m. Utilizamos bobina transmissora/receptora de RF de quadratura do tipo "gaiola" (Varian). O sistema de controle de aquisição usado foi o <sup>Unity</sup>*Inova* (Varian), constituindo-se em consoles de controle de gradientes e pulso de RF, através de software VNMR 6.1B (Varian) baseado em ambiente UNIX.

Após posicionamento dos animais dentro do aparelho de ressonância, uma série de procedimentos foi seguida de forma a determinar os parâmetros ótimos de aquisição de imagens.

Inicialmente, realizamos calibração da bobina de RF de forma a obtermos o maior sinal possível proveniente dos tecidos. Esse processo faz com que a frequência de oscilação da bobina seja casada com a frequência de resposta dos tecidos fazendo, em outras palavras, com que a bobina ressone na mesma frequência que os tecidos.

Em seguida realizamos imagem piloto através de seguência rápida baseada em gradient-echo, para confirmação da localização do animal dentro do scanner. Após correção do posicionamento, guando necessário, efetuamos shimming do campo magnético principal de forma a aumentar a homogeneidade do mesmo. O processo de shimming consiste em se produzir pequenos campos magnéticos, através de eletro-imãs localizados ao redor das bobinas de gradiente, de forma a compensar deformidades na homogeneidade do campo magnético principal do aparelho de ressonância. O processo de shimming é seguido por determinação da frequência de ressonância dos núcleos de hidrogênio (frequência de Larmor) e determinação da diferença entre a frequência calculada (200,057 MHz à 4,7T) e a frequência real medida. Esse procedimento possibilita a melhora da relação sinal ruído das imagens aumentando a amplitude do sinal de RF proveniente do átomos de hidrogênio. Finalmente, realizamos calibração dos pulsos de RF de forma a obtermos uma deflexão de 180° da resultante dos vetores dos spins dos núcleos de hidrogênio. Essa calibração é essencial para que possamos obter ângulo de deflexão preciso durante a aquisição de imagens.

Obtivemos sempre, para cada animal, um conjunto de imagens estruturais baseadas em *spin-echo* e um conjunto de imagens funcionais baseado em sequência *gradient-echo* multi-eco (3 ecos).

As imagens estruturais foram obtidas através de sequência do tipo *spin-echo* com TR=2,000 s, TE=0,040 s, matriz de aquisição de 128x128 pixels e campo de visão de 3,2x3,2 cm. Foram obtidos 40 planos anatômicos coronais com espessura de 0,5 mm, resultando em voxels anisotrópicos de 0,25x0,25x0,5 mm, englobando todo o cérebro desde cerebelo até bulbos olfatórios. Um total de 8 imagens foram adquiridas para cada plano anatômico sendo a imagem final o resultado da média dessas 8 imagens. Esse processo resulta em aumento da relação sinal ruído das imagens. O processo de aquisição de imagens estruturais leva em torno de 34 minutos para ser completado.

Imagens funcionais foram adquiridas através de sequência de 3 ecos baseada em *gradient-echo* (sensível a T<sub>2</sub>\*), com TR=1,050 s, TE=0,005, 0,010 e 0,015 s, sendo a imagem final composta pela média dos 3 ecos, com matriz de aquisição de 64x64 pixels com campo de visão de 3,2x3,2 cm. Foram obtidos 40 planos coronais idênticos aos obtidos nas imagens estruturais, com espessura de 0,5 mm, resultando em voxels isotrópicos de 0,5x0,5x0,5 mm. Foram coletados 40 volumes por experimento, com tempo total de aquisição de aproximadamente 45 minutos.

Após aquisição, as imagens foram convertidas do formato nativo (sisco) para formato *Analyze*, através dos *softwares* sisco2unc e unc2analyze (Desenvolvidos pelo *Neuroimaging Research Group – IoP King's College London*), possibilitando o posterior pós-processamento das imagens através do pacote de análise de imagens SPM99 (Wellcome Department of Cognitive Neuroscience. Institute of Neurology, UCL. Reino Unido).

#### E) Análise das Imagens de RMf

As images de ressonância funcional foram extensamente pré-processadas anteriormente à análise estatística. Todo o processo de pré-processamento e análise estatítica foi realizado através do pacote de análise de imagens SPM99, com exceção do processo de mascaramento, que foi realizado por meio dos softwares MRIcro<sup>g</sup> e IMGCON<sup>h</sup>.

Imagens de cada animal foram primeiramente visualizadas, através do software MRIcro, de forma a identificar artefatos de movimento que impossibilitassem a análise de volumes adquiridos durante movimentos intensos dos animais. Após isso, as imagens foram realinhadas usando algorítmo "*least-square*" e transformação espacial de corpo rígido, através do software SPM99. Os volumes assim realinhados foram utilizados para criar um volume "médio" de cada indivíduo, resultado da média aritmética de todos os voxels correspondentes de todos os volumes adquiridos.

Após realinhamento, as imagens de cada indivíduo foram "mascaradas" de forma a eliminar todas as áreas das imagens que não correspondessem ao encéfalo. Esse processo foi realizado em dois passos. Inicialmente um arquivo contendo as regiões de interesse para cada plano anatômico do volume médio calculado de cada animal foi criado no formato ANALYZE (Mayo Foundation), através do software MRIcro. Essa "máscara" foi então aplicada à todas as imagens realinhadas do mesmo animal através do software IMGCON. As imagens assim resultantes, continham apenas o encéfalo, sendo os demais voxels da imagem substituídos por zeros. No processo de análise estatística das imagens, a intensidade de todos os voxels é levada em consideração nos cálculos. Dessa

<sup>&</sup>lt;sup>g</sup> http://www.psychology.nottingham.ac.uk/staff/cr1/mricro.html

<sup>&</sup>lt;sup>h</sup> http://www.fmrib.ox.ac.uk/~yongyue/imgcon.html

forma, em caso de experimentos com animais, torna-se necessário eliminar-se os tecidos que não correspondam ao encéfalo de forma a eliminar a interferência dos mesmos nas análises estatísticas.

Após processo de "mascaramento", os volumes (conjunto de planos anatômicos adquiridos durante um TR) de cada animal foram normalizados para um volume modelo, de forma a possibilitar a realização de análise estatística de grupo. O modelo usado foi derivado das imagens médias de todos indivíduos, obtidas no processo de realinhamento, co-registrada à um único indivíduo escolhido aleatoreamente.

Finalmente, todas as imagens devidamente normalizadas foram "suavizadas" através de algorítmo gausiano usando um "kernel" "*full-width half-maximum*" de 1,0 mm (duas vezes a resolução dos planos anatômicos). O processo de "suavização" impõe uma distribuição gaussiana aos dados, um pré-requisito para a utilização da Teoria dos Campos Gaussianos (Worsley KJ and Friston KJ, 1995).

Todo o processo de realinhamento, normalização e suavização, foi realizado através do software SPM99. O mesmo software foi utilizado para realizar as análises estatísticas e gerar os mapas de ativação cerebral.

A análise das imagens foi realizada usando um modelo geral linear de efeito fixo para caracterizar os efeitos fisiológicos em termos de resposta regional específica, analizando cada voxel de forma independente e criando um mapa paramétrico de significância estatística (Friston KJ et al., 1995). O modelo do desenho experimental (ou *input function*) foi derivado da análise do EEG de cada indivíduo. Dessa forma, o EEG de cada animal foi utilizado para determinar em que momento o período ictal iniciou. Uma vez determinado o volume correspondente ao momento extato de início do período ictal, utilizou-se os 10 volumes anteriores, de

forma a utilizar apenas imagens obtidos no período pré-ictal. Esses 10 volumes foram então comparados aos 10 volumes obtidos pré-injeção, sendo a *input funcion* utilizada igual a 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (0 para os volumes obtidos pré-injeção e valores crescentes para o período pré-ictal – de forma a modelar um efeito progressivo da droga). Foram sempre realizadas análises de grupo entre as imagens dos experimentos de injeção de Picrotoxina e as imagens obtidas nos experimentos com injeção de veículo (onde utilizamos sempre os 10 volumes de imagens pré-injeção e dos volumes 15 a 24 obtidos no período pós-injeção). A *input function* utilizada para o grupo controle foi a mesma utilizada para o grupo tratado com Picrotoxina (0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10).

Os mapas estatísticos dos grupos foram sobrepostos a imagens anatômicas também corregistrada ao modelo anatômico padrão. O limiar de significância estatística foi corrigido para comparações múltiplas com limiar de P<0,05 e imagens foram criadas com sobreposição de correlações tanto positivas quanto negativas.

# 3.3.3) Resultados

### A) Análise do EEG obtido durante aquisição de imagens

Inicialmente comparamos os resultados obtidos nos registros de EEG durante os experimentos de RMf com os resultados obtidos na bancada, de forma a determinar possíveis interferências no modelo.

O tempo médio de início de crise nos experimentos de aquisição simultânea de EEG e RMf foi de 17,0  $\pm$  2,1 minutos (média  $\pm$  desvio padrão), enquanto que o mesmo tempo medido nos experimentos de bancada foi de 17,3  $\pm$  1,5 minutos (média  $\pm$  desvio padrão). A análise estatítica (teste-t não pareado) não mostrou

diferença significativa (p=0,76) entre os tempos de início de crise entre os dois grupos. Além disso, resposta eletrodecremental foi observada em todos os animais tratados com Picrotoxina, sendo o tempo médio de início dessa resposta igual a 10,3  $\pm$  2,9 minutos (média  $\pm$  desvio padrão), não sendo esse tempo significativamente diferente (p=0,57; teste-t não pareado) daquele medido nos experimentos de bacanda (9,4  $\pm$  1,3 minutos; média  $\pm$  desvio padrão). Esses dados podem ser observados no Gráfico-06.



**Gráfico 06** – Comparação entre tempos (em segundos) de início de resposta eletrodecremental (T Eletrod) e de início de atividade ictal (T Ictus) entre experimentos realizados na bancada (EEG Bancada) e experimentos de aquisição simultânea (EEG Simultâneo). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em nenhum dos dois intervalos (teste-t não pareado).(barras de erro indicam erro padrão)

Procedemos então à análise qualitativa das alterações morfológicas do EEG obtido durante a aquisição de imagens de forma a determinar se o processo de eliminação de ruídos é compatível com preservação morfológica dos registros.

As alterações morfológicas observadas no EEG dos experimentos de aquisição simultânea foram qualitativamente indistinguíveis daqueles realizados na bancada, apresentando a mesma sequência de alterações. A Figura-22 mostra a progressão das alterações morfológicas do EEG de animal representativo do grupo

tratado com Picrotoxina, submetido a registro simultâneo de EEG e RMf (mostrando apenas registro filtrado através do algorítmo de remoção de artefatos em tempo real). Podemos observar na Figura-22A padrão eletroencefalográfico basal extraído de período imediatamente pré injeção. Na Figura-22B podemos observar morfologia típica de resposta eletrodecremental, semelhante àquela observada nos registros de EEG superficial realizados na bancada. Ao fim dos experimentos todos os animais apresentaram padrão típico de *status epilepticus* eletrográfico (Figura-13C), constituído por atividade em poli-pontas.



3 ......



**Figura 22** – Traçados eletroencefalográficos de canal filtrado através da aplicação do algoritmo de remoção de artefatos, de animal representativo do grupo tratado com Picrotoxina. Sequência de alterações morfológicas identica àquelas observadas nos experimentos de bancada puderam ser também observadas nos experimentos de aquisição simultânea. Em A podemos observar EEG basal, evoluindo para resposta eletrodecremental (B) culminando em *status epilepticus* eletrográfico (C).

A Figura-23 mostra trecho de registro (aproximadamente 40 minutos de duração) de EEG de animal representativo do grupo tratado com Picrotoxina mostrando a evolução temporal da crise. Resposta eletrodecremental abrupta pode ser observada aproximadamente no meio do registro, progredindo para atividade epileptiforme subsequente.



**Figura 23** – Trecho de registro de EEG de animal representativo do grupo tratado com Picrotoxina. O canl mostrado nessa figura foi submetido ao algorítmo de remoção de artefatos em tempo real. Podemos observar resposta eletrodecremental abrupta ocorrendo alguns minutos antes da evolução da crise epileptica eletrográfica.

Finalmente, realizamos análise espectral por Transformada Rápida de Fourrier (FFT) dos registros de EEG filtrados nos períodos pré-injeção, pré-ictal e ictal. A Figura-24 mostra FFT de registro típico (janela de 60 segundos) nesses três intervalos. Nenhum componente significativo pôde ser observado no EEG basal antes da injeção de Picrotoxina (Figura-24A). Entretanto, componente em torno de 2 Hz (Figura-24B seta) foi observado durante resposta eletrodecremental, sendo que outros componentes nas frequências de 5, 8 e 12 Hz, aproximadamente, foram observados no período ictal (Figura-24C setas).



**Figura 24** – Análise espectral (FFT) dos traçados de EEG filtrado nos períodos pré-injeção (A), préictal (B) e ictal (C). Podemos observar ausência de componente significativo no período pré-injeção (A). Presença de componentes dominantes podem ser observados tanto em B (seta fina), em torno de 2 Hz, quanto em C (setas grossas) em torno de 5, 8 e 12 Hz.

Uma vez determinado que os padrões morfológicos observados nos registros de bancada puderam ser também identificados nos registros realizados dentro do aparelho de ressonância, simultaneamente à aquisição de imagens, procedemos à análise das variações das amplitudes do EEG nos períodos pré-injeção, pré-lctus e lctal.

O Gráfico-07 mostra a média das amplitudes dos EEGs nesses três intervalos para os grupos injetado com Picrotoxina (n=5) e controle (n=5)(para o grupo controle, tais períodos foram definidos de acordo com os experimentos de EEG superficial de bancada, ou seja, 60 segundos antes da injeção – pre injeção –, 60 segundos obtidos após 10 minutos de injeção – pre "Ictus" – e 60 segundos após 18 minutos de injeção – "Ictus"). Podemos observar resposta eletrodecremental no período pré-ictal semelhante àquela observada nos experimentos de bancada. A variação percentual média observada no período pré-ictal no grupo experimental foi

de -77,81 ± 44,20 (média ± desvio padrão). As análises estatísticas (teste-t pareado) mostraram que as amplitudes são significativamente diferentes entre os períodos pré-injeção e pré-ictal e entre pré-injeção e ictal (p<0,002 e p<0,001, respectivamente). A Tabela-04 mostra os valores referentes aos três intervalos para os dois grupos além dos percentuais de variação entre os intervalos pré injeção e pre-ictal e pre injeção e ictal.

Amplitude EEG Simultâneo

**Gráfico 07** – Comparação entre as amplitudes médias dos EEG nos períodos pré-injeção, pre-ictal e ictal nos grupos experimental (PTX) e controle (Controle Etanol). Diminuição estatisticamente significativa da amplitude média do EEG basal pôde ser observado no período pré-ictal nos animais injetados com Picrotoxina (\*p=0,0014). Durante a atividade epileptiforme, aumento significativo da amplitude do EEG é observada neste grupo (\*\*p=0,00052) quando comparado com atividade basal (pré-injeção).(barras de erro indicam erro padrão)

	Amplitude Pré-Injeção	Amplitude Pré-Ictus	Amplitude Ictus	% Variação Pré-Ictus	% Variação Ictus
Picrotoxina	1,108 ± 0,093	0,623 ± 0,186*	2,753 ± 0,377**	-77.81 ± 44.20	58.81 ± 8.90
Controle Etanol	1,043 ± 0,051	1,010 ± 0,098	1,014 ± 0,048	-4.02 ± 10.80	-2.94 ± 5.86

**Tabela 04** – Valores de amplitude média corrigida do EEG para os grupos injetado com Picrotoxina e Controle Etanol, nos intervalos pré-injeção, pré-ictus e ictus e variação percentual das amplitude entre pré-injeção e pré-ictus e pré-injeção e ictus. Diferença estatisticamente significativa foi observada apenas no grupo injetado com Picrotoxina entre o período pré-injeção e os demais períodos (\*p=0,0014, \*\*p=0,00052)

#### B) Análise de imagens de RMf

Uma vez determinado que os registros de EEG preservavam suas características, pelo menos de forma qualitativa, quando comparados com registros obtidos em bancada, passamos para processo de análise de imagens.

Como descrito na seção de materiais e métodos acima, no processo de análise de imagens, utilizamos os registros de EEG para determinar o momento em que o período ictal iniciou, determinando, consequentemente, qual volume correspondia a esse momento. Utilizamos, então, os 10 volumes de imagens obtidas antes das injeções e os 10 volumes anteriores ao volume correspondente ao início do período ictal.

A Figura-25 mostra os resultados das análises de imagens comparando-se o grupo injetado com Picrotoxina (n=5) com o grupo injetado com veículo (grupo controle, n=5). Podemos observar uma extensa área de inativação englobando predominantemente caudado-putâmen e núcleo Acumbens (áreas em azul-verde). Ao mesmo tempo, podemos observar algumas áreas de ativação discreta envolvendo amígdala e algumas áreas corticais (áreas em laranja-vermelho). Além disso, algumas outras áreas discretas tanto de ativação quanto de inativação podem ser observadas ao nível do cerebelo, substância negra/hipotálamo e colículos.



**Figura 25** – Mapa paramétrico de ativação (SPM99) mostrando comparação entre grupo tratado com Picrotoxina (n=5) e grupo controle (n=5). Em azul-verde podemos ver áreas que se correlacionaram negativamente com a *input function* enquanto que áreas com correlação positiva são representadas em laranja-vermelho. O máximo global (correlação positiva) localizou-se na amigdala enquanto que o mínimo global localizou-se no caudado-putâmen (barras de escala mostrando valores de T).

A Figura-26 mostra detalhe das áreas de máximos e mínimos globais, mostrando, respectivamente amigdala (Figura-26A) e caudado-putâmen (Figura-26B), bem como as correlações anatômicas com Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos G and Watson C, 1998).



**Figura 26** – Detalhe das áreas de máximo (A) e mínimos (B) globais e correlações anatômicas com o Atlas de Paxinos e Watson(Paxinos G and Watson C, 1998). Em A podemos observar "ativação" da amigdala, bilateralmente, além de áreas de "ativação" de menor intensidade ao nível dos giros denteados (hipocampos) e córtex. Além disso, área de "inativação" englobando caudado pode ser também observada. Em B podemos ver extensa "inativação" do caudado-putâmen.

# 3.3.4) Discussão

Obtivemos em nossos experimentos, tanto imagens de RMf quanto registros de EEG de qualidade comparável àquela obtida em experimentos de aquisição isolados. Como já discutido no capítulo 3.1, a qualidade dos registros de EEG é compatível com a detecção acurada de alterações morfológicas e de variações na amplitude dos registros, sendo que a informação perdida no processo de remoção de artefatos não interferiu de forma significativa na clareza dos traçados. Por outro lado, as imagens de RMf não foram diferentes daquelas obtidas na ausência do sistema de registro de EEG, sendo apropriadas ao processo de análise estatística, resultando em mapas de ativação adequados. Utilizamos sempre eletrodos de EEG superficiais compostos por fibra de carbono. A utilização de eletrodos realmente superficiais, sem que tenha sido necessária a realização de cirurgia para implante dos mesmos, seja nos tecidos subcutâneos, seja na superfície cortical, resultou na eliminação da possibilidade de artefatos de susceptibilidade nas imagens, além de acelerar o processo experimental por ausência de necessidade de período de recuperação dos animais após cirurgia. Apesar disso, alguns trabalhos na literatura mostraram ser possível a aquisição de imagens com ausência de tais artefatos mesmo em animais implantados (Austin et al., 2003;Brinker et al., 1999). Um ponto negativo no registro de potenciais superficiais é a reduzida amplitude dos sinais. Em nossos experimentos não tivemos dificuldades em detectar atividade elétrica cerebral com a utilização de amplificadores e filtros utilizados. Devemos ainda salientar que a utilização de eletrodos profundos ou corticais resultariam em sinais de EEG de maior amplitude e, por sua vez, em relação sinal ruído ainda maior do que a obtida nos experimentos aqui apresentados.

Uma questão importante durante o período ictal foi determinar a possibilidade das pontas observadas ao EEG serem na realidade artefatos de movimentos produzidos por espasmos clônicos dos animais. Acreditamos não ser esse o caso, visto que foram observadas pontas de alta amplitude na ausência de movimentos significativos (avaliados pelo registro de movimentos respiratórios) e pela ausência de atividade epileptiforme mesmo na presença de movimentos violentos dos animais em determinados períodos dos registros. Além disso, observamos latência significativa entre o início da atividade eletroencefalográfica e os espasmos. Finalmente, a morfologia dos registros obtidos durante o período ictal, tanto nos

experimentos de bancada quando nos experimentos de aquisição simultânea, foram qualitativamente iguais.

Um dos pontos de crítica do modelo utilizado é a preservação do componente motor das crises convulsivas. Tais movimentos produzem artefatos nas imagens de RMf inutilizando as mesmas. Isso resultou em perda da maior parte da informação durante o período ictal, impossibilitando a avalição do mesmo. Além disso, a resolução temporal da técnica de imagem utilizada, da ordem de um minuto por volume, impede que uma correlação direta entre o EEG e as imagens de RMf seja feita de forma apropriada, devido à grade variação que pode ocorrer na atividade elétrica cerebral no intervalo de aquisição de um volume. No entanto, a identificação de diferentes fases no decorrer dos experimentos, através da observação das alterações morfológicas no EEG, com determinação adequada de períodos pré-ictal e ictal, possibilitou a análise das imagens correspondentes a cada um desses intervalos de forma precisa. Além disso, durante a realização dos experimentos de RMf, os animais não puderam ser diretamente observados. Dessa forma, a verificação da ocorrência ou não das crises só pôde ser feita através dos registros de EEG. Esse fato reforça a necessidade de se utilizar medidas diretas das alterações produzidas pelo modelo experimental, no lugar de previsões do efeito esperado obtidas a partir de curvas de absorção e concentração sérica de drogas ou curva de alterações comportamentais obtidas em experimentos de bancada. Acreditamos, ainda, que a técnica de aquisição simultânea aqui descrita possa ser útil em experimentos de RM farmacológica onde drogas com conhecida ação sobre o EEG são utilizadas.

O uso de técnica de imagem com maior resolução temporal (p.e. EPI) resultaria em uma maior quantidade de volumes por intervalo de tempo, o que

permitiria uma correlação mais adequada entre alterações EEGráfica e "ativações/inativações" por contraste do tipo BOLD. Outra vantagem da utilização de EPI seria a redução dos artefatos de movimento permitindo a avaliação tanto de alterações pré-ictais quanto de alterações ictais. Análises de imagens do tipo *eventrelated* (onde um evento isolado, p.e. um trem de disparos em poli-pontas, é vinculado a um volume de imagens, possibilitando que diferentes eventos possam ser analisados dentro de um mesmo experimento) possibilitariam a avaliação da participação de diferentes estruturas neurais na gênese de diferentes morfologias epileptiformes. Além da utilização de EPI, o estudo de animais não anestesiados submetidos a bloqueio neuromuscular resolveria a questão de artefatos de movimento nas imagens, além de eliminar a interferência do regime anestésico. Não pudemos, entretanto, realizar estudos com animais não anestesiados ou aplicar o uso de bloqueadores neuromusculares por não ser permitida, no Reino Unido, a realização de experimentos de RMf em animais não anestesiados e de ser necessária licença especial para o uso de bloqueadores neuromusculares.

A despeito disso, acreditamos que os dados mostrados são encorajadores, sendo a técnica adequada para o estudo de alterações cerebrais que ocorrem em período de tempo relativamente longo (p.e. resposta eletrodecremental).

O estudo das alterações pré-ictais e dos fenômenos que participam da gênese dos processos epileptiformes, poderá fornecer informações valiosas sobre as áreas cerebrais envolvidas. Não é nosso objetivo advogar que a técnica de RMf irá substituir outras técnicas de estudo já consagradas. Ao contrário, pelo que veremos a seguir nos experimentos de registro de EEG profundo, os dados obtidos pela técnica de RMf podem fornecer bons indicativos de quais áreas estariam envolvidas em determinados processos, podendo ser utilizados para se restringir a

localização dos possíveis geradores de atividade elétrica registrada superficialmente (Babiloni et al., 2002).

Respostas negativas, ou "inativações", são muitas vezes negligenciadas nos trabalhos de RMf devido às dificuldades inerentes em se interpretar tais respostas. Segundo Frankenstein e col. (Frankenstein U et al., 2002) existem quatro motivos principais para tal dificuldade: (a) a complexidade sináptica das interações entre redes neurais excitatórias e inibitórias, onde tanto inibição pode ser obtida por processos excitatórios (sinapse excitatória sobre neurônio inibitório) quanto excitação pode ser obtida por processo inibitório (sinapse inibitória sobre neurônio inibitório que faz, por sua vez, sinapse com um neurônio excitatório), (b) interações entre a atividade elétrica neural e demanda oxidativa e perfusão sanguínea local, interações essas ainda não bem esclarecidas (Hyder et al., 2002b; Aubert and Costalat, 2002b;McInteyre M et al., 2002), (c) a relatividade tanto de "ativações" quanto de "inativações" com relação à uma condição basal predeterminada e (d) "inativações" podem refletir tanto um redirecionamento de fluxo sanguíneo para áreas metabolicamente mais ativas quanto processo de inibição propriamente dito. A despeito disso, alguns trabalhos mostraram que áreas de inativação em regiões distantes das áreas de ativação refletem provavelmente um mecanismo inibitório ativo e não um simples processo de redistribuição vascular (Hutchinson et al., 1999;Kleinschmidt et al., 1998;McInteyre M et al., 1996). Trabalhos envolvendo estimulação visual comparando diferentes níveis basais de estímulo, mostraram tanto respostas positivas quanto negativas, quando estímulos maiores ou menores que o nível basal foram utilizados, respectivamente (Fransson et al., 1999); análise por RMf do tipo event-related realizada em pacientes epilépticos que apresentavam disparos epileptiformes isolados espontâneos mostraram áreas de inativação no giro

do cíngulo (Archer et al., 2003). Dessa forma, apesar de o verdadeiro significado de áreas de inativação em experimentos de RMf permanecer ainda não esclarecido, consideramos as respostas observadas em nossos trabalhos significativas e coerentes com a visão de que tanto alterações na excitabilidade quanto na inibição sejam importantes na gênese de atividade do tipo epileptiforme (Engel, Jr., 1996). As respostas eletrodecrementais observadas no período pré-ictal em nossos experimentos, sugerem a ocorrência de processo inibitório ativo. Além disso, as áreas de inativação observadas em nossos experimentos são muito mais extensas do que as áreas de ativação, tornando assim pouco provável que as mesmas reflitam um processo de redistribuição vascular para áreas ativas.

Apesar de não ser nosso objetivo avaliar de forma aprofundada o significado das áras de ativação/inativação observadas nos resultados dos experimentos de RMf, devido às limitações descritas anteriormente da técnica (i.e. movimentos dos animais durante o período ictal, baixa resolução temporal da técnica de RMf, interferência do regime anestésico sobre os processos epileptogênicos), todas as áreas observadas em nossos experimentos têm sido implicadas tanto na gênese quanto na modulação de atividade epileptiforme.

Clifford e col. (Clifford et al., 1987), estudando o modelo de crises límbicas induzidas por injeções subcutâneas de lítio-pilocarpina observaram que a atividade epileptiforme eletrográfica iniciava-se, aparentemente, em estruturas prosencefálicas ventrais (nas proximidades do pálido ventral e/ou núcleo acumbens) espalhando-se daí para outras áreas. Além disso, as áreas com maior utilização de glicose foram pálido ventral, globo pálido, hipocampo, córtex entorrinal, amigdala e córtex motor frontal. Em nossos resultados observamos envolvimento predominante de caudado-putâmen/núcleo acumbens e amigdala. Apesar da aparente falta de sensibilidade

das imagens de RMf em detectar áreas de ativação em hipocampo, córtex entorrinal e córtex motor frontal, devemos lembrar que nossos estudos se restringiram ao período pré-ictal, ao passo que o trabalho citado mostra alterações de 2-DG após período de *status epilepticus* eletrográfico.

Outra aparente discrepância entre nossos resultados e os mostrados por Clifford e col. é a inativação de caudado-putâmen/núcleo acumbens. Entretanto, segundo Deransart e col. (Deransart et al., 1998) os núcleos do striatum podem exercer tanto inibição guanto desinibição dependendo da via estriatal ativada. Dessa forma, estimulação das vias diretas estriato-negrais, resulta em inibição da substância negra com consequente desinibição de núcleos talâmicos, com resultante hiperexcitabilidade dos mesmo. Por outro lado, inibição das vias estriatopalidais, resultaria também em inibição da substância negra, através da ativação de projeções sub-talâmicas GABAérgicas, resultando também em desinibição de núcleos talâmicos. Devemos, portanto, considerar a complexidade das entre caudado-putâmen/núcleo acumbens e núcleos interconexões subtalâmicos/talâmicos e substância negra ao avaliarmos o significado dos resultados aqui apresentados.

Estudos sobre estimulação elétrica de caudado-putâmen em modelo felino de epilepsia focal (Sabatino et al., 1992), mostraram uma diminuição tanto na amplitude quanto na frequência de disparo hipocampal durante estimulação. Ainda, inibição de núcleos septais através da injeção local de Picrotoxina, resultou em abolição do efeito modulatório da estimulação de caudado-putâmen, sugerindo que tal modulação se faça através desses núcleos. Dados obtidos em pacientes epilépticos implantados com eletrodos na região do caudado-putâmen (Theodore and Fisher, 2004) mostraram uma redução de disparos epilpetiformes em regiões

neocorticais e temporais mesiais e também na evolução desses disparos para outras áreas, confirmando o efeito modulatório do estriato. Dessa forma, a inativação do caudado-putâmen observada em nossos experimentos, resultaria em desinibição de estruturas hipocampais, entre outras, podendo assim levar a um estado de hiperexcitabilidade.

Concluindo, apesar das aparentes contradições entre o conhecimento atual sobre a fisiopatologia dos processos epileptiformes e as áreas ativadas/inativadas observadas em nossos experimentos, todas as áreas observadas foram descritas na literatura como participantes desses processos. Além disso, ao avaliarmos nossos resultados devemos levar em consideração: (a) as limitações da técnica, (b) o fato de termos estudado o período pré-ictal, (c) o mecanismo de ação da droga utilizada, ou seja, bloqueio da inibição GABAérgica, (d) o significado do contraste BOLD e (e) a complexidade das redes neurais envolvidas.

# 3.4) Avaliação por EEG Profundo do Modelo Animal de Epilepsia por Injeção Intraperitoneal de Picrotoxina

# 3.4.1) Considerações Preliminares

Pelo que foi visto nos experimentos de RMf, obtivemos áreas tanto de "ativação" quanto de "inativação". As áreas de inativação despertaram grande interesse pelo fato de terem sido observadas na presença de resposta eletroencefalográfica eletrodecremental, sugerindo que tais alterações ocorrem de forma significativa no caudado-putâmen.

De forma a testar essa hipótese e melhor caracterizar a participação das demais áreas observadas nos experimentos de RMf nos fenômenos eletrográficos, decidimos realizar registros de EEG profundo nas seguintes áreas: caudado-putâmen (ao nível do núcleo Acumbens), Amigdala, Hipocampo e Córtex.

# 3.4.2) Metodologia

# A) Grupos Experimentais

Ratos Wistar machos, pesando entre 350 e 400g, fornecidos pelo biotério central da *BioMedical Sciences Unity* - *Queen Mary and Westfield University*, foram distribuídos aleatoreamente em dois grupos: (a) 5 animais anestesiados com uretana (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à 10 minutos de registro de EEG profundo em quatro canais (caudado, hipocampo, amigdala e córtex, respectivamente) previamente a injeção i.p. de 1 ml/Kg de veículo (etanol 20% em salina - grupo controle veículo) seguido por 30 minutos de registro de EEG e (b) 5 animais anestesiados com uretana (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à 10 minutos de registro de EEG e (b) 5 animais

EEG profundo em quatro canais (caudado, hipocampo, amigdala e córtex, respectivamente) previamente a injeção i.p. de 10 mg/Kg de Picrotoxina (solução de 10 mg/ml diluídos em solução 20% de etanol em salina - grupo experimental) seguido por 30 minutos de registro de EEG. Os registro de EEG foram realizados sem interrupção entre os períodos pré e pós injeção.

Todas as soluções foram preparadas no dia dos experimentos, possibilitando assim uma melhor homogeneidade de resultados.

### B) Sistema de Registro de EEG Profundo

Para a realização de registros profundos utilizamos eletrodos de platinairidium (A-M Systems Inc. - 767500) implantados estereotáxicamente nas áreas descritas anteriormente de forma aguda, como eletrodos ativos, e eletrodo de fio de cobre estanhado (Molex – 90075-0027) fixado ao osso nasal como referência. Os sinais registrados pelos eletrodos foram conduzidos através de cabo blindado em pares trançados de aproximadamente um metro de extensão até o condicionador de sinais CyberAmp (Axon Instruments) onde os sinais foram tratados. Os parâmetros de condicionamento de sinais foram idênticos nos quatro canais: filtro passa-alta em 1 Hz; amplificação inicial de 10 vezes; filtro passa-baixa de 80 Hz; *Notch Filter* ativo; amplificação final total de 1000 vezes.

Após condicionados, os sinais analógicos foram convertidos em sinais digitais pelo conversor A/D MP100 (Biopac Systems Inc.) utilizando frequência de amostragem de 1000 registros por segundo.

Os registros foram então visualizados através de *software* Acq*Knowledge*® versão 3.7.1. fornecido com o conversor A/D.

Cabe ressaltar que como os registros foram realizados de forma direta, com amplificação real conhecida (1000 vezes), não houve necessidade de se corrigir as amplitudes dos EEG, sendo a amplitude real utilizada nas análises.

# **C)** Procedimentos Experimentais

Inicialmente, os animais foram anestesiados através de injeção i.p. de uretana (1,4 g/Kg). Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados sobre cobertor térmico controlado por termômetro retal (Harvard Instruments), tendo a temperatura controlada em 37,5 ± 0,3 °C, e fixados a estereotáxico (Kopf). A seguir, procedeu-se tricotomia da cabeça e incisão da mesma expondo o tecido subcutâneo e o crânio. Em seguida procedemos limpeza do recido subcutâneo e raspagem do periósteo de forma a expor completamente a superfície craneana. A cabeça do animal foi então nivelada através da medida da posição vertical do bregma e do lâmbda. Após nivelamento as coordenadas do bregma foram anotadas e as coordenadas de implantação dos eletrodos foram então calculadas de acordo com coordenadas derivadas do Atlas de Paxinos & Watson (Paxinos G and Watson C, 1998). A Tabela-05 mostra as coordenadas utilizadas para cada estrutura

	AP	LL	DV
CPu	1,7	2,0	7,0
Нс	-2,5	0,4	4,0
Ami	-2,5	4,0	8,6
Cx	-4,3	2,2	2,0
Cx	-4,3	2,2	2,0

**Tabela 05** – Coordenadas (em mm) de implantação dos eletrodos profundos (CPu = caudadoputâmen; Hc = hipocampo; Ami = amigdala; Cx = córtex; AP = coordenada ântero-posterior; LL = coordenada látero-lateral; DV = corrdenada dorso-ventral).

Procedeu-se então à marcação dos pontos de perfuração do crânio através de caneta fixada ao braço do estereotáxico. Após marcação, os pontos de implante foram feitos através de perfurador elétrico odontológico de alta rotação. Além dos pontos de implante dos eletrodos profundos, um quinto orifício foi perfurado no osso nasal para implante do eletrodo de referência.

Após conferir hemostasia adequada, os eletrodos foram implantados em bloco (montados em matriz de acrílico) sendo a coordenada dorso-ventral determinada pelo eletrodo mais profundo, ou seja, pelo eletrodo amigdaleano.

Os registros de EEG foram iniciados imediatamente após o implante dos eletrodos.

Todos os registros de EEG tiveram duração total de 40 minutos ininterruptos, divididos em 10 minutos pré-injeção e 30 minutos pós-injeção.

Após os registros, os animais foram sacrificados por decaptação sendo as cabeças conservadas em solução de Paraformaldeído 4% para posterior determinação da localização dos eletrodos.

#### D) Determinação da localização de eletrodos profundos por RM

De forma a confirmarmos a localização dos eletrodos profundos de registro de EEG, as cabeças fixadas em paraformaldeído foram analisadas através de imagens de *gradient-echo* e *spin-echo*.

As cabeças foram fixadas ao aparato de contenção e posicionadas dentro do aparelho de ressonância magnética. Todo o procedimento de calibração e ajuste da sequência de imagem foi realizado conforme descrito na seção 3.3.2-D.

Imagens de *gradient-echo* (densidade de prótons) foram obtidas em 40 planos anatômicos ântero-posteriores de orientação coronal com espessura de 0.5

mm, TR=1,050 s, TE=0,010 s, matriz de 128x128 pixels, campo de visão de 3,2x3,2 cm, resultando em voxels de 0,25x0,25x0,5 mm.

Em seguida, imagens de *spin-echo* (sensíveis a  $T_1$ ) foram obtidas nos mesmos planos anatômicos, com mesma resolução espacial, mas com parâmetros de TR=2,000 s e TE=0,040 s.

Foram sempre obtidas média de 6 aquisições de imagens de forma a melhorar a relação sinal ruído dos volumes anatômicos.

Após conversão das imagens para formato *Analyze* (de acordo com o procedimento descrito na seção 3.2.2-D), as mesmas foram observadas em SPM99 para determinação da localização da ponta dos eletrodos de registro.

# 3.4.3) Resultados

O tempo médio para início das crises nos experimentos de injeção de Picrotoxina com registro de EEG profundo não foi estatisticamente diferentes (teste-t não pareado; p=0.7281) do que o tempo médio de início das crises nos experimentos realizados na bancada com registro de EEG superficial. No grupo com registro profundo observamos um tempo médio de 18,8  $\pm$  1,7 minutos (média  $\pm$  desvio padrão).

Resposta eletrodecremental foi observada de forma simultânea em todos os canais de registro, com tempo médio de início de  $10,6 \pm 1,8$  minutos (média  $\pm$  desvio padrão).

O Gráfico-08 mostra comparação entre os tempos médios de início de resposta eletrodecremental e de período ictal entre os registros de EEG superficial realizados na bancada e os registros de EEG profundo. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os dois grupos nos dois períodos.

#### **Tempos Bancada vs Profundo**



**Gráfico 08** – Comparação entre os tempos médios de início de resposta eletrodecremental (T Eletrod) e de início de atividade ictal (T Ictus) entre os registros de EEG superficial realizados na bancada (EEG Bancada) e os registros de EEG profundo (EEG Profundo) em grupos experimentais tratados com Picrotoxina. Diferença estatistica não foi observada em nenhum dos intervalos.(barras de erro indicam erro padrão).

A Figura-27 mostra a evolução das morfologias dos traçados de EEG nas quatro regiões estudadas em animal típico do grupo tratado com Picrotoxina. Os canais de registros correspondem a caudado-putâmen (CPu), hipocampo (Hc), amigdala (Ami) e córtex (Cx), respectivamente. Em A podemos observar os traçados de EEG obtidos antes de injeção de Picrotoxina. Os quatro traçados mostram atividade sincronizada, mas com morfologias discretamente diferentes entre si. Na Figura-27B podemos observar a resposta eletrodecremental presente em todos os canais de registro, sugerindo que esse fenômeno ocorre de forma generalizada em todas as regiões avaliadas. Episódios de disparos em ponta de baixa amplitude podem ser observados em todos os canais (não mostrado) precedendo o aparecimento de atividade em polipontas de alta amplitude observada na Figura-27C de registro obtido durante status epilepticus eletroencefalográfico. A atividade epileptiforme evoluiu invariavelmente para disparos do tipo polipontas de alta amplitude e frequência, com ocorrência de episódios de "trens" de disparos. A ativida ictal é signitivamente mais intensa no eletrodo cortical do que nas demais áreas (Gráfico-09).



**Figura 27** – Evolução do padrão morfológico do EEG profundo em diferentes estruturas, em animal representativo do grupo experimental tratado com Picrotoxina. Em A podemos observar atividade eletrográfica basal. Podemos notar que a atividade no canal referente ao caudado-putâmen (CPu) apresenta amplitude maior do que a dos demais canais. Resposta eletrodecremental (B) foi observada sempre antes do período ictal, iniciando-se de forma simultânea em todos os canais. C mostra atividade ictal típica com disparos em poli-pontas, sendo a atividade cortical (Cx) signitivamente mais intensa do que a dos demais canais. (CPu = caudado-putâmen; Hc = hipocampo; Ami = amigdala; Cx = córtex).

A Figura-28 mostra registro completo (40 minutos) de animal representativo do grupo de registro de EEG profundo após injeção de Picrotoxina. Podemos observar que o registro no caudo-putâmen possui maior amplitude do que nos demais canais. A resposta eletrodecremental (seta) ocorre aparentemente de forma simultânea em todos os canais, assim como a progressão para atividade ictal epileptiforme. Entrentanto, o canal cortical apresenta atividade de maior amplitude do que a dos demais canais no terço final do registro.



**Figura 28** – Evolução temporal das alterações eletroencefalográficas de animal representativo do grupo injetado com Picrotoxina. A seta indica o início da resposta eletrodecremental. Podemos observar maior amplitude no registro de caudado-putâmen (Cpu), antes da resposta eletrodecremental e atividade mais intensa em canal cortical (Cx) no período ictal. (CPu = caudado-putâmen; Hc = hipocampo; Ami = amigdala; Cx = córtex).

A observação comportamental dos animais mostrou que as polipontas de alta amplitude foram sempre acompanhadas por espasmos clônicos com intensidade aparentemente proporcional à amplitude dos disparos epileptiformes. A observação comportamental mostrou ainda que os episódios de disparos em ponta de baixa amplitude foram sempre acompanhados por mioclonias faciais, movimentos clônicos de vibrissas e movimentos mastigatórios. O Gráfico-09 mostra a variação da amplitude do EEG profundo por estruturas nos momentos pré-injeção, pré-ictal e ictal. Podemos observar que a amplitude do EEG do eletrodo implantado no caudado-putâmen, no período pré-injeção, é significativamente maior do que a de todos os outros canais de registro (teste-t pareado dois a dois comparando caudado individualmente com todas as outras regiões; p<0,04). Por outro lado, podemos observar que a amplitude do EEG registrado no eletrodo cortical é significativamente maior do que todos os outros (teste-t pareado dois a dois comparando córtex individualmente com todas as outras regiões; p<0,02) no período ictal. A Tabela-06 mostra os valores das amplitudes médias para cada estrutura nos intervalos medidos assim como o percentual de variação da amplitude entre os intervalos pré-injeção e pré-ictal e pré-injeção e ictal.



**Gráfico 09** – Comparação entre as amplitudes dos EEG profundos registrados em caudado, hipocampo, amigdala e córtex em animais do grupo experimental tratado com Picrotoxina. Podemos observar que a amplitude média dos registros do caudado são significativamente (\*p<0,04; teste-t pareado) maiores do que as amplitudes nas demais estruturas no período pré-injeção. Durante o período pré-ictal todos os canais ampresentam resposta eletrodecremental significativa (\*\*p<0,001), em comparação com as amplitudes médias do período pré-injeção, mas sem diferença estatisticamente significativa entre as amplitudes médias das estruturas. No período ictal, o registro cortical apresenta o maior percentual de variação positiva, sendo sua amplitude média significativamente maior (p<0,02; teste-t pareado) do que nas demais estruturas.(barras de erro indicam erro padrão).
	Amplitude Pré-Injeção (mV)	Amplitude Pré-Ictus (mV)	Amplitude Ictus (mV)	% Variação Pré-Ictus	% Variação Ictus
CPu	1.170 ± 0.288*	0.502 ± 0.142**	1.948 ± 0.085	-137.90 ± 31.94 <sup>#</sup>	39.87 ± 14.60 <sup>£</sup>
Нс	0.827 ± 0.064	0.402 ± 0.077**	1.936 ± 0.092	-109.95 ± 22.65	57.02 ± 4.94
Ami	0.906 ± 0.053	0.420 ± 0.076**	1.894 ± 0.147	-119.88 ± 30.64	51.96 ± 4.72
Сх	0.821 ± 0.095	0.460 ± 0.079**	2.448 ± 0.344***	-81.51 ± 26.63	66.26 ± 3.05 <sup>##</sup>

Tabela 06 - Valores de amplitude média do EEG em caudado-putâmen (CPu), hipocampo (Hc), amigdala (Ami) e córtex (Cx), nos intervalos pré-injeção, pré-ictus e ictus e variação percentual das amplitude entre pré-injeção e pré-ictus e pré-injeção e ictus no grupo experimental tratado com caudado-putâmen apresentaram amplitude Picrotoxina. Os registro obtidos no média significativamente maior do que todas as outras estruturas no período pré-injeção (\*p<0,04) assim como maior variação percentual negativa do registro entre pré-injeção e pré-ictus (#p<0,03). No período pré-ictal, todas as estruturas apresentaram resposta eletrodecremental significativa (\*\*p<0,001), sem diferença estatística entre os canais. No período ictal os registros obtidos no córtex apresentaram amplitude média estatisticamente superior aos demais canais (\*\*\*p<0,02) assim como maior variação percentual positiva do registro entre pré-injeção e ictus (##p<0,01). Finalmente, o registro de caudado-putâmen no período ictal mostrou o menor percentual de variação positiva (£p<0.05).

O Gráfico-10 mostra as variações percentuais na amplitude do EEG registrado em cada uma das regiões, comparando pre-injeção com pré-ictus e préinjeção com ictus, respectivamente. Observamos que o registro obtido no caudadovariação putâmen apresentou percentual negativa (maior resposta eletrodecremental) estatisticamente significativa quando comparada com as demais regiões, na comparação entre os intervalos pré-injeção e pré-ictal. Ao mesmo tempo, o registro obtido no córtex apresentou variação percentual positiva (maior aumento de amplitude) significativamente maior que as demais regiões comparando-se os períodos pré-injeção e ictal. Finalmente, a variação percentual positiva medida no eletrodo posicionado no caudado-putâmen apresentou variação positiva significativamente menor do que as outras regiões quando comparamos os períodos pré-injeção e ictal. Esses dados sugerem que o caudado é a estrutura avaliada com a maior resposta negativa entre as estruturas estudadas sendo ainda a que menos responde de forma positiva à atividade epileptiforme ictal.



**Gráfico 10** – Variações percentuais da amplitude média dos registros de EEG profundo nas diferentes estruturas em animais tratados com Picrotoxina, entre os períodos pré-injeção e pré-ictal (Pré-ictus) e pré-injeção e ictus (Ictus). Podemos observar que os registros de caudado-putâmen (CPu) apresentam a maior variação percentual negativa no período pré-ictal (\*p<0,03) e a menor variação positiva percentual no período ictal (\*\*p<0,04). O registro cortical apresentou, por sua vez, o maior percentual de variação positiva no período ictal (\*\*\*p<0,01). (CPu = caudado-putâmen; Hc = hipocampo; Ami = amigdala; Cx = córtex).(barras de erro indicam erro padrão).

A confirmação do posicionamento dos eletrodos através de imagens de ressonância magnética de alta-resolução mostrou-se efetiva apenas nas imagens de densidade de próton por sequência gradient-echo. Os eletrodos não puderam ser visualizados nas imagens em T<sub>1</sub>. A Figura-29 mostra cortes coronais em T<sub>1</sub> e em densidade de prótons, ao nível dos eletrodos de caudado-putâmen, hipocampo e amigdala. O trajeto dos eletrodos de registro pode ser perfeitamente identificado nas imagens de densidade de prótons, mas não nas imagens em T<sub>1</sub>. Os eletrodos implantados caudado-putâmen, localizaram-se todos (tanto no no grupo experimental quanto no controle) a não mais do que 1,5 mm de distância (em quaisquer dos eixos ortogonais) da coordenada estabelecida. Já os eletrodos de amigdala e de hipocampo localizaram-se a não mais do que 1,0 mm de distância de suas coordenadas (em quaisquer dos eixos ortogonais).



**Figura 29** – Imagens de ressonância magnética de alta-resolução em T1 (esquerda) e em densidade de prótons (direita) com correlação com Atlas de Paxinos e Watson(Paxinos G and Watson C, 1998). Em A podemos observar o trajeto do eletrodo de caudado-putâmen nas imagens de densidade de prótons, confirmando o posicionamento do eletrodo na região desejada (com variação média de ± 1,5 mm em qualquer dos eixos ortogonais), tanto no grupo experimental quanto no grupo controle. Em B podemos ver os trajetos dos eletrodos posicionados em hipocampo e em amigdala. O posicionamento desses eletrodos também foi considerado satisfatório em todos os animais (em ambos os grupos), com variação média de aproximadamente 1,0 mm em qualquer dos eixos anatômicos. As elípses nos desenhos anatômicos correspondem à área de localização de todos os eletrodos nas estruturas desejadas.

Finalmente cabe ressaltar que nenhuma alteração significativa foi observada

no grupo controle injetado com veículo, em nenhum dos intervalos avaliados acima.

# 3.4.4) Discussão

Os resultados dos experimentos de registro de EEG profundo sugerem uma correlação positiva entre a variação da amplitude da atividade elétrica cerebral e o contraste do tipo BOLD observado nos experimentos de RMf. Dessa forma, apesar de todas as áreas avaliadas terem apresentado resposta eletrodecremental simultânea, a intensidade dessa variação negativa foi significativamente maior no

eletrodo implantado ao nível de caudado-putâmen, concordando com os resultados de RMf que mostram área de inativação ao nível dessa estrutura. Isso não significa, entretanto, que inativação ou inibição não esteja ocorrendo também em outras áreas e sim que a inibição foi mais intensa e mais significativa ao nível do caudado-putâmen.

Essa correlação entre amplitude de EEG e contraste do tipo BOLD está de acordo com os mecanismos descritos para ambos. Inicialmente, um dos fatores determinantes da amplitude dos registros de EEG são os potenciais excitatórios pós sinápticos, por serem mais prolongados do que os potencias de ação pré-sinápticos (Schaul, 1998). De forma análoga, Logothetis e col. (Logothetis and Wandell, 2004;Logothetis et al., 1999) sugeriram que as variações hemodinâmicas, e por consequência, as variações de intensidade obtidas por contraste do tipo BOLD, correlacionam-se bem com potenciais de campo locais que, por sua vez, são gerados predominantemente por potencias pós-sinápticos.

A realização de estudos de EEG em animais anestesiados tem sido descrita na literatura (Kayama and Iwama, 1972;Sim and Chua, 1989). Entretanto, uma crítica ao protocolo experimental por nós adotado é o fato de termos realizado cirurgia de implantação de eletrodos e registro de EEG no mesmo tempo cirúrgico, sem que os animais fossem permitidos recuperar do insulto operatório. Apesar obtidos mostrando disso, dados latência para início de resposta OS eletrodecremental e crise e evolução eletroencefalográfica semelhantes aos obtidos nos experimentos realizados na bancada, sugerem ausência de interferência significativa na evolução do processo epileptiforme.

A confirmação das áreas de implante dos eletrodos profundos através de imagens de RM, possibilitou a identificação do trajeto em todos os animais. A

localização exata da ponta dos eletrodos foi limitada pela resolução da técnica (0,25mm<sup>2</sup> por pixel) e pelo contraste das imagens. No entanto, como as estruturas avaliadas são todas relativamente volumosas, o erro inerente da técnica foi considerado aceitável para os fins de nossos trabalhos.

Finalmente, devemos salientar que os resultados aqui apresentados confirmam a importância das informações obtidas através dos experimentos de RMf, não para responder à todas as perguntas sobre a dinâmica de ativação neural no modelo estudado, mas sim para indicar àreas candidatas a estudo mais detalhado através de EEG profundo ou outras técnicas (p.e. microdiálise, fluxometria doppler, eletrofisiologia em *slices* etc). Devemos ressaltar, entretanto, que a realização de RMf isoladamente, sem registro simultâneo de EEG, perderia em especificidade por carecer de uma medida direta das alterações em resposta à droga utilizada. O uso de técnica multi-modal (i.e. EEG+RMf) deve ser, portanto, encorajada em estudos de RMf.

3.5) Avaliação por EEG e RMf Simultâneos do Modelo Animal de Epilepsia por Injeção Intraperitoneal de Pilocarpina

## 3.5.1) Considerações Preliminares

De forma a validarmos a metodologia em modelo experimental de epilepsia já bem conhecido e extensamente descrito na literatura, resolvemos aplicar as técnicas descritas no protocolo de aquisição simultânea de EEG e RMf ao modelo animal de epilepsia por injeção intraperitoneal do agonista colinérgico Pilocarpina.

Como descrito na introdução, observamos, nesse modelo, alterações eletroencefalográficas que incluem resposta eletrodecremental em amigdala e córtex ao mesmo tempo que disparos de alta frequência e voltagem domina a atividade hipocampal.

Desse forma, de posse desses resultados, decidimos replicar os experimentos descritos para o modelo de Pilocarpina, utilizando a metodologia desenvolvida por nós de forma a avaliar o envolvimentos de diferentes estruturas cerebrais nos fenômenos desencadeados.

### 3.5.2) Metodologia

### A) Grupos Experimentais

Ratos Wistar machos, pesando entre 350-400g, fornecidos pelo biotério central da *BioMedical Sciences Unity - Queen Mary and Westfield University*, foram distribuídos aleatoreamente em dois grupos: (a) 5 animais anestesiados com uretana (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à aproximadamente 11,5 minutos

(correspondentes a 10 volumes de imagens de RMf) de registro de EEG superficial em dois canais (hemisférios direito e esquerdo, respectivamente) e aquisição de imagens de ressonância magnética funcional, previamente a injeção i.p. de 1 ml/Kg de salina (grupo controle salina) seguido por aproximadamente 33,5 minutos (correspondentes a 30 volumes de imagens de RMf) de registros, (b) 5 animais anestesiados com uretana (1,4 g/Kg i.p.) submetidos à aproximadamente 11,5 minutos (correspondentes a 10 volumes de imagens de RMf) de registro de EEG superficial em dois canais (hemisférios direito e esquerdo, respectivamente) e aquisição de imagens de ressonância magnética funcional, previamente a injeção i.p. de 400 mg/Kg de Pilocarpina (solução de 400 mg/ml diluídos em salina - grupo experimental) seguido por aproximadamente 33,5 minutos (correspondentes a 30 volumes de registros. Todos os registros foram realizados sem interrupção entre os períodos pré e pós injeção, resultando na aquisição de aproximadamente 45 minutos de EEG e 40 volumes de imagens de RMf por animal.

Todas as soluções foram preparadas no dia dos experimentos, possibilitando assim uma melhor homogeneidade de resultados.

### B) Sistema de Registro de EEG Superficial

Utilizamos o sistema de registro de EEG desenvolvido para a realização dos experimentos dentro do aparelho de ressonância magnética, descrito na seção 3.1.

Além disso, o algorítmo de remoção de artefatos foi utilizado em tempo real em todos os registros, resultando em traçados de EEG adequados em todos os experimentos.

### C) Procedimentos Experimentais

Inicialmente, os animais foram anestesiados através de injeção i.p. de uretana (1,4 g/Kg). Uma vez anestesiados, os animais foram submetidos a tricotomia do abdomen e implantação de cânula intra-peritoneal (i.p.) de forma a possibilitar que as injeções fossem realizadas de forma remota sem a necessidade de interrupção dos experimentos. Em seguida, procedeu-se tricotomia da cabeça e posterior limpeza da pele com álcool, de forma a eliminar tecido epidérmico morto e possibilitar uma superfície adequada de contato para os eletrodos de EEG. Após limpeza da pele, os animais foram fixados à suporte de acrílico compatível com o aparelho de ressonância, através de parafusos auriculares e barra para fixação da arcada dental superior. Realizou-se então fixação dos eletrodos de fibra de carbono (fixos à matriz de acrílico), através de *micropore*® posicionado ao redor da cabeça (vide seção 3.4.2-C). Pequena quantidade de gel condutivo foi aplicado às pontas dos eletrodos de fibra de carbono de forma a fornecer uma interface condutora adequada aos registros de EEG de superfície, mas em quantidade não suficiente para produzir artefatos de imagens.

Os eletrodos de fibra de carbono foram conectados ao pré-amplificador através de cabo de par-trançados, sendo o sinal amplificado e convertido em sinais ópticos através do sistema de fibra-óptica.

Finalmente, os animais foram conectados a balão preenchido com água destilada, conectado a transdutor de pressão (Biopac Systems Inc. – RX104A) posicionado no exterior do scanner, de forma a possibilitar a monitorização dos movimentos respiratórios dos animais durante a realização dos experimentos. Além disso, os animais foram também conectados a cobertor térmico controlado por

termômetro retal (Harvard Instruments) sendo a temperatura mantida em 37,5  $\pm$  0,3 °C.

Uma vez realizada fixação em aparato de contenção, os animais foram posicionados dentro do aparelho de ressonância. Os sinais de EEG foram transmitidos para o exterior através de par de cabos de fibra óptica de 5 metros para o receptor de fibra óptica, posicionado fora da linha de 15G (linha que indica a intensidade do campo magnético ao redor do scanner), convertidos novamente para sinais elétricos e então transmitidos para o sistema de condicionamento de sinais (CyberAmp). Após condicionamento, conforme descrito na seção 3.1, os sinais analógicos foram convertidos em registros digitais (MP100) sendo então visualizados em computador pessoal.

Os parâmetros de registro de EEG foram os seguintes: amplificação total de 200 vezes – amplificação total efetuada após aplicação dos filtros; filtro passa alta em 1 Hz; filtro passa baixa em 80 Hz; *Notch filter* ativado; frequência de amostragem de 500 registros/seg. Além dos registros de EEG registramos também a temperatura retal e os movimentos respiratórios.

Após os registros, os animais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical.

### D) Análise de imagens de RMf

O processo de análise de imagens é o mesmo descrito na seção 3.3.2-E.

### 3.5.3) Resultados

Após injeção i.p. de Pilocarpina (400 mg/Kg) observamos resposta eletrodecremental precoce nos registros de EEG superficial, com tempo médio de início de  $1,7 \pm 1,2$  minutos (média  $\pm$  desvio padrão). Atividade epileptiforme plena foi

observada apenas em 3 dos 5 animais, com tempo médio de início de 10,5  $\pm$  2,4 minutos (média  $\pm$  desvio padrão).

O Gráfico-11 mostra as amplitudes médias corrigidas dos EEG dos grupos experimental e controle, nos intervalos pré-injeção, pré-ictus e ictus (para o grupo controle as medidas do período pré-ictus foram realizadas em janela de 60 segundos 2 minutos após injeção e as medidas do período ictal foram realizadas em janela de 60 segundos 12 minutos após injeção). Resposta eletrodecremental estatisticamente significativa (p<0,001; teste-t pareado) foi observada no período pré-ictal no grupo experimental assim como aumento significativo da amplitude do EEG pôde ser observado no período ictal (p<0,002).



**Gráfico 11** – Variação da amplitude média corrigida do EEG nos grupos experimental e controle nos intervalos pré-injeção (n=5 nos dois grupos), pré-ictal (n=5 nos dois grupos) e ictal (n=3 no grupo experimental; n=5 no grupo controle). Podemos observar diminuição estatisticamente significativa da amplitude do EEG do grupo experimental no período pré-ictal (\*p<0,001), assim como aumento significativo da amplitude do EEG nesse mesmo grupo no período ictal (\*p<0,002).(barra de erro indica erro padrão).

A Figura-30 mostra a evolução das alterações morfológicas em animal representativo do grupo experimental (que apresentou crise eletrográfica plena).

Podemos observar na Figura-30A o padrão eletroencefalográfico basal evoluindo para resposta eletrodecremental significativa (Figura-30B). Atividade epileptiforme pode ser observada na Figura-30C, sendo esse tipo de atividade observada apenas em 3 dos 5 animais do grupo experimental.



**Figura 30** – Progressão das alterações morfológicas dos traçados de EEG de animal representativo do grupo experimental (Pilocarpina i.p.). Em A podemos observar traçado de EEG basal antes da injeção de Pilocarpina. Resposta eletrodecremental precoce pode ser observada em B. C mostra traçado durante *status epilepticus* eletrográfico. Podemos observar atividade de poli-pontas de alta frequência ("trens" de disparo).

Os mapas paramétricos de ativação obtidos da análise das imagens de RMf correspondentes ao período de resposta eletrodecremental (comparação entre grupos experimental e controle) são apresentados na Figura-31. Podemos observar área de correlação positiva (ativação) ao nível de caudado-putâmen anterior (núcleo Acumbens) assim como áreas de correlação negativa (inativação) envolvendo predominantemente as amigdalas.

A Figura-32 mostra em detalhes as áreas de "ativação" e "inativação" apresentadas na Figura-31, bem como correlação anatômica de acordo com Atlas de Paxinos e Watson. Podemos observar extensa área de "ativação" anterior, ao nível do caudado-putâmen, com máximo global localizado aproximadamente ao

nível do núcleo Acumbens (Figura-31A). Ao mesmo tempo, podemos observar extensa área de "inativação" de amigdalas, mas com mínimo global localizado mais lateralmente, expandindo para áreas corticais (Figura-31B).



**Figura 31** – Mapa paramétrico de ativação comparando grupos experimental (n=5) e controle (n=5). Máximo global foi observado ao nível de caudado-putâmen (porção anterior) ao passo que mínimo global foi observado ao nível de amigdala lateral. (Barra de escala indica valores de T)



**Figura 32** – Detalhe dos máximos e mínimos globais. Em A podemos observar a localização do máximo global ao nível do núcleo Acumbens, com envolvimento de extensa área de caudadoputâmen. Em B podemos observar localização de mínimo global ao nível de amigdala lateral com extensão das áreas de inativação para regiões corticais. À direita podemos observar à localização das áreas "ativadas/inativadas" de acordo com atlas de Paxinos e Watson(Turski et al., 1983). As áreas marcadas em vermelho e em azul correspondem aos máximo e mínimo globais mostrados nas imagens de RMf.

### 3.5.4) Discussão

Os resultados mostrados nos experimentos de aquisição simultânea de EEG e RMf no modelo de Pilocarpina, são compatíveis com os dados da literatura (Cavalheiro, 1995;Hamani and Mello, 1997;Turski et al., 1983). Apesar de termos previsto áreas de ativação ao nível de estruturas hipocampais, as imagens de RMf falharam em mostrar ativação significativa nas mesmas. Na descrição das alterações eletroencefalográficas apresentadas por Turski e col. (Turski et al., 1983), apesar de o registro hipocampal ter apresentado alterações precoces no rítmo de disparo, passando a mostrar atividade de alta frequência, variação de amplitude foi observada predominantemente em eletrodo amigdaliano, sendo esse o registro que apresentou a maior variação negativa. De acordo com o que sugerimos na discussão dos registros simultâneos de EEG e RMf no modelo de Picrotoxina, o contraste BOLD correlaciona-se bem com variações de amplitude do EEG. Dessa forma não nos surpreende termos obtido inativação significativa ao nível de estruturas amigdalianas ao passo que falhamos em observar ativação em hipocampo.

Ao contrário do que foi observado nos experimentos com Picrotoxina, observamos ativação de caudado-putâmen/núcleo acumbens. Mais uma vez devemos salientar a complexidade das interrelações entre os núcleos envolvidos no processo epileptogênico. Apesar disso, Sabatino e col. (Sabatino et al., 1992) e Vella e col. (Vella et al., 1991) observaram que a hiperatividade hipocampal se propagava para o núcleo acumbens, em modelo animal de epilepsia focal por deposição de penicilina. Clifford e col. (Clifford et al., 1987) observaram que a crise induzida por pilocarpina se iniciava em estruturas prosencefálicas, entre elas caudado-putâmen/núcleo acumbens. Barone e col. (Barone et al., 1993) observaram acúmulo de FOS ao nível de estriato e núcleo acumbens em animais submetidos a *status epilepticus* induzido por injeções sistêmicas de Pilocarpina. Finalmente, Scorza e col. (Scorza et al., 2002) mostraram acúmulo de 2-DG em caudado-putâmen de ratos após 6 horas de *status epilepticus* induzido por Pilocarpina. Esses dados corroboram os nossos resultados mostrando ativação de estriato/núcleo acumbens.

Em nossos experimentos não pré-tratamos os animais com escopolamina de forma a evitarmos mais um fator de confusão nas análises das imagens de RMf. Como a escopolamina é utilizada no modelo animal de epilepsia por injeções de Pilocarpina apenas para evitar mortalidade dos animais por efeitos colinérgicos dessa droga (Cavalheiro, 1995) e como nossos experimentos foram todos terminais, sendo os animais sacrificados ao fim de cada experimento, consideramos aceitável a omissão do pre-tratamento com droga anti-colinérgica.

Um dos fatores complicantes nos experimentos de RMf com o modelo de Pilocarpina foi a preservação do componente motor das crises epileptiformes, aparecendo precocemente após injeções. Tais movimentos resultaram em perda de alguns dos volumes de imagens, devido a artefatos de movimento, diminuindo assim a quantidade de informação colhida nos experimentos. No entanto, conseguimos obter mapas de ativação significativos com resultados compatíveis com as alterações esperadas. Mais uma vez, acreditamos que a utilização de técnica de imagem com melhor resolução temporal (i.e. EPI) e o uso de bloqueadores neuromusculares resultaria em obtenção de imagens adequadas mesmo durante período ictal.

A ausência de crise eletrográfica em dois animais do grupo experimental pode ser explicada pelo curto período de registro desses animais após injeções (i.e. 30 minutos). De acordo com Turski e col., atividade epileptiforme plena só foi observada nos eletrodos corticais 30-50 minutos após injeções. Entretanto, observamos resposta eletrodecremental precoce (em torno de 2 minutos após injeção de Pilocarpina) em todos os animais, sendo esse fenômeno o de maior interesse em nossos estudos.

Acreditamos, dessa forma, ter validado a aplicação de nossa metodologia através do estudo do modelo animal de epilepsia por injeção de Pilocarpina.

# 3.6) Análise comparativa dos mapas paramétricos dos modelos de Picrotoxina e Pilocarpina

### 3.6.1) Considerações Preliminares

Por que o uso de drogas que atuam em sistemas neuroquímicos diferentes (GABA e Acetilcolina) resultam em fenomenologia tão semelhante? Qual o significado da resposta eletrodecremental observada no período pré-ictal? Existe um circuito epileptogênico comum?

Para verificarmos se a avaliação dos modelos experimentais de epilepsia por imagens de RMf pode fornecer dados adicionais no sentido de tentar responder à algumas dessas perguntas, realizamos comparação entre os dois grupos experimentais (Picrotoxina vs Pilocarpina) de forma a detectarmos diferenças e semelhanças nas imagens colhidas no período pré-ictal.

## 3.6.2) Metodologia

Devido ao uso de veículos diferentes para diluirmos Picrotoxina e Pilocarpina (etanol 20% e salina, respectivamente), realizamos inicialmente comparação entre os grupos controle de forma a descartar efeito do etanol nos resultados das análises de imagens do grupo de Picrotoxina.

O procedimento de análise de imagens foi o mesmo tanto na avaliação dos grupos controle quanto na dos grupos experimentais. Utilizamos sempre as mesmas imagens pré-processadas que resultaram nos dados mostrados nas seções 3.3 e 3.5 sendo que todas as imagens foram previamente normalizadas para o mesmo modelo de cérebro, o que nos permitiu realizar as comparações entre os grupos.

Foram realizadas comparações de covariável em multiplos-grupos através do teste estatístico AnCova, com limiar de significância estatística (P<0,05) corrigido para comparações múltiplas. A *input-function* usada foi a mesma das análises previamente apresentadas (0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10). Foram sempre determinados os contrastes entre grupos considerando, inicialmente variações positivas em um grupo contra variações negativas no outro grupo e vice-versa (+1 vs -1 e -1 vs +1, respectivamente), resultando em mapa paramétrico onde as áreas "ativadas" correspondem aos voxels que apresentaram correlação positiva com a *input function* no primeiro grupo quando comparado com o segundo grupo e as áreas "inativadas" correspondem, analogamente, aos voxels com correlação negativa.

Os mapas de ativação foram então sobrepostos ao modelo anatômico padrão gerado por ocasião das análises iniciais.

### 3.6.3) Resultados

A Figura-33 mostra o mapa paramétrico para a comparação entre grupo controle etanol e grupo controle salina. Não foram observados *clusters* (conjunto de voxels contíguos) significativos de ativação/inativação nessa comparação, sugerindo que os efeitos do etanol, quando comparados isoladamente com o controle salina, não são significativos. Dessa forma, consideramos ser válida a comparação entre os grupos Picrotoxina e Pilocarpina, a despeito do uso de veículos diferentes para diluir cada droga.



**Figura 33** – Mapa paramétrico de ativação comparando grupo controle etanol e grupo controle salina. Não foram observados *clusters* significativos de ativação/inativação. (Barra de escala indica valores de T)

Em seguida, efetuamos a comparação entre os grupos Picrotoxina e Pilocarpina. A Figura-34 mostra mapa paramétrico de ativação comparando as áreas com correlações positivas e negativas em relação a *input function* em ambos os grupos quando comparados com o controle salina. Podemos observar *cluster* de inativação ao nível das amigdalas (porção anterior) e núcleos septais e *cluster* de ativação em áreas corticais anteriores (área motora primária).



**Figura 34** – Mapa paramétrico de ativação mostrando comparação entre áreas de resposta semelhante entre os grupos Picrotoxina e Pilocarpina (*conjunction analysis*). Podemos observar extensa área de inativação envolvendo os núcleos septais e amigdalas anteriores e córtex insular. Áreas de ativação podem ser observadas predominantemente no córtex motor primário. (Barra de escala indica valores de T)

A Figura-35 mostra as mesmas alterações mostradas na Figura-34 em detalhes, com indicação das áreas correspondentes de acordo com atlas de Paxinos

e Watson (Turski et al., 1983).



**Figura 35** – Detalhes das áreas de ativação/inativação obtidas pela comparação dos grupos Picrotoxina e Pilocarpia em relação ao controle salina. Essa análise mostra as áreas que apresentaram correlações positivas e negativas em ambos os grupos. Podemos observar extensa área de inativação a nível dos núcleos septais (C) e área amigdalóide anterior (B). Pequenas áreas de correlação positiva podem ser observadas ao nível do córtex motor primário (A).

Finalmente, realizamos comparação entre o grupo tratado com Picrotoxina e o grupo tratado com Pilocarpina, de forma a avaliar áreas de "ativação/inativação" diferentes em cada grupo. Os resultados apresentam as áreas de correlação positiva e negativa do grupo de Picrotoxina em comparação com o grupo de Pilocarpina. Podemos observar, na Figura-36 extensas áreas de "ativação" ao nível dos córtex motores primários e ao nível das amigdalas/córtex entorrinal. Áres de "inativação" foram observadas predominantemente ao nível do caudado-putâment/núcleo acumbens e núcleos talâmicos. A Figura-37 mostra esses *clusters* em detalhe com correlação anatômica de acordo com atlas de Paxinos e Watson.



**Figura 36** – Mapa de ativação mostrando comparação entre grupo tratado com Picrotoxina e grupo tratado com Pilocarpina. Áreas em laranja-vermelho indicam regiões onde a intensidade do sinal foi significativamente maior no grupo tratado com Picrotoxina em comparação com o grupo tratado com Pilocarpina, de acordo com a *input function* utilizada; de forma análoga, áreas em verde-azul indicam áreas com intensidade de sinal significativamente menor, quando comparamos grupos tratados com Picrotoxina e Pilocarpina. Podemos observar áreas de "ativação" predominantemente ao nível dos córtex motores primários e amigdalas/córtex entorrinal. *Clusters* de "inativação são observados predominantemente ao nível de caudado-putâmen/núcleo acumbens e núcleos talâmicos. (Barra de escala indica valores de T)



**Figura 37** – Detalhes das áreas "ativadas/inativas" obtidas da comparação entre os grupos tratados com Picrotoxina e Pilocarpina. Podemos observar áreas de "ativação" predominantemente nos córtex motores primários (A) e amigdalas (B). Áreas de "inativação" ocorrem predominantemente ao nível de caudao-putâmen/núcleo acumbens (A) e núcleos talâmicos (B). À direita podemos ver correlações anatômicas de acordo com atlas de Paxinos e Watson. Áres marcadas em vermelho correspondem às regiões com correlação positiva enquanto que as em azul mostram áreas de "inativação" ou correlação negativa.

# 3.6.4) Discussão

Por que drogas que atuam em sistemas neurotransmissores tão diferentes resultam em fenômenos tão semelhantes? Morfologias semelhantes observadas em registros eletroencefalográfico em modelos de síndromes epileptiformes diferentes são originárias dos mesmos substratos neurais? Existe um circuito epileptogênico comum a todos os tipos de epilepsias? A análise comparativa de diferentes modelos de epilepsia poderia fornecer dados valiosos na busca das respostas para essas perguntas.

Dessa forma, decidimos realizar análise comparativa dos modelos animais de epilepsia por injeções sistêmicas de Picrotoxina e Pilocarpina, não com o intuito de respondermos às perguntas feitas na introdução dessa discussão, mas para avaliarmos as reais contribuições que poderiam vir da técnica por nós desenvolvida. A ativação das áreas motoras primárias, observada na comparação das similaridades entre os dois modelos, não demanda maiores discussões, visto que componentes motores similares foram observados em ambos os modelos.

Já a inativação das amigdalas, observada na mesma análise, deve ser avaliada com precaução. Acreditamos que tal inativação, a despeito da ativação observada na análise isolada do modelo de Picrotoxina, seja resultado do grau de inativação observado no modelo de Pilocarpina, o que resultaria em variação significativa nas análises estatísticas mesmo que tal inativação não tenha sido observada no modelo de Picrotoxina. Além disso, tal inativação foi observada em áreas mais dorsais, o que pode, na realidade, representar um efeito da redistribuição vascular, de acordo com o discutido anteriormente sobre a relatividade das respostas de ativação/inativação em relação ao estado funcional basal local. Apesar disso, acreditamos ser essa possibilidade um tanto quanto remota visto que nenhuma área de ativação significativa foi observada nas proximidades das áreas de inativação.

A inativação dos núcleos septais resultaria em desinibição hipocampal (Sabatino et al., 1992) o que explicaria a resposta eletrográfica observada nessa estrutura no modelo de Pilocarpina (Turski et al., 1983). O mecanismo pelo qual a estimulação colinérgica levaria a uma inativação de núcleos septais poderia ser explicado através de um aumento da inibição GABAérgica proveniente de terminações estriatais (que seriam, por sua vez, estimuladas por terminações colinérgicas córtico-estriatais), ou através de alça de *feedback* negativo hipocampal. No caso do modelo de Picrotoxina (inibição GABAérgica), a inibição dos núcleos septais poderia ser resultado do bloqueio da inibição de projeções inibitórias,

resultando em inibição, ou por um processo de inibição global, o que parece ser sugerido pelos registros de EEG (resposta eletrodecremental generalizada).

Com relação à análise das diferenças entre os dois modelos, as principais diferenças foram inativação de núcleo acumbens (no grupo de Picrotoxina em relação ao grupo de Pilocarpina) e a ativação das amigdalas e dos córtex motores primários.

Mais uma vez devemos considerar que a comparação apresentada mostra apenas o estado relativo de um modelo em comparação ao outro. Ou seja, no caso da inativação do núcleo acumbens, o que a análise nos indica é que no modelo de Picrotoxina, tal estrutura apresentou uma inativação significativa, quando comparada ao modelo de Pilocarpina. Por outro lado, não foi observada diferença ao nível de caudado-putâmen, que apresentou extensa inativação no modelo de Picrotoxina. Tal resultado pode sugerir que a extensão das áreas de ativação, do núcleo acumbens para o estriato, observada no modelo de Pilocarpina, não represente uma ativação significativa quando comparada com uma condição basal diferente (i.e. Picrotoxina).

A maior ativação das amigdalas/córtex entorrinal, no modelo de Picrotoxina em relação ao modelo de Pilocarpina está de acordo com os dados observados nas imagens de RMf. A maior ativação dos córtices motores primários, por sua vez, pode representar apenas uma ativação mais intensa dessas áreas no modelo de Picrotoxina, visto que o componente motor das crises provocadas por essa droga foram mais intensos do que o observado nas crises induzidas por Pilocarpina. Apesar de nossas avaliações englobarem apenas o período pré-ictal, não podemos descartar presença de atividade ictal inicial ocorrendo nos volumes finais das imagens selecionadas para análise, o que resultaria em presença de áreas de ativação mesmo durante o período de respostas eletrodecrementais.

Finalmente, cabe ressaltar que as drogas utilizadas nos diferentes modelos foram diluídas em diferentes veículos. Poderíamos argumentar que o uso de solução 20% de etanol, nos experimentos com Picrotoxina, poderia resultar em influência significativa nos resultados observados, invalidando a comparação feita entre Picrotoxina e Pilocarpina. No entanto, como mostrado através da comparação entre etanol 20% e salina, a influência do etanol sobre os experimentos pode aparentemente ser negligenciada.

Pelo que expomos acima, vários são os pontos de crítica às comparações feitas. No entanto, acreditamos que as potencialidades desse tipo de abordagem superam em muito tais críticas. Mais uma vez, devemos salientar que o uso de técnica de imagem com maior resolução temporal e o estudo de modelos animais não anestesiados, sob bloqueio neuromuscular, contribuiriam em muito para a melhora tanto da sensibilidade quanto da especificidade da técnica. Além disso, a metodologia aqui apresentada possibilitaria o estudo seriado e repetido de um mesmo grupo de animais, o que resultaria em uma compreensão mais detalhada da dinâmica de evolução dos processos epileptogênicos.

# 4 – Considerações Finais

Pelo que apresentamos ao longo desse trabalho, acreditamos ter desenvolvido técnica de aquisição simultânea de EEG e RMf que preencheu todos os objetivos estabelecidos na elaboração desse projeto.

Todos os circuitos aqui apresentados foram construídos utilizando-se técnicas básicas de eletrônica, com componentes de fácil aquisição e de baixo custo.

Durante a realização de nossos experimentos, utilizamos sempre o mesmo sistema construído originalmente sem que o mesmo apresentasse nenhum tipo de problema que necessitasse de manutenção. Dessa forma, acreditamos ter obtido sistema robusto o suficiente para a utilização repetida em ambiente de pesquisa.

A respeito da flexibilidade do sistema, experimentos piloto mostraram que é possível a obtenção de registros de ECG e de potenciais evocados durante a aquisição de imagens. No entanto, algumas modificações seriam necessárias para a optimização do sistema para tais tipos de registro.

Experimentos piloto foram também realizados em pacientes humanos, dentro de aparelho clínico, para a detecção de reflexo de piscamento. Apesar de, novamente, necessitarmos de algumas modificações no sistema para obtermos registros eletromiográficos adequados durante a aquisição de imagens, os dados preliminares são promissores.

O estudo dos modelos animais de epilepsia através de nossa técnica, mostrou boa concordância com os dados da literatura sobre a fisiopatologia dessa doença. Ainda mais importante foi o fato de não termos observado nenhum tipo de ativação/inativação não relacionável à essa patologia. Além disso, estudos por RMf e EEG superficial podem ser feitos de forma repetitiva permitindo o estudo

longitudinal de um mesmo grupo de animais. Tal tipo de estudo forneceria dados importantes sobre a dinâmica de evolução dos processos epileptogênicos.

Os ganhos em se obter informações de duas técnicas utilizadas de forma simultânea foram evidentes. Os dados dos registros de EEG serviram não só para controlar as condições experimentais, possibilitando identificar animais que não apresentaram crise, mas também permitiram uma caracterização tanto temporal quanto quantitativa das mesmas, possibilitando que dados objetivos pudessem ser utilizados durante as análises de imagens. Por outro lado, dados anatômicos fornecidos pelas imagens de RMf, serviram como bons indicativos de quais áreas deveriam ser alvo de avaliações mais detalhadas, quer seja por técnicas de eletrofisiologia invasiva, quer seja por outras técnicas (microdiálise, fluxometria doppler etc).

Devemos ressaltar, uma vez mais, que a técnica de imagem utilizada em nossos trabalhos possui resolução temporal limitada, impossibilitando a correlação direta entre os registros de EEG e as imagens de RMf. O uso de técnicas como EPI resultaria na aquisição de uma quantidade maior de informações por unidade de tempo, possibilitando assim a aplicação de técnicas de análise tais como *event-related* de forma a estudar os circuitos geradores de fenômenos transitórios de curta duração, tais como diferentes morfologias de disparos epileptiformes.

Outro fato limitante em nossos experimentos foi o uso de animais sob regime anestésico que permitisse preservação do componente motor das crises. Duas são as criticas a serem feitas. Inicialmente, o uso de drogas anestésicas sempre interferem, mesmo que de forma pouco significativa, na fisiologia cerebral, o que pode resultar em distorção dos resultados. Em segundo lugar a preservação do componente motor das crises epileptiformes causou artefatos de imagens com

consequente perda de informação. Nesse caso, o uso de drogas bloqueadoras neuromusculares possibilitaria a realização de experimentos em animais não anestesiados, ao mesmo tempo eliminando os artefaros de movimentos nas imagens de RMf.

Finalmente, devemos salientar a grande contribuição da aquisição simultânea de EEG na interpretação dos dados obtidos por RMf. A aparente correlação entre variação de amplitude de EEG e áreas de ativação/inativação da RMf, fornece um vínculo objetivo entre atividade elétrica cerebral e contraste do tipo BOLD. Tal correlação é essencial em estudos de epileptologia, mas possuem também aplicações imediatas em estudos fisiopatológicos ou de mecanismos de ação de drogas onde altereações reprodutíveis podem ser identificadas nos registros de EEG.

Acreditamos, portanto, que o desenvolvimento da técnica de aquisição simultânea de EEG e RMf deve ser continuado de forma a optimizar os resultados obtidos e ampliar a funcionalidade da mesma.

# 5 - Conclusões

- A metodologia desenvolvida é adequada à aquisição simultânea de EEG e RMf em modelos animais de epilepsia;
- A qualidade das imagens de RMf é preservada mesmo na presença do sistema de registro de EEG;
- A morfologia dos registros de EEG obtidos nos experimentos de bancada e nos experimentos de aquisição simultânea de EEG e RMf são indistinguíveis;
- É possível utilizar os registros de EEG na definição da *input function* para as análises das imagens de RMf;
- É possível observar áreas de ativação/inativação nas imagens de RMf mesmo na presença do sistema de EEG;
- As áreas de ativação/inativação observadas nos experimentos de RMf estão de acordo com os dados da literatura sobre epileptogênse nos modelos estudados;
- Nossos resultados sugerem que o contraste do tipo BOLD correlaciona-se bem com as variações de amplitude nos registros de EEG;
- A metodologia poderá ser aplicável, com algumas modificações, a outros tipos de registros e em ambiente clínico;
- Técnicas de imagem com melhor resolução temporal (EPI) devem ser utilizadas simultaneamente ao registro de EEG para os estudos de modelos animais de epilepsia;

 Modelos utilizando-se animais não anestesiados sob bloqueio neuromuscular devem ser utilizados em futuros estudos.

# Índice das Figuras

FIGURA 01 – FOTO DE CRÂNIO DO PERÍODO PRÉ-COLOMBIANO MOSTRANDO TREPANAÇÃO
REALIZADA COM FINS TERAPEUTICOS5
TABELA 01 – CLASSIFICAÇÃO DE CRISES CONVULSIVAS MODIFICADA (ILAE)9
TABELA 02 – ALGUNS MARCOS TÉCNICOS E CIENTÍFICOS NO DESENVOLVIMENTO DOS
APARELHOS DE RM{149} 33
FIGURA 02 – BLOCO ESQUEMÁTICO EXPLICANDO OS MECANIMOS DO CONTRATE DO TIPO
BOLD{169}40
FIGURA 03 - BLOCO ESQUEMÁTICO RESUMINDO OS PASSOS PRINCIPAIS DO PROCESSO DE
ANÁLISE DE IMAGENS (VIDE TEXTO – MODIFICADO DO MANUAL DO USUÁRIO DO

FIGURA 04 – ELETRODOS DE FIBRA DE CARBONO. À ESQUERDA, FOTO DE ELETRODO DE FIBRA DE CARBONO DESENVOLVIDO PARA REALIZAÇÃO DE EEG SIMULTÂNEO COM RMF. O ELETRODO MOSTRADO NA FOTO POSSIBILITA A REALIZAÇÃO DE REGISTROS EM DOIS CANAIS, SENDO O ELETRODO CENTRAL USADO COMO REFERÊNCIA E OS DAS EXTREMIDADES COMO ELETRODOS DE REGISTRO. À DIREITA, DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO OS COMPONENTES DO ELETRODO.------62

APLICATIVO SPM99). ------ 43

- FIGURA 05 FOTO MOSTRANDO CABO DE CONEXÃO USADO DENTRO DO APARELHO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA. PODEMOS OBSERVAR O CONECTOR DO TIPO CIRCUITO INTEGRADO EM UMA DAS EXTREMIDADES E TIPO TELEFÔNICO NA EXTREMIDADE OPOSTA. O FIO PRETO SAINDO DA EXTREMIDADE DO CONECTOR DO TIPO CIRCUITO INTEGRADO É SOLDADO A UMA AGULHA (G25) QUE É INSERIDA NO TECIDO SUBCUTÂNEO DO ANIMAL DE FORMA A POSSIBILITAR O ATERRAMENTO DO MESMO. -- 64
- FIGURA 06 DESENHO ESQUEMÁTICO DO CIRCUITO ELETRÔNICO PRE-AMPLIFICADOR ADOTADO. PODEMOS OBSERVAR O FILTRO RC DO TIPO PASSA-ALTA COM FREQUÊNCIA DE CORTE DE 1.56 HZ, POSICIONADO ENTRE OS DOIS ESTÁGIOS AMPLIFICADORES. A AMPLIFICAÇÃO TOTAL FORNECIDA POR ESSE CIRCUITO É DE 2000 VEZES. PB = FREQUÊNCIA DE CORTE DO FILTRO PASSA-BAIXA; REF = SINAL REFERÊNCIA.----- 66
- FIGURA 07 IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE RATO OBTIDAS COM SEQUÊNCIA GRADIENTE-ECHO. EM A PODEMOS VER IMAGENS COM PRESENÇA DE ARTEFATOS DE RF (SETAS VERMELHAS), PROVOCADOS PELO SISTEMA DE REGISTRO DE EEG CONVENCIONAL E RUÍDO DE FUNDO COMPROMETENDO QUALIDADE DAS IMAGES. EM B PODEMOS VER IMAGENS DO MESMO ANIMAL (MESMA SEQUÊNCIA DE IMAGEM) NA

AUSÊNCIA DO SISTEMA DE REGISTRO, MOSTRANDO ELIMINAÇÃO COMPLETA DOS ARTEFATOS. ------67

- FIGURA 08 CIRCUITO AMPLIFICADOR/TRANSMISSOR. O DESENHO ESQUEMÁTICO DO CIRCUITO COMPLETO (A) MOSTRA O ESTÁGIO PRÉ-AMPLIFICADOR, COM O FILTRO RC PASSA-ALTA, O TRANSMISSOR DE FIBRA ÓPTICA E O RECEPTOR DE FIBRA ÓPTICA. O CIRCUITO RECEPTOR, APESAR DE ESTAR NO MESMO DESENHO ESQUEMÁTICO, LOCALIZA-SE NO EXTERIOR DO APARELHO DE RESSONÂNCIA. EM B, DESENHO ESQUEMÁTICO DA PLACA DE CIRCUITO IMPRESSO DESENVOLVIDA PARA A MONTAGEM DOS CIRCUITOS COM COMPONENTES DE MONTAGEM DE SUPERFÍCIE E EM C FOTO DO SISTEMA POSICIONADO PRÓXIMO AO ANIMAL, DURANTE EXPERIMENTO REAL. PB = FREQUÊNCIA DE CORTE DO FILTRO PASSA BAIXA; REF = SINAL REFERÊNCIA; -V = POLO NEGATIVO DA ALIMENTAÇÃO; +V = POLO POSITIVO DA ALIMENTAÇÃO; TX = TRANSMISSOR DE FIBRA ÓPTICA; RX = RECEPTOR DE FIBRA ÓPTICA.------69
- FIGURA 09 COMPARAÇÃO ENTRE IMAGENS OBTIDAS COM DIFERENTES TIPOS DE ELETRODOS E SEM ELETRODO. EXTENSO ARTEFATO DE SUSCEPTIBILIDADE (SETA VERMELHA EM A) PODE SER OBSERVADO QUANDO AS IMAGENS SÃO ADQUIRIDAS NA PRESENÇA DE ELETRODO METÁLICO, MAS NENHUM ARTEFATO IDENTIFICÁVEL APARECE NA PRESENÇA DE ELETRODOS DE FIBRA DE CARBONO (B). AS IMAGENS OBTIDAS NA PRESENÇA DE ELETRODOS DE FIBRA DE CARBONO (B) SÃO QUALITATIVAMENTE COMPARÁVEIS ÀQUELAS OBTIDAS SEM ELETRODOS (C), EM TERMOS DE AUSÊNCIA DE ARTEFATOS. ------74
- FIGURA 10 CÁLCULO DE RELAÇÃO SINAL RUÍDO EM "FANTASMA" PREENCHIDO COM SOLUÇÃO SALINA FISIOLÓGICA. AS IMAGENS OBTIDAS NA AUSÊNCIA DO SISTEMA DE REGISTRO DE EEG (A) NÃO SÃO QUALITATIVAMENTE DIFERENTES DAQUELAS OBTIDAS NA PRESENÇA DO SISTEMA (B). O RETÂNGULO VERMELHO INDICA OS PLANOS ANATÔMICOS UTILIZADOS PARA O CÁLCULO DA RELAÇÃO SINAL RUÍDO. -----76
- GRÁFICO 01 COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS INTENSIDADES DOS SINAIS DE IMAGENS DE "FANTASMA" PREENCHIDO COM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA SALINA OBTIDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DO SISTEMA DE EEG. A INTENSIDADE MÉDIA DO SINAL DAS IMAGENS OBTIDAS NA AUSÊNCIA DO SISTEMA DE EEG FOI DE 16537 ± 393 (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) ENQUANTO QUE NA PRESENÇA DO SISTEMA DE EEG, OBTIVEMOS INTENSIDADE DE 16388 ± 414 (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO). NÃO FOI OBSERVADA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA (P=0,78; TESTE-T NÃO PAREADO) ENTRE OS SINAIS MEDIDOS NAS DUAS CONDIÇÕES (BARRAS DE ERRO INDICAM ERRO PADRÃO).

----- 77

GRÁFICO 02 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DESVIOS PADRÃO DAS MÉDIAS DAS INTENSIDADES DOS SINAIS DE IMAGENS DE "FANTASMA" PREENCHIDO COM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA SALINA OBTIDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DO SISTEMA DE EEG. O DESVIO PADRÃO NA AUSÊNCIA DO SISTEMA DE EEG FOI DE 663 ± 127 (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO),

----- 77

- **GRÁFICO 03** COMPARAÇÃO ENTRE RELAÇÃO SINAL RUÍDO (RSR) CALCULADA PARA IMAGENS DE "FANTASMA" PREENCHIDO COM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA SALINA OBTIDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DO SISTEMA DE EEG. NÃO FOI OBSERVADA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA (P=0.62; TESTE-T NÃO PAREADO) ENTRE A RSR DAS IMAGENS OBTIDAS NA AUSÊNCIA DO SISTEMA DE EEG (25,5 ± 1,2; MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) E NA PRESENÇA DO MESMO (24,5 ± 1,5; MÉDIA ± DESVIO PADRÃO) (BARRAS DE ERRO INDICAM ERRO PADRÃO). ------78
- FIGURA 11 COMPARAÇÃO ENTRE QUALIDADE DE IMAGENS OBTIDAS NA PRESENÇA DE SISTEMA DE EEG CONVENCIONAL (A) E NA PRESENÇA DO SISTEMA DE EEG DESENVOLVIDO POR NÓS (B). EM A PODEMOS OBSERVAR PRESENÇA DE ARTEFATOS DE RF NAS IMAGENS (LINHAS CLARAS NO TOPO DOS PLANOS ANATÔMICOS) BEM COMO RUÍDO DE FUNDO, QUANDO AS IMAGENS SÃO ADQUIRIDAS NA PRESENÇA DE SISTEMA DE EEG CONVENCIONAL. POR OUTRO LADO, NAS IMAGENS ADQUIRIDAS NA PRESENÇA DO NOSSO SISTEMA DE EEG, NÃO HÁ EVIDÊNCIAS DE ARTEFATOS DE RF, SENDO A QUALIDADE DAS IMAGENS COMPARÁVEL ÀQUELAS OBTIDAS NA AUSÊNCIA DE SISTEMA DE EEG. -------79
- FIGURA 13 FIXAÇÃO DOS CABOS À BASE DO APARATO DE CONTENÇÃO ANIMAL. EM A PODEMOS VER A FIXAÇÃO DA CONEXÃO ENTRE OS ELETRODOS E O CABO. EM B PODEMOS VER A EXTREMIDADE OPOSTA DO CABO FIXADA AO APARATO DE CONTENÇÃO. PODEMOS OBSERVAR, ABAIXO DO CONECCTOR TIPO TELEFÔNICO, O VELCRO® UTILIZADO PARA FIXAR O CIRCUITO PRÉ-AMPLIFICADOR/TRANSMISSOR. ---- 81
- FIGURA 14 ARTEFATOS INDUZIDOS NOS REGISTROS DE EEG PELA AÇÃO DOS GRADIENTES MAGNÉTICOS DURANTE AQUISIÇÃO DE IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA. EM A PODEMOS OBSERVAR REGISTRO EFETUADO COM CABO/ELETRODOS COM UM METRO DE EXTENSÃO. NESSAS CONDIÇÕES, OBSERVAMOS PRESENÇA DE ARTEFATOS ELÉTRICOS VÁRIAS VEZES MARIORES DO QUE O REGISTRO BASAL DE EEG. DIMINUINDO-SE A

- FIGURA 15 ANÁLISE ESPECTRAL DOS REGISTROS DE EEG OBTIDOS DURANTE AQUISIÇÃO DE IMAGENS COM DIFERENTES NÚMEROS DE PLANOS ANATÔMICOS, MAS COM MESMOS TR (TEMPO DE REPETIÇÃO). O COMPONENTE PRINCIPAL OBSERVADO OBEDECE À RELAÇÃO
  F=1/(TR/NS) (ONDE TR É O TEMPO DE REPETIÇÃO E NS É O NÚMERO DE PLANOS ANATÔMICOS), SENDO OS DEMAIS COMPONENTES SUAS HARMÔNICAS. A PRESENÇA DE COMPONENTE EM 50 HZ CORRESPONDE A INTERFERÊNCIA PROVENIENTE DA FREQUÊNCIA DA REDE ELÉTRICA (QUE É DE 50 HZ NO REINO UNIDO). ------- 84
- FIGURA 16 ALGORÍTMO DE REMOÇÃO DE ARTEFATOS EM TRAÇADOS OBTIDOS DURANTE (À ESQUERDA DA LINHA TRACEJADA) E APÓS (À DIREITA) AQUISIÇÃO DE IMAGENS DE RMF. OS PASSO A, B E C CORRESPONDEM A APLICAÇÃO DE FILTRO PASSA-BAIXA DE 60 HZ, FILTRO BAND-STOP DE 38 HZ E FILTRO BAND-STOP DE 76 HZ, RESPECTIVAMENTE. PODEMOS OBSERVAR COMO OS ARTEFATOS SÃO PROGRESSIVAMENTE REMOVIDOS DO TRAÇADO DE EEG, RESULTANDO EM TRAÇADO QUALITATIVAMENTE INDISTINGUÍVEL DAQUELE OBTIDO NO PERÍODO SEM ATIVIDADE DO APARELHO DE RESSONÂNCIA.----- 85
- FIGURA 17 RESULTADO DA APLICAÇÃO DO ALGORÍTMO DE FILTRAGEM DE REGISTRO DE EEG REALIZADO SIMULTANEAMENTE À AQUISIÇÃO DE IMAGENS DE RMF. O TRAÇADO SUPERIOR CORRESPONDE À REGISTRO DE EEG NÃO FILTRADO E O INFERIOR AO MESMO REGISTRO APÓS APLICAÇÃO DO PROCESSO DE REMOÇÃO DE ARTEFATOS. NO INÍCIO DOS REGISTROS, ANTES DO INÍCIO DA AQUISIÇÃO DE IMAGENS, PODEMOS OBSERVAR QUE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO TRAÇADO ORIGINAL SÃO PRESERVADAS NO TRAÇADO FILTRADO. APÓS INÍCIO DA AQUISIÇÃO DE IMAGENS, O TRAÇADO ORIGINAL APRESENTA ARTEFATOS INDUZIDOS PELOS GRADIENTES MAGNÉTICOS, ENQUANTO QUE OS MESMOS NÃO SÃO VISÍVEIS NO TRAÇADO CORRIGIDO--------86
- FIGURA 19 TRAÇADO DE EEG DE ANIMAL TÍPICO INJETADO COM PICROTOXINA, MOSTRANDO A EVOLUÇÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES. PODEMOS OBSERVAR, APROXIMADAMENTE NO CENTRO DO REGISTRO (SETA), RESPOSTA ELETRODECREMENTAL QUE OCORRE DE FORMA ABRÚPTA, SEGUIDA POR ALTERAÇÕES EPILEPTIFORMES PROGRESSIVAS, CULMINANDO EM *STATUS EPILEPTICUS* ELETROGRÁFICO.------95

- GRÁFICO 04 COMPARAÇÃO ENTRE A VARIAÇÃO DAS AMPLITUDES CORRIGIDAS MÉDIAS NOS MOMENTOS PRÉ-INJEÇÃO, PRÉ-ICTUS E ICTUS, ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS.
  O GRUPO EXPERIMENTAL INJETADO COM PICROTOXINA APRESENTOU DIMINUIÇÃO SIGNIFICATIVA (\*P<0,0001; TESTE-T PAREADO) DA AMPLITUDE MÉDIA DO EEG DURANTE O PERÍODO PRÉ-ICTAL COMPARADO COM O PERÍODO PRÉ-INJEÇÃO. NO PERÍODO ICTAL, AUMENTO SIGNIFICATIVO (\*\*P<0.001; TESTE-T PAREADO) FOI OBSERVADO NA AMPLITUDE MÉDIA DO EEG DOS ANIMAIS TRATADOS COM PICROTOXINA, COMPARANDO-SE COM A AMPLITUDE MÉDIA DO EEG BASAL (PRÉ-INJEÇÃO). NENHUMA VARIAÇÃO SIGNIFICATIVA FOI OBSERVADA NOS GRUPOS CONTROLE. (BARRAS DE ERRO INDICAM ERRO PADRÃO).------96
- FIGURA 20 ANÁLISE ESPECTRAL (FFT) DOS REGISTROS DE EEG DE ANIMAL TÍPICO DO GRUPO INJETADO COM PICROTOXINA. EM A OBSERVAMOS AUSÊNCIA DE COMPONENTE DOMINANTE EM FREQUÊNCIA EM TRECHO DE EEG RETIRADO DO PERÍODO PRÉ INJEÇÃO. DURANTE O PERÍODO DE RESPOSTA ELETRODECREMENTAL (B), COMPONENTES DOMINANTES APARECEM EM FREQUÊNCIAS EM TORNO DE 5 HZ. DURANTE STATUS EPILEPTICUS ELETROGRÁFICO, VÁRIOS COMPONENTES PODEM SER VISTOS NA ANÁLISE ESPECTRAL, SUGERINDO SOBREPOSIÇÃO DE DIFERENTES PADRÕES ELETROGRÁFICOS. 98
- FIGURA 21 FOTOS MOSTRANDO (A) CANULAÇÃO DA CAVIDADE PERITONEAL ATRAVÉS DE ESCALPE DOBRADO A 90° SUTURADO AO ABDOMEN E (B) FIXAÇÃO DOS ELETRODOS (FIXADOS À MATRIZ DE ACRÍLICO) ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE MICROPORE®. ALÉM DISSO, PODEMOS OBSERVAR NESSA FIGURA A FIXAÇÃO DO ANIMAL AO APARATO DE CONTENÇÃO ATRAVÉS DE PARAFUSO AURICULAR.-----104
- GRÁFICO 06 COMPARAÇÃO ENTRE TEMPOS (EM SEGUNDOS) DE INÍCIO DE RESPOSTA ELETRODECREMENTAL (T ELETROD) E DE INÍCIO DE ATIVIDADE ICTAL (T ICTUS) ENTRE EXPERIMENTOS REALIZADOS NA BANCADA (EEG BANCADA) E EXPERIMENTOS DE AQUISIÇÃO SIMULTÂNEA (EEG SIMULTÂNEO). NÃO FOI OBSERVADA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE OS DOIS GRUPOS EM NENHUM DOS DOIS INTERVALOS (TESTE-T NÃO PAREADO).(BARRAS DE ERRO INDICAM ERRO PADRÃO)---- 111
- FIGURA 22 TRAÇADOS ELETROENCEFALOGRÁFICOS DE CANAL FILTRADO ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DO ALGORITMO DE REMOÇÃO DE ARTEFATOS, DE ANIMAL REPRESENTATIVO DO GRUPO TRATADO COM PICROTOXINA. SEQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS IDENTICA ÀQUELAS OBSERVADAS NOS EXPERIMENTOS

- FIGURA 23 TRECHO DE REGISTRO DE EEG DE ANIMAL REPRESENTATIVO DO GRUPO TRATADO COM PICROTOXINA. O CANL MOSTRADO NESSA FIGURA FOI SUBMETIDO AO ALGORÍTMO DE REMOÇÃO DE ARTEFATOS EM TEMPO REAL. PODEMOS OBSERVAR RESPOSTA ELETRODECREMENTAL ABRUPTA OCORRENDO ALGUNS MINUTOS ANTES DA EVOLUÇÃO DA CRISE EPILEPTICA ELETROGRÁFICA. -------113
- FIGURA 24 ANÁLISE ESPECTRAL (FFT) DOS TRAÇADOS DE EEG FILTRADO NOS PERÍODOS
  PRÉ-INJEÇÃO (A), PRÉ-ICTAL (B) E ICTAL (C). PODEMOS OBSERVAR AUSÊNCIA DE
  COMPONENTE SIGNIFICATIVO NO PERÍODO PRÉ-INJEÇÃO (A). PRESENÇA DE
  COMPONENTES DOMINANTES PODEM SER OBSERVADOS TANTO EM B (SETA FINA), EM
  TORNO DE 2 HZ, QUANTO EM C (SETAS GROSSAS) EM TORNO DE 5, 8 E 12 HZ.------114
- GRÁFICO 07 COMPARAÇÃO ENTRE AS AMPLITUDES MÉDIAS DOS EEG NOS PERÍODOS PRÉ-INJEÇÃO, PRE-ICTAL E ICTAL NOS GRUPOS EXPERIMENTAL (PTX) E CONTROLE (CONTROLE ETANOL). DIMINUIÇÃO ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA DA AMPLITUDE MÉDIA DO EEG BASAL PÔDE SER OBSERVADO NO PERÍODO PRÉ-ICTAL NOS ANIMAIS INJETADOS COM PICROTOXINA (\*P=0,0014). DURANTE A ATIVIDADE EPILEPTIFORME, AUMENTO SIGNIFICATIVO DA AMPLITUDE DO EEG É OBSERVADA NESTE GRUPO (\*\*P=0,00052) QUANDO COMPARADO COM ATIVIDADE BASAL (PRÉ-INJEÇÃO).(BARRAS DE ERRO INDICAM ERRO PADRÃO)------115
- TABELA 04 VALORES DE AMPLITUDE MÉDIA CORRIGIDA DO EEG PARA OS GRUPOS INJETADO COM PICROTOXINA E CONTROLE ETANOL, NOS INTERVALOS PRÉ-INJEÇÃO, PRÉ-ICTUS E ICTUS E VARIAÇÃO PERCENTUAL DAS AMPLITUDE ENTRE PRÉ-INJEÇÃO E PRÉ-ICTUS E PRÉ-INJEÇÃO E ICTUS. DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA FOI OBSERVADA APENAS NO GRUPO INJETADO COM PICROTOXINA ENTRE O PERÍODO PRÉ-INJEÇÃO E OS DEMAIS PERÍODOS (\*P=0,0014, \*\*P=0,00052) ------115
- FIGURA 26 DETALHE DAS ÁREAS DE MÁXIMO (A) E MÍNIMOS (B) GLOBAIS E CORRELAÇÕES ANATÔMICAS COM O ATLAS DE PAXINOS E WATSON{3029}. EM A PODEMOS OBSERVAR "ATIVAÇÃO" DA AMIGDALA, BILATERALMENTE, ALÉM DE ÁREAS DE "ATIVAÇÃO" DE
MENOR INTENSIDADE AO NÍVEL DOS GIROS DENTEADOS (HIPOCAMPOS) E CÓRTEX. ALÉM DISSO, ÁREA DE "INATIVAÇÃO" ENGLOBANDO CAUDADO PODE SER TAMBÉM OBSERVADA. EM B PODEMOS VER EXTENSA "INATIVAÇÃO" DO CAUDADO-PUTÂMEN.- 118

- GRÁFICO 08 COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS MÉDIOS DE INÍCIO DE RESPOSTA ELETRODECREMENTAL (T ELETROD) E DE INÍCIO DE ATIVIDADE ICTAL (T ICTUS) ENTRE OS REGISTROS DE EEG SUPERFICIAL REALIZADOS NA BANCADA (EEG BANCADA) E OS REGISTROS DE EEG PROFUNDO (EEG PROFUNDO) EM GRUPOS EXPERIMENTAIS TRATADOS COM PICROTOXINA. DIFERENÇA ESTATISTICA NÃO FOI OBSERVADA EM NENHUM DOS INTERVALOS.(BARRAS DE ERRO INDICAM ERRO PADRÃO).------131
- FIGURA 27 EVOLUÇÃO DO PADRÃO MORFOLÓGICO DO EEG PROFUNDO EM DIFERENTES ESTRUTURAS, EM ANIMAL REPRESENTATIVO DO GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO COM PICROTOXINA. EM A PODEMOS OBSERVAR ATIVIDADE ELETROGRÁFICA BASAL. PODEMOS NOTAR QUE A ATIVIDADE NO CANAL REFERENTE AO CAUDADO-PUTÂMEN (CPU) APRESENTA AMPLITUDE MAIOR DO QUE A DOS DEMAIS CANAIS. RESPOSTA ELETRODECREMENTAL (B) FOI OBSERVADA SEMPRE ANTES DO PERÍODO ICTAL, INICIANDO-SE DE FORMA SIMULTÂNEA EM TODOS OS CANAIS. C MOSTRA ATIVIDADE ICTAL TÍPICA COM DISPAROS EM POLI-PONTAS, SENDO A ATIVIDADE CORTICAL (CX) SIGNITIVAMENTE MAIS INTENSA DO QUE A DOS DEMAIS CANAIS. (CPU = CAUDADO-PUTÂMEN; HC = HIPOCAMPO; AMI = AMIGDALA; CX = CÓRTEX). -------132
- FIGURA 28 EVOLUÇÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES ELETROENCEFALOGRÁFICAS DE ANIMAL REPRESENTATIVO DO GRUPO INJETADO COM PICROTOXINA. A SETA INDICA O INÍCIO DA RESPOSTA ELETRODECREMENTAL. PODEMOS OBSERVAR MAIOR AMPLITUDE NO REGISTRO DE CAUDADO-PUTÂMEN (CPU), ANTES DA RESPOSTA ELETRODECREMENTAL E ATIVIDADE MAIS INTENSA EM CANAL CORTICAL (CX) NO PERÍODO ICTAL. (CPU = CAUDADO-PUTÂMEN; HC = HIPOCAMPO; AMI = AMIGDALA; CX = CÓRTEX).------133
- GRÁFICO 09 COMPARAÇÃO ENTRE AS AMPLITUDES DOS EEG PROFUNDOS REGISTRADOS EM CAUDADO, HIPOCAMPO, AMIGDALA E CÓRTEX EM ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO COM PICROTOXINA. PODEMOS OBSERVAR QUE A AMPLITUDE MÉDIA DOS REGISTROS DO CAUDADO SÃO SIGNIFICATIVAMENTE (\*P<0,04; TESTE-T PAREADO) MAIORES DO QUE AS AMPLITUDES NAS DEMAIS ESTRUTURAS NO PERÍODO PRÉ-INJEÇÃO. DURANTE O PERÍODO PRÉ-ICTAL TODOS OS CANAIS AMPRESENTAM RESPOSTA ELETRODECREMENTAL SIGNIFICATIVA (\*\*P<0,001), EM COMPARAÇÃO COM AS AMPLITUDES MÉDIAS DO PERÍODO PRÉ-INJEÇÃO, MAS SEM DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE AS AMPLITUDES MÉDIAS DAS ESTRUTURAS.

NO PERÍODO ICTAL, O REGISTRO CORTICAL APRESENTA O MAIOR PERCENTUAL DE VARIAÇÃO POSITIVA, SENDO SUA AMPLITUDE MÉDIA SIGNIFICATIVAMENTE MAIOR (P<0,02; TESTE-T PAREADO) DO QUE NAS DEMAIS ESTRUTURAS.(BARRAS DE ERRO INDICAM ERRO PADRÃO).-----134

- TABELA 06 VALORES DE AMPLITUDE MÉDIA DO EEG EM CAUDADO-PUTÂMEN (CPU), HIPOCAMPO (HC), AMIGDALA (AMI) E CÓRTEX (CX), NOS INTERVALOS PRÉ-INJEÇÃO, PRÉ-ICTUS E ICTUS E VARIAÇÃO PERCENTUAL DAS AMPLITUDE ENTRE PRÉ-INJEÇÃO E PRÉ-ICTUS E PRÉ-INJEÇÃO E ICTUS NO GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO COM PICROTOXINA. OS REGISTRO OBTIDOS NO CAUDADO-PUTÂMEN APRESENTARAM AMPLITUDE MÉDIA SIGNIFICATIVAMENTE MAIOR DO OUE TODAS AS OUTRAS ESTRUTURAS NO PERÍODO PRÉ-INJEÇÃO (\*P<0,04) ASSIM COMO MAIOR VARIAÇÃO PERCENTUAL NEGATIVA DO REGISTRO ENTRE PRÉ-INJEÇÃO E PRÉ-ICTUS (#P<0,03). NO PERÍODO PRÉ-ICTAL, TODAS AS ESTRUTURAS APRESENTARAM RESPOSTA ELETRODECREMENTAL SIGNIFICATIVA (\*\*P<0,001), SEM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS CANAIS. NO PERÍODO ICTAL OS REGISTROS OBTIDOS CÓRTEX APRESENTARAM AMPLITUDE NO MÉDIA ESTATISTICAMENTE SUPERIOR AOS DEMAIS CANAIS (\*\*\*P<0,02) ASSIM COMO MAIOR VARIAÇÃO PERCENTUAL POSITIVA DO REGISTRO ENTRE PRÉ-INJEÇÃO E ICTUS (##P<0,01). FINALMENTE, O REGISTRO DE CAUDADO-PUTÂMEN NO PERÍODO ICTAL MOSTROU O MENOR PERCENTUAL DE VARIAÇÃO POSITIVA (£P<0,05). -----135
- **GRÁFICO 10** VARIAÇÕES PERCENTUAIS DA AMPLITUDE MÉDIA DOS REGISTROS DE EEG PROFUNDO NAS DIFERENTES ESTRUTURAS EM ANIMAIS TRATADOS COM PICROTOXINA, ENTRE OS PERÍODOS PRÉ-INJEÇÃO E PRÉ-ICTAL (PRÉ-ICTUS) E PRÉ-INJEÇÃO E ICTUS (ICTUS). PODEMOS OBSERVAR QUE OS REGISTROS DE CAUDADO-PUTÂMEN (CPU) APRESENTAM A MAIOR VARIAÇÃO PERCENTUAL NEGATIVA NO PERÍODO PRÉ-ICTAL (\*P<0,03) E A MENOR VARIAÇÃO POSITIVA PERCENTUAL NO PERÍODO ICTAL (\*\*P<0,04). O REGISTRO CORTICAL APRESENTOU, POR SUA VEZ, O MAIOR PERCENTUAL DE VARIAÇÃO POSITIVA NO PERÍODO ICTAL (\*\*\*P<0,01). (CPU = CAUDADO-PUTÂMEN; HC = HIPOCAMPO; AMI = AMIGDALA; CX = CÓRTEX).(BARRAS DE ERRO INDICAM ERRO PADRÃO). --------136
- FIGURA 29 IMAGENS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ALTA-RESOLUÇÃO EM TI (ESQUERDA) E EM DENSIDADE DE PRÓTONS (DIREITA) COM CORRELAÇÃO COM ATLAS DE PAXINOS E WATSON{3029}. EM A PODEMOS OBSERVAR O TRAJETO DO ELETRODO DE CAUDADO-PUTÂMEN NAS IMAGENS DE DENSIDADE DE PRÓTONS, CONFIRMANDO O POSICIONAMENTO DO ELETRODO NA REGIÃO DESEJADA (COM VARIAÇÃO MÉDIA DE ± 1,5 MM EM QUALQUER DOS EIXOS ORTOGONAIS), TANTO NO GRUPO EXPERIMENTAL QUANTO NO GRUPO CONTROLE. EM B PODEMOS VER OS TRAJETOS DOS ELETRODOS POSICIONADOS EM HIPOCAMPO E EM AMIGDALA. O POSICIONAMENTO DESSES ELETRODOS TAMBÉM FOI CONSIDERADO SATISFATÓRIO EM TODOS OS ANIMAIS (EM AMBOS OS GRUPOS), COM VARIAÇÃO MÉDIA DE APROXIMADAMENTE 1,0 MM EM QUALQUER DOS EIXOS ANATÔMICOS. AS ELÍPSES NOS DESENHOS ANATÔMICOS

CORRESPONDEM À ÁREA DE LOCALIZAÇÃO DE TODOS OS ELETRODOS NAS ESTRUTURAS DESEJADAS.------137

- FIGURA 30 PROGRESSÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS TRAÇADOS DE EEG DE ANIMAL REPRESENTATIVO DO GRUPO EXPERIMENTAL (PILOCARPINA I.P.). EM A PODEMOS OBSERVAR TRAÇADO DE EEG BASAL ANTES DA INJEÇÃO DE PILOCARPINA. RESPOSTA ELETRODECREMENTAL PRECOCE PODE SER OBSERVADA EM B. C MOSTRA TRAÇADO DURANTE *STATUS EPILEPTICUS* ELETROGRÁFICO. PODEMOS OBSERVAR ATIVIDADE DE POLI-PONTAS DE ALTA FREQUÊNCIA ("TRENS" DE DISPARO).------145
- FIGURA 31 MAPA PARAMÉTRICO DE ATIVAÇÃO COMPARANDO GRUPOS EXPERIMENTAL (N=5) E CONTROLE (N=5). MÁXIMO GLOBAL FOI OBSERVADO AO NÍVEL DE CAUDADO-PUTÂMEN (PORÇÃO ANTERIOR) AO PASSO QUE MÍNIMO GLOBAL FOI OBSERVADO AO NÍVEL DE AMIGDALA LATERAL. (BARRA DE ESCALA INDICA VALORES DE T)------146
- FIGURA 32 DETALHE DOS MÁXIMOS E MÍNIMOS GLOBAIS. EM A PODEMOS OBSERVAR A LOCALIZAÇÃO DO MÁXIMO GLOBAL AO NÍVEL DO NÚCLEO ACUMBENS, COM ENVOLVIMENTO DE EXTENSA ÁREA DE CAUDADO-PUTÂMEN. EM B PODEMOS OBSERVAR LOCALIZAÇÃO DE MÍNIMO GLOBAL AO NÍVEL DE AMIGDALA LATERAL COM EXTENSÃO DAS ÁREAS DE INATIVAÇÃO PARA REGIÕES CORTICAIS. À DIREITA PODEMOS OBSERVAR À LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS "ATIVADAS/INATIVADAS" DE ACORDO COM ATLAS DE PAXINOS E WATSON{132}. AS ÁREAS MARCADAS EM VERMELHO E EM AZUL CORRESPONDEM AOS MÁXIMO E MÍNIMO GLOBAIS MOSTRADOS NAS IMAGENS DE RMF.
- FIGURA 33 MAPA PARAMÉTRICO DE ATIVAÇÃO COMPARANDO GRUPO CONTROLE ETANOL E GRUPO CONTROLE SALINA. NÃO FORAM OBSERVADOS *CLUSTERS* SIGNIFICATIVOS DE ATIVAÇÃO/INATIVAÇÃO. (BARRA DE ESCALA INDICA VALORES DE T)-------152
- FIGURA 34 MAPA PARAMÉTRICO DE ATIVAÇÃO MOSTRANDO COMPARAÇÃO ENTRE ÁREAS DE RESPOSTA SEMELHANTE ENTRE OS GRUPOS PICROTOXINA E PILOCARPINA (*CONJUNCTION ANALYSIS*). PODEMOS OBSERVAR EXTENSA ÁREA DE INATIVAÇÃO ENVOLVENDO OS NÚCLEOS SEPTAIS E AMIGDALAS ANTERIORES E CÓRTEX INSULAR. ÁREAS DE ATIVAÇÃO PODEM SER OBSERVADAS PREDOMINANTEMENTE NO CÓRTEX MOTOR PRIMÁRIO. (BARRA DE ESCALA INDICA VALORES DE T)-------153

- FIGURA 35 DETALHES DAS ÁREAS DE ATIVAÇÃO/INATIVAÇÃO OBTIDAS PELA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS PICROTOXINA E PILOCARPIA EM RELAÇÃO AO CONTROLE SALINA. ESSA ANÁLISE MOSTRA AS ÁREAS QUE APRESENTARAM CORRELAÇÕES POSITIVAS E NEGATIVAS EM AMBOS OS GRUPOS. PODEMOS OBSERVAR EXTENSA ÁREA DE INATIVAÇÃO A NÍVEL DOS NÚCLEOS SEPTAIS (C) E ÁREA AMIGDALÓIDE ANTERIOR (B). PEQUENAS ÁREAS DE CORRELAÇÃO POSITIVA PODEM SER OBSERVADAS AO NÍVEL DO CÓRTEX MOTOR PRIMÁRIO (A).-----154
- FIGURA 37 DETALHES DAS ÁREAS "ATIVADAS/INATIVAS" OBTIDAS DA COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS TRATADOS COM PICROTOXINA E PILOCARPINA. PODEMOS OBSERVAR ÁREAS DE "ATIVAÇÃO" PREDOMINANTEMENTE NOS CÓRTEX MOTORES PRIMÁRIOS (A) E AMIGDALAS (B). ÁREAS DE "INATIVAÇÃO" OCORREM PREDOMINANTEMENTE AO NÍVEL DE CAUDAO-PUTÂMEN/NÚCLEO ACUMBENS (A) E NÚCLEOS TALÂMICOS (B). À DIREITA PODEMOS VER CORRELAÇÕES ANATÔMICAS DE ACORDO COM ATLAS DE PAXINOS E WATSON. ÁRES MARCADAS EM VERMELHO CORRESPONDEM ÀS REGIÕES COM CORRELAÇÃO POSITIVA ENQUANTO QUE AS EM AZUL MOSTRAM ÁREAS DE "INATIVAÇÃO" OU CORRELAÇÃO NEGATIVA. ------156

## Bibliografia

Adcock JE, Wise RG, Oxbury JM, Oxbury SM, Matthews PM (2003) Quantitative fMRI assessment of the differences in lateralization of language-related brain activation in patients with temporal lobe epilepsy. Neuroimage 18:423-438.

Akanuma N, Koutroumanidis M, Adachi N, Alarcon G, Binnie CD (2003) Presurgical assessment of memory-related brain structures: the Wada test and functional neuroimaging. Seizure 12:346-358.

Akiyama K, Daigen A, Yamada N, Itoh T, Kohira I, Ujike H, Otsuki S (1992) Longlasting enhancement of metabotropic excitatory amino acid receptor-mediated polyphosphoinositide hydrolysis in the amygdala/pyriform cortex of deep prepiriform cortical kindled rats. Brain Res 569:71-77.

Allen PJ, Josephs O, Turner R (2000) A method for removing imaging artifact from continuous EEG recorded during functional MRI. Neuroimage 12:230-239.

Allen PJ, Polizzi G, Krakow K, Fish DR, Lemieux L (1998) Identification of EEG events in the MR scanner: the problem of pulse artifact and a method for its subtraction. Neuroimage 8:229-239.

Archer JS, Abbott DF, Waites AB, Jackson GD (2003) fMRI "deactivation" of the posterior cingulate during generalized spike and wave. Neuroimage 20:1915-1922.

Arthurs OJ, Boniface SJ (2003) What aspect of the fMRI BOLD signal best reflects the underlying electrophysiology in human somatosensory cortex? Clin Neurophysiol 114:1203-1209.

Aubert A, Costalat R (2002a) A model of the coupling between brain electrical activity, metabolism, and hemodynamics: application to the interpretation of functional neuroimaging. Neuroimage 17:1162-1181.

Aubert A, Costalat R (2002b) A model of the coupling between brain electrical activity, metabolism, and hemodynamics: application to the interpretation of functional neuroimaging. Neuroimage 17:1162-1181.

Austin VC, Blamire AM, Grieve SM, O'Neill MJ, Styles P, Matthews PM, Sibson NR (2003) Differences in the BOLD fMRI response to direct and indirect cortical stimulation in the rat. Magn Reson Med 49:838-847.

Babb TL (1986) GABA-mediated inhibition in the Ammon's horn and pre-subiculum in human temporal lobe epilepsy: GAD immunocytochemistry. In: Neurotransmitters, seizures and Epilepsy III (Nistici G, Morselli PL, Lloyd KG, Fariello RG, Engel J, eds), pp 293-302. Nova York: Raven.

Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Feldblum S (1989) Recovery of decreased glutamate decarboxylase immunoreactivity after rat hippocampal kindling. Epilepsy Res 3:18-30.

Babiloni F, Babiloni C, Carducci F, Del Gratta C, Romani GL, Rossini PM, Cincotti F (2002) Cortical source estimate of combined high resolution EEG and fMRI data related to voluntary movements. Methods Inf Med 41:443-450.

Barone P, Morelli M, Cicarelli G, Cozzolino A, DeJoanna G, Campanella G, DiChiara G (1993) Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. Synapse 14:1-9.

Baumann SB, Noll DC (1999) A modified electrode cap for EEG recordings in MRI scanners. Clin Neurophysiol 110:2189-2193.

Berger H (1929) Uber das Elektroenzephalogronom des manschen. Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten 87:527-570.

Bertram EH, Zhang DX, Mangan P, Fountain N, Rempe D (1998) Functional anatomy of limbic epilepsy: a proposal for central synchronization of a diffusely hyperexcitable network. Epilepsy Research 32:194-205.

Bloch F, Hansen WW, Packard M (1946) Nuclear Induction. Phys Rev 69:127.

Blumer D (1984) The Psychiatric Dimension of Epilepsy: Psichological and Social Impacts. (Blumer D, ed), pp 1-65. Washington DC: American Psychiatric Press.

Bonmassar G, Anami K, Ives J, Belliveau JW (1999) Visual evoked potential (VEP) measured by simultaneous 64-channel EEG and 3T fMRI. Neuroreport 10:1893-1897.

Bratton CB, Hopkins AL, Weinberg JW (1965) Nuclear magnetic resoncance studies of living muscles. Science 147:738.

Brinker G, Bock C, Busch E, Krep H, Hossmann KA, Hoehn-Berlage M (1999) Simultaneous recording of evoked potentials and T2\*-weighted MR images during somatosensory stimulation of rat. Magn Reson Med 41:469-473.

Busch E, Hoehn-Berlage M, Eis M, Gyngell ML, Hossmann KA (1995) Simultaneous recording of EEG, DC potential and diffusion-weighted NMR imaging during potassium induced cortical spreading depression in rats. NMR Biomed 8:59-64.

Carlson H, Ronne-Engstrom E, Ungerstedt U, Hillered L (1992) Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. Neurosci Lett 140:30-32.

Cavalheiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy. Ital J Neurol Sci 16:33-37.

Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF (1987) The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. Neuroscience 23:953-968.

Commission of Classification and Terminology of the International League AgainstEpilepsy (1989) Proposal for the revised clinical and electroencephalographic classification of

epileptic seizures. Epilepsia 30:389-399.

Damadian R (1971) Tumor detection by magnetic resonance. Science 171:1151-1153.

De Deyn PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei YQ (1992) Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. Epilepsy Research 12:87-110.

Deblaere K, Backes WH, Hofman P, Vandemaele P, Boon PA, Vonck K, Boon P, Troost J, Vermeulen J, Wilmink J, Achten E, Aldenkamp A (2002) Developing a comprehensive presurgical functional MRI protocol for patients with intractable temporal lobe epilepsy: a pilot study. Neuroradiology 44:667-673.

Deransart C, Vercueil L, Marescaux C, Depaulis A (1998) The role of basal ganglia in the control of generalized absence seizures. Epilepsy Res 32:213-223.

DeYoe EA, Bandettini P, Neitz J, Miller D, Winans P (1994) Functional magnetic resonance imaging (FMRI) of the human brain. J Neurosci Methods 54:171-187.

Dreifuss FE, Henriksen O (1992) Classification of epileptic seizures and the epilepsies. Acta Neurol Scand Suppl 140:8-17.

During MJ, Spencer DD (1993) Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. Lancet 341:1607-1610.

Dutertre F (1977) Catalogue of the main EEG patterns. In: Handbook of electroencepholography and clinical Neurophysiology (Remond A, ed), pp 40-79. Amsterdan: Elsevier.

Edelstein WA, Hutchinson JMS, Johnson G, Redpath TW (1980) Spin-warp NMR imaging and applications to human whole-body imaging. Phys Med Biol 25:751-756.

Edmonds HL, Jr., Bellin SI (1976) A neuropharmacological comparison of the convulsant activity of several putative GABA antagonists. Proc West Pharmacol Soc 19:117-121.

Engel J, Jr. (1996) Excitation and inhibition in epilepsy. Can J Neurol Sci 23:167-174.

Felblinger J, Slotboom J, Kreis R, Jung B, Boesch C (1999) Restoration of electrophysiological signals distorted by inductive effects of magnetic field gradients during MR sequences. Magn Reson Med 41:715-721.

Fisher RS (1989) Animal models of the epilepsies. Brain Res Brain Res Rev 14:245-278.

Flavin HJ, Wieraszko A, Seyfried TN (1991) Enhanced aspartate release from hippocampal slices of epileptic (El) mice. J Neurochem 56:1007-1011.

Fox PT, Raichle ME (1986) Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. Proc Natl Acad Sci U S A 83:1140-1144.

Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C (1988) Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. Science 241:462-464.

Frankenstein U, Wennerberg A, Richter W, Bernstein C, Morden D, Rémy F, McInteyre M (2002) Activation and Deactivation in Blood Oxygenation Level Dependent Functional Magnetic Resonace. Concepts in Magnetic Resonance 16A:63-70.

Fransson P, Kruger G, Merboldt KD, Frahm J (1999) MRI of functional deactivation: temporal and spatial characteristics of oxygenation-sensitive responses in human visual cortex. Neuroimage 9:611-618.

Friston KJ, Holmes AP, Worsley KJ, Poline JB, Frith CD, Frackowiak RSJ (1995) Statistical parametric maps in functional imaging: a general linear approach. Hum Brain Mapp 2:189-210.

Geddes JW, Cahan LD, Cooper SM, Kim RC, Choi BH, Cotman CW (1990) Altered distribution of excitatory amino acid receptors in temporal lobe epilepsy. Exp Neurol 108:214-220.

Gibbs FA, Davis H, Lennox WG (1936) The Electroencephalogram in Diagnosis and in Localisation of Epileptic Seizures. Arch Neuropsych 36:1225-1535.

Gloor P (1985) Neuronal generators and the problem of localization in electroencephalography: application of volume conductor theory to electroencephalography. J Clin Neurophysiol 2:327-354.

Gloor P, Quesney LF, Zumstein H (1977) Pathophysiology of generalized penicillin epilepsy in the cat: the role of cortical and subcortical structures. II. Topical application of penicillin to the cerebral cortex and to subcortical structures. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 43:79-94.

Goldman RI, Stern JM, Engel J, Jr., Cohen MS (2000) Acquiring simultaneous EEG and functional MRI. Clin Neurophysiol 111:1974-1980.

Gorter CJ (1936) Negative result of an attempt to detect nuclear magnetic spins. Physica 3:995-998.

Grisar T (1984) Glial and neuronal Na+-K+ pump in epilepsy. Ann Neurol 16 Suppl:S128-S134.

Grubb RL, Jr., Raichle ME, Eichling JO, Ter-Pogossian MM (1974) The effects of changes in PaCO2 on cerebral blood volume, blood flow, and vascular mean transit time. Stroke 5:630-639.

Hamani C, Mello LE (1997) Status epilepticus induced by pilocarpine and picrotoxin. Epilepsy Res 28:73-82.

Hara K, Harris RA (2002) The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. Anesth Analg 94:313-8, table.

Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT (1991) Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. Epilepsia 32:429-445.

Herreras O, Solis JM, del Rio RM, Lerma J (1987) Characteristics of CA1 activation through the hippocampal trisynaptic pathway in the unanaesthetized rat. Brain Research 413:75-86.

Hess A, Stiller D, Kaulisch T, Heil P, Scheich H (2000) New insights into the hemodynamic blood oxygenation level-dependent response through combination of functional magnetic resonance imaging and optical recording in gerbil barrel cortex. J Neurosci 20:3328-3338.

Hoffmann A, Jager L, Werhahn KJ, Jaschke M, Noachtar S, Reiser M (2000) Electroencephalography during functional echo-planar imaging: detection of epileptic spikes using post-processing methods. Magn Reson Med 44:791-798.

Honavar M, Meldrum BS (2002) Epilepsy. In: Greenfield's Neruopathology (Greenfield JG, Graham DI, Lantos PL, eds), Hodder Arnold.

Hutchinson M, Schiffer W, Joseffer S, Liu A, Schlosser R, Dikshit S, Goldberg E, Brodie JD (1999) Task-specific deactivation patterns in functional magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging 17:1427-1436.

Hyder F, Rothman DL, Shulman RG (2002b) Total neuroenergetics support localized brain activity: implications for the interpretation of fMRI. Proc Natl Acad Sci U S A 99:10771-10776.

Hyder F, Rothman DL, Shulman RG (2002a) Total neuroenergetics support localized brain activity: implications for the interpretation of fMRI. Proc Natl Acad Sci U S A 99:10771-10776.

Ives JR, Warach S, Schmitt F, Edelman RR, Schomer DL (1993) Monitoring the patient's EEG during echo planar MRI. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 87:417-420.

Jackson JA, Langham WH (1968) Whole-body NMR spectrometer. Rev Sci Instrum 39:510-513.

Janjua NA, Kabuto H, Mori A (1992) Increased plasma glutamic acid in a genetic model of epilepsy. Neurochem Res 17:293-296.

Jarvie PA, Logan TC, Geula C, Slevin JT (1990) Entorhinal kindling permanently enhances Ca2(+)-dependent L-glutamate release in regio inferior of rat hippocampus. Brain Res 508:188-193.

Kamp A, Lopes da Silva F (1999) Technological Basis of EEG Recording. In: Electroencephalography. Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields (Niedermeyer E, Lopes da Silva F, eds), pp 110-121. Baltimore: Williams & Wilkins.

Kandel A, Buzsaki G (1993) Cerebellar neuronal activity correlates with spike and wave EEG patterns in the rat. Epilepsy Res 16:1-9.

Kaplan BJ, Williamson PD (1978) Electroencephalogram and somatosensory evoked potential changes after administration of six convulsant drugs. Exp Neurol 59:124-136.

Kayama Y, Iwama K (1972) The EEG, evoked potentials, and single-unit activity during ketamine anesthesia in cats. Anesthesiology 36:316-328.

King GA (1978) Effects of systemically applied GABA agonists and antagonists on wave-spike ECoG activity in rat. Neuropharmacology 18:47-55.

Klancnik JM, Cuenod M, Gahwiler BH, Jiang ZP, Do KQ (1992) Release of endogenous amino acids, including homocysteic acid and cysteine sulphinic acid, from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation of Schaffer collateral-commissural fibres. Neuroscience 49:557-570.

Kleinschmidt A, Buchel C, Zeki S, Frackowiak RS (1998) Human brain activity during spontaneously reversing perception of ambiguous figures. Proc R Soc Lond B Biol Sci 265:2427-2433.

Kruggel F, Wiggins CJ, Herrmann CS, von Cramon DY (2000) Recording of the event-related potentials during functional MRI at 3.0 Tesla field strength. Magn Reson Med 44:277-282.

Kumar A, Welti D, Ernst RR (1975) NMR Fourier zeugmatography. J Magn Reson 18:69-83.

Kwong KK, Belliveau JW, Chesler DA, Goldberg IE, Weisskoff RM, Poncelet BP, Kennedy DN, Hoppel BE, Cohen MS, Turner R, . (1992) Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. Proc Natl Acad Sci U S A 89:5675-5679.

Lauterbur PC (1973) Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. Nature 242:190-191.

Lehnertz K, Mormann F, Kreuz T, Andrzejak RG, Rieke C, David P, Elger CE (2003) Seizure prediction by nonlinear EEG analysis. IEEE Eng Med Biol Mag 22:57-63.

Lehnertz K, Widman G, Andrzejak R, Arnhold J, Elger CE (1999) Is it possible to anticipate seizure onset by non-linear analysis of intracerebral EEG in human partial epilepsies? Rev Neurol (Paris) 155:454-456.

Lemieux L, Allen PJ, Franconi F, Symms MR, Fish DR (1997) Recording of EEG during fMRI experiments: patient safety. Magn Reson Med 38:943-952.

Lemieux L, Salek-haddadi A, Josephs O, Allen P, Toms N, Scott C, Krakow K, Turner R, Fish DR (2001) Event-related fMRI with simultaneous and continuous EEG: description of the method and initial case report. Neuroimage 14:780-787.

Litt B, Echauz J (2002) Prediction of epileptic seizures. Lancet Neurol 1:22-30.

Lloyd KG, Bossi L, Morselli PL, Munari C, Rougier M, Loiseau H (1986) Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. Adv Neurol 44:1033-1044.

Logothetis NK, Guggenberger H, Peled S, Pauls J (1999) Functional imaging of the monkey brain. Nat Neurosci 2:555-562.

Logothetis NK, Wandell BA (2004) Interpreting the BOLD signal. Annu Rev Physiol 66:735-769.

Loscher W, Schmidt D (2004) New horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets. Epilepsy Research 60:77-159.

Mackenzie L, Medvedev A, Hiscock JJ, Pope KJ, Willoughby JO (2002) Picrotoxininduced generalised convulsive seizure in rat: changes in regional distribution and frequency of the power of electroencephalogram rhythms. Clin Neurophysiol 113:586-596.

Mansfield P, Maudsley AA (1976) Medical imaging by NMR. Br J Radiol 50:188-194.

McDonald JW, Garofalo EA, Hood T, Sackellares JC, Gilman S, McKeever PE, Troncoso JC, Johnston MV (1991) Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. Ann Neurol 29:529-541.

McHenry LC (1969) Garrison's History of Neurology. Springfield IL: Charles C Thomas.

McInteyre M, Richter W, Morden D, Wennerberg A, Frankenstein U (2002) Blood Oxygenation Level Dependetn Functional Magnetic Resonance Imaging. Concepts in Magnetic Resonance 16A:5-15.

McInteyre M, Wennerberg A, Somorjai R, Scarth G (1996) Activation and inactivation in fuctional brain images. Neuroimage 3:82.

McNamara JO (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy. J Neurosci 14:3413-3425.

Meldrum BS (1989) Pathophysiology of Chronic Epilepsy. In: Chronic Epilepsy: Its Prognosis and Management (Trimble MR, ed), pp 1-11. Londres: John Wiley abd Sons.

Meldrum BS (1994) The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. Neurology 44:S14-S23.

Muri RM, Felblinger J, Rosler KM, Jung B, Hess CW, Boesch C (1998) Recording of electrical brain activity in a magnetic resonance environment: distorting effects of the static magnetic field. Magn Reson Med 39:18-22.

Niedermeyer E (1999a) The Normal EEG of the Waking Adult. In: Electroencephalography. Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields (Niedermeyer E, Lopes da Silva F, eds), pp 149-173. Baltimore: Williams & Wilkins.

Niedermeyer E (1999b) Historical Aspects. In: Electroencephalography. Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields (Niedermeyer E, Lopes da Silva F, eds), pp 1-14. Baltimore: Williams & Wilkins.

O'Leary JL, Goldring S (1976) Science and Epilepsy. In: Neuroscience gains in epilepsy research Nova York: Raven Press.

Ogawa S, Lee TM, Nayak AS, Glynn P (1990) Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. Magn Reson Med 14:68-78.

Pauling L, Coryell C (1936) Proceedings of the National Academy of Sciences 22:210-216.

Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press.

Petersen SE, Fox PT, Posner MI, Mintun M, Raichle ME (1988) Positron emission tomographic studies of the cortical anatomy of single-word processing. Nature 331:585-589.

Posner MI, Petersen SE, Fox PT, Raichle ME (1988) Localization of cognitive operations in the human brain. Science 240:1627-1631.

Purcell EM, Torrey HC, Pound RV (1947) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. Phys Rev 69:37-38.

Quesney LF, Niedermeyer E (1999) Electrocorticography. In: Electroencephalography. Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields (Niedermeyer E, Lopes da Silva F, eds), pp 741-747. Baltimore: Williams & Wilkins.

Quesney LF, Gloor P, Kratzenberg E, Zumstein H (1977) Pathophysiology of generalized penicillin epilepsy in the cat: the role of cortical and subcortical structures. I. Systemic application of penicillin. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 42:640-655.

Raymond D.Adams, Maurice Victor, Allan H.Ropper (1998) Epilepsy and Other Seizure Disorders. In: Principles of Neurology CD-ROM Mcgraw-Hill.

Represa A, Robain O, Tremblay E, Ben-Ari Y (1989) Hippocampal plasticity in childhood epilepsy. Neurosci Lett 99:351-355.

Ribak CE, Bradurne RM, Harris AB (1982) A preferential loss of GABAergic, symmetric synapses in epileptic foci: a quantitative ultrastructural analysis of monkey neocortex. J Neurosci 2:1725-1735.

Roberts E (1974) Disinhibition as an organizing principle in the nervous system. The role of gamma-aminobutyric acid. Adv Neurol 5:127-143.

Roberts E (1980) Epilepsy and antiepileptic drugs: a speculative synthesis. Adv Neurol 27:667-713.

Roy CS, Sherrington CS (1890) J Physiol 11:85-108.

Sabatino M, Ferraro G, Caravaglios G, Sardo P, Aloisio A, Iurato L, La G, V (1992) Accumbens-caudate-septal circuit as a system for hippocampal regulation: involvement of a GABAergic neurotransmission. Neurophysiol Clin 22:3-16.

Salek-haddadi A, Lemieux L, Merschhemke M, Diehl B, Allen PJ, Fish DR (2003) EEG quality during simultaneous functional MRI of interictal epileptiform discharges. Magn Reson Imaging 21:1159-1166.

Sander J, Hart Y (1999) A Etiologia da Epilepsia. In: Epilepsia: um guia prático (Sander J, Hart Y, eds), pp 51-70. Merit Publishing International.

Sawamura A, Hashizume K, Tanaka T (2002) Electrophysiological, behavioral and metabolical features of globus pallidus seizures induced by a microinjection of kainic acid in rats. Brain Res 935:1-8.

Schaul N (1998) The fundamental neural mechanisms of electroencephalography. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 106:101-107.

Schenck JF, Leue WM (1998) Instrumentation: Magnets, coils and hardware. In: MRI of the Brain and Spine on CD-ROM (Atlas SW, ed), Nova York: Lippincott-Raven.

Scorza FA, Arida RM, Priel MR, Calderazzo L, Cavalheiro EA (2002) Glucose utilisation during status epilepticus in an epilepsy model induced by pilocarpine: a qualitative study. Arq Neuropsiquiatr 60:198-203.

Shulman RG, Hyder F, Rothman DL (2002) Biophysical basis of brain activity: implications for neuroimaging. Q Rev Biophys 35:287-325.

Sijbers J, Michiels I, Verhoye M, Van Audekerke J, Van der LA, Van Dyck D (1999) Restoration of MR-induced artifacts in simultaneously recorded MR/EEG data. Magn Reson Imaging 17:1383-1391.

Silbert PL, Radhakrishnan K, Johnson J, Klass DW (1995) The significance of the phi rhythm. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 95:71-76.

Sim MK, Chua ME (1989) EEG in anaesthetized rats. Pharmacol Toxicol 65:119-120.

Singer J (1959) Blood flow rates by nuclear magnetic resoncance measurements. Science 130:1652-1653.

Sloper JJ, Johnson P, Powell TP (1980) Selective degeneration of interneurons in the motor cortex of infant monkeys following controlled hypoxia: a possible cause of epilepsy. Brain Res 198:204-209.

Sloviter RS (1991) Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. Hippocampus 1:31-40.

Sloviter RS (1987) Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. Science 235:73-76.

Sorensen AG, Rosen BR (1998) Functional MRI of the Brain. In: MRI of the Brain and Spine on CD-ROM (Atlas SW, ed), Nova York: Lippincott-Raven.

Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. Science 262:679-685.

Taylor J (1958) On Epilepsy and Epileptiform Consulsions. In: Selected Writings of John Hughlings Jackson Nova York: Basic Books.

Temkin O (1971) The Falling Sickness. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Theodore WH, Fisher RS (2004) Brain stimulation for epilepsy. Lancet Neurol 3:111-118.

Thulborn KR, Waterton JC, Matthews PM, Radda GK (1982) Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field. Biochim Biophys Acta 714:265-270.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behav Brain Res 9:315-335.

Van Audekerkea J, Peeters R, Verhoye M, Sijbers J, Van der LA (2000) Special designed RF-antenna with integrated non-invasive carbon electrodes for simultaneous magnetic resonance imaging and electroencephalography acquisition at 7T. Magn Reson Imaging 18:887-891.

Vella N, Ferraro G, Caravaglios G, Aloisio A, Sabatino M, La G, V (1991) A feature of caudate control of focal hippocampal epilepsy: evidence for an anterograde pathway. Exp Brain Res 85:240-242.

Warach S, Ives JR, Schlaug G, Patel MR, Darby DG, Thangaraj V, Edelman RR, Schomer DL (1996) EEG-triggered echo-planar functional MRI in epilepsy. Neurology 47:89-93.

Wilson JV, Reynolds EH (1990) Texts and documents. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. Med Hist 34:185-198.

Worsley KJ, Friston KJ (1995) Analysis of fMRI time-series revisited - Again. Neuroimage 2:173-181.

## Livros Grátis

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

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 Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo