

EFEITO DO *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR PILOCARPINA SOBRE A
MANOBRA DE HIPÓXIA DURANTE AS ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-
SINÁPTICAS NO GIRO DENTADO EM RATOS COM DIFERENTES IDADES

Maísa Ferreira Miranda

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

EFEITO DO *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR PILOCARPINA SOBRE A
MANOBRA DE HIPÓXIA DURANTE AS ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-
SINÁPTICAS NO GIRO DENTADO EM RATOS COM DIFERENTES IDADES

Máisa Ferreira Miranda

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

Aprovada por:

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

Prof. Dra. Maria José da Silva Fernandes

Prof. Dra. Daniela Mara de Oliveira

SÃO JOÃO DEL-REI, MG - BRASIL
SETEMBRO DE 2009

MIRANDA, MAÍSA FERREIRA

Efeito do *Status Epilepticus* Induzido por Pilocarpina Sobre a Manobra de Hipóxia Durante as Atividades Epileptiformes Não-Sinápticas no Giro Dentado em Ratos com Diferentes Idades. [MG] 2009

XII, 70 p. 29,7 cm (FIQUINE/UFSJ, M. Sc., Neurofísica, 2009)

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

1. Epilepsia 2. Atividades epileptiformes não-sinápticas 3. Na^+/K^+ - ATPase

I. FIQUINE/UFSJ II. Título (série)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Carlos e Maria Laura por nunca terem me deixado sonhar sozinha. Que a concretização deste trabalho seja um motivo de orgulho em suas vidas.

*Aos meus queridos irmãos Hugo e Eloá, cuja a simples existência é o motivo maior da minha busca incansável de crescimento.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir sentir sua presença nos momentos mais difíceis.

Ao professor Antônio-Carlos Guimarães de Almeida, exemplo de orientação, discernimento e competência, todo o meu agradecimento e admiração.

Ao professor Antônio Márcio Rodrigues, pela importante colaboração, além do inestimável saber científico.

Aos professores Gilcélio Amaral da Silveira, Mário Antônio Duarte e Daniela Mara de Oliveira por se mostrarem sempre à disposição e pela tão agradável convivência.

À professora Maria José da Silva Fernandes, pela receptividade em seu laboratório e por sua total disponibilidade nos ensinamentos do modelo da pilocarpina.

Aos amigos do LANEK Keite, Karine, Maisinha, Delmo, Victor, Aline, Luís, David, Gláucio, Natália, Kelison, Jussara, Mozar, Meira, Carlos, Júlio, enfim todos, inclusive os novatos. Haverá sempre um lugar para cada um que passou e deixou um pouco de si comigo.

Às amigas Simone, Karen, Livia e Mayra por toda amizade e cumplicidade nesta caminhada.

Um agradecimento especial ao Marco Thúlio, pelo amor, dedicação e principalmente pela paciência.

À vovó Adi exemplo de persistência e coragem diante dos desafios que a vida lhe apresentou e por acreditar na minha capacidade e estar sempre rezando por mim. À memória do vovô Neca, que sempre acreditou em dias melhores e na importância do estudo, deixando um exemplo de honestidade e caráter a ser seguido. A vocês, minha profunda admiração.

A todos os tios e primos que torceram e comemoraram a cada conquista, agradeço o carinho.

À minha cunhada Fernanda por me presentear com meu sobrinho Pedro, anjo em forma de menino, cujo nascimento trouxe novas razões e esperanças.

À companheira de morada, Belinha, pelas horas mais divertidas que passei.

Estendo meus agradecimentos àqueles que fornecendo idéias e/ou criticando auxiliaram no meu amadurecimento profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo indispensável auxílio financeiro.

“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.”

Texto Budista

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

EFEITO DO *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR PILOCARPINA SOBRE A MANOBRA DE HIPÓXIA DURANTE AS ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS NO GIRO DENTADO EM RATOS COM DIFERENTES IDADES

Maísa Ferreira Miranda

Setembro/2009

Orientador: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida
Co-orientador: Antônio Márcio Rodrigues
Programa: FIQUINE
Departamento: Engenharia de Biosistemas

A $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ é essencial para manutenção do potencial de repouso e propagação de potenciais de ação de células neuronais, uma anormalidade na atividade dessa enzima pode implicar em hiperexcitabilidade neuronal e, subsequente, desenvolvimento de epilepsia. Embora seja consenso a importância dessa enzima para a atividade neuronal, ainda muito pouco se conhece sobre seu papel na modulação das atividades epileptiformes (AEs). O objetivo do presente estudo foi identificar os efeitos da indução da epilepsia do lobo temporal, pela injeção sistêmica de pilocarpina, sobre a funcionalidade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, durante as atividades epileptiformes sustentadas por mecanismos não-sinápticos. Para tanto, fatias do hipocampo de ratos *Wistar* controle e tratados com pilocarpina, para diferentes faixas etárias, foram submetidas à indução de AEs não-sinápticas e registro do potencial elétrico extracelular. A indução de epilepsia do lobo temporal, por meio da pilocarpina, promove alterações sobre o efeito da hipóxia, durante as atividades epileptiformes não-sinápticas, e modifica também as características do potencial elétrico extracelular, sugerindo que essas modificações, dependendo da faixa etária, podem estar associadas a alterações estruturais (dispersão das células granulares e brotamentos de fibras musgosas), e, fisiológicas (redução da atividade e aumento na expressão da $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$, e, alterações na expressão dos cotransportadores KCC e NKCC). Esses achados enfatizam que estudos envolvendo a pilocarpina devem levar em consideração os mecanismos não-sinápticos, os quais podem modular a atividade neuronal, mesmo na presença das sinapses.

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

PILOCARPINE *STATUS EPILEPTICUS* INDUCED EFFECT ON THE HYPOXIC
MANOUVER DURING NONSYNAPTIC EPILEPTIFORM ACTIVITY OF THE
DENTATE GYRUS OF RATS ON DIFFERENT AGES

Máisa Ferreira Miranda

September/2009

Advisor: Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Co-Advisor: Antônio Márcio Rodrigues

Program: FIQUINE

Department: Biomedical Engineering

The Na^+/K^+ ATPase is essential for the maintenance of the rest potential and propagation of action potential of the neuronal cells. An abnormal activity of this enzyme may result neuronal hyperexcitability and, subsequently, the development of epilepsy. The importance of this enzyme to neuronal activity is a consensus, however, not too much is known about its role in modulation of the epileptic activities. The main objective of the present study was to identify the effects of induction of temporal lobe epilepsy, by systemic injection of pirocarpine, on the functionality of the enzyme Na^+/K^+ ATPase, during epileptic activities sustained by nonsynaptic mechanisms. Hippocampus slices from *Wistar* rats were investigated in different ages, for two groups: not treated and treated with pilocarpine. The slices were submitted to nonsynaptic induction of EAs and the extracellular electrical potential was recorded. It was observed that the induction of temporal lobe epilepsy by pilocarpine changes the effect of the hypoxia on the non-synaptic epileptiform events and also modifies the basic characteristics of the extracellular potential. The data analysis suggests that these modifications, depending on the age group, can be associated to structural (granule cels dispersion and mossy fibers sprouting) and physiological alterations (Na^+/K^+ ATPase activity reduction, with an increase of the expression of this enzyme and also of the cotransporters KCC and NKCC). These findings emphasize that studies involving pilocarpine model must consider the non-synaptic mechanisms, which can modulate the neuronal activity, even in the presence of the synapses.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA.....	3
II.1 - Hipocampo.....	3
II.2 - As epilepsias	6
II.3 - Modelo da pilocarpina.....	8
II.4- Na ⁺ K ⁺ ATPase.....	11
II.4.1 Efeito da hipóxia sobre a Na ⁺ K ⁺ ATPase.....	14
II.5 - Mecanismos não-sinápticos.....	16
II.6 - Modelo do alto K ⁺	19
CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS	21
III.1 – Animais experimentais	21
III.2 – Modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina	21
III.3 - Procedimentos experimentais para o registo do potencial elétrico	22
III.3.1 – Isolamento do hipocampo e obtenção das fatias	22
III.3.2 – Equipamentos utilizados para indução das AEs.....	26
III.4 – Sistemas de medição, aquisição e visualização	30
III.5 - Manobras de hipóxia.....	32
III.6 - Análise quantitativa dos parâmetros do potencial elétrico (PE).....	33
III.6.1 – Análise quantitativa da amplitude da componente DC	33
III.6.2 – Análise quantitativa da amplitude dos <i>populations spikes</i>	34
III.6.3 – Análise quantitativa da duração do evento	35
III.6.4 – Análise quantitativa do intervalo entre eventos	36
CAPÍTULO IV – RESULTADOS.....	37
IV.1- Indução de ELT pela injeção sistêmica de pilocarpina.....	37
IV.2 - Atividade epileptiforme não-sináptica	38
IV.2.1 - Hipóxia	39
IV.2.2 - Parâmetros do PE das atividades epileptiformes não-sinápticas.....	45
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	51
V.1 - Atividade epileptiforme não-sináptica.....	51
V.1.1 - Hipóxia.....	52
V.1.2 - Parâmetros do potencial elétrico das atividades epileptiformes não-sinápticas.....	54

CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO	57
CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE SÍMBOLOS E NOMEMCLATURAS

Símbolo	Descrição
AEs	Atividades epileptiformes
A_{\max}	Amplitude máxima
ATP	Adenosina trifosfato
CA1	Corno de Amon 1
CA2	Corno de Amon 2
CA3	Corno de Amon 3
Ca^{2+}	Íon cálcio
Cl^-	Íon cloro
COBEA	Colégio Brasileiro para Experimentação Animal
DC	Componente DC
DE	Duração do evento
DFT	Transformada discreta de Fourier
ELT	Epilepsia do lobo temporal
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GD	Giro dentado
H^+	Íon hidrogênio
IE	Intervalo entre eventos
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia

Símbolo	Descrição
ip	Via intra-peritoneal
K ⁺	Íon potássio
LANEC	Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional
LT	Latência
Na ⁺	Íon sódio
P_p	Constante de densidade de enzimas da bomba de Na ⁺ /K ⁺
PE	Potencial elétrico
PILO	Pilocarpina
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	<i>Populations spikes</i>
SAE	Sistema auxiliar de experimentos
sc	Via subcutânea
SE	<i>Status epilepticus</i>
UFSJ	Universidade Federal de São João Del Rei

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

As atividades epileptiformes (AEs) são caracterizadas por descargas espontâneas e hiper-sincronizadas de populações de neurônios. No início da década de 80, Jefferys *et al.* e Taylor *et al.*, enfatizaram a possibilidade de se induzir atividade epileptiforme mesmo na ausência das conexões sinápticas. Desde então, vários trabalhos têm sido direcionados para o estudo de atividades epileptiformes sustentadas apenas por conexões não-sinápticas. Além do interesse em entender de que forma as conexões não-sinápticas contribuem para a origem, propagação e sustentação das crises epiléticas, estudar atividades epileptiformes sustentadas apenas por essas conexões reduz consideravelmente o grau de complexidade envolvido pelas mais diferentes arquiteturas e circuitarias das conexões sinápticas. Essa redução torna ainda viável o estudo das contribuições de mecanismos subcelulares durante as atividades epileptiformes, como, por exemplo, os mecanismos de recuperação dos gradientes iônicos transmembrânicos.

Os gradientes iônicos, principalmente dos íons Na^+ e K^+ , são essenciais para as atividades celulares. Em particular, células eletricamente excitáveis precisam desses gradientes para a geração de potenciais de ação. O mecanismo de transporte iônico responsável pela manutenção desses gradientes é a enzima Na^+/K^+ ATPase, também conhecida como bomba de Na^+/K^+ . Ela transporta Na^+ e K^+ através da membrana, na razão 3:2, respectivamente, e contra seus respectivos gradientes de concentração, utilizando a energia da quebra de moléculas de ATP. Considerando que a Na^+/K^+ ATPase é um importante fator na manutenção do potencial da membrana e na propagação do impulso neuronal, uma anormalidade na atividade dessa enzima pode implicar em hiperexcitabilidade neuronal e, subsequente, desenvolvimento de epilepsia.

Diante deste contexto, o objetivo do presente estudo é identificar o efeito do *status epilepticus* induzido por pilocarpina sobre a manobra de hipóxia durante as atividades epileptiformes não-sinápticas no giro dentado em ratos com diferentes idades.

Para tornar mais clara a descrição do trabalho desenvolvido, no capítulo II, é feita uma revisão da literatura, sobre conceitos e definições das epilepsias, ressaltando a importância dos modelos animais, particularmente o modelo da pilocarpina. Também é feita uma descrição sobre o funcionamento da Na^+/K^+ ATPase, assim como sua importância sobre a manutenção do potencial de repouso e propagação dos impulsos na

célula neuronal. Ainda no capítulo II, são apresentados, de forma resumida, os mecanismos de conexão neuronal não sinápticos e o modelo do alto K^+ .

No capítulo III, são descritos, em detalhes, os procedimentos experimentais para a indução do *status epilepticus*, pela pilocarpina, bem como toda a técnica utilizada para registro e análise do potencial elétrico extracelular das atividades epileptiformes não-sinápticas.

Os resultados experimentais são apresentados no capítulo IV. A discussão desses resultados é feita no capítulo V, a partir dos dados encontrados na literatura.

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

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

II.1 Hipocampo

A formação hipocampal é uma estrutura bem definida no lobo temporal, é essencial para memória a longo prazo e apresenta um papel central na epilepsia do lobo temporal (ETL) (PIRTTILÄ, 2006). No modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina, o desenvolvimento de crises espontâneas é caracterizada por descargas paroxísticas localizadas na formação hipocampal. A propagação dessa atividade paroxística no hipocampo já foi bem demonstrada, caracterizando o hipocampo como uma importante estrutura na organização da atividade epiléptica (CAVALHEIRO *et al.*, 1991). De acordo com vários autores, o hipocampo é considerado uma área epileptogênica devido a sua habilidade de acumular K^+ no meio extracelular (GREEN, 1964; ZUCKERMANN e GLASER, 1968; OGATA *et al.*, 1976; COWAN e CAVALHEIRO, 1980; RUTECKI *et al.*, 1985).

Os aspectos anatômicos do hipocampo são bastante conhecidos. Existe um alto grau de similaridade entre o de humano e o de rato (figura II.1).

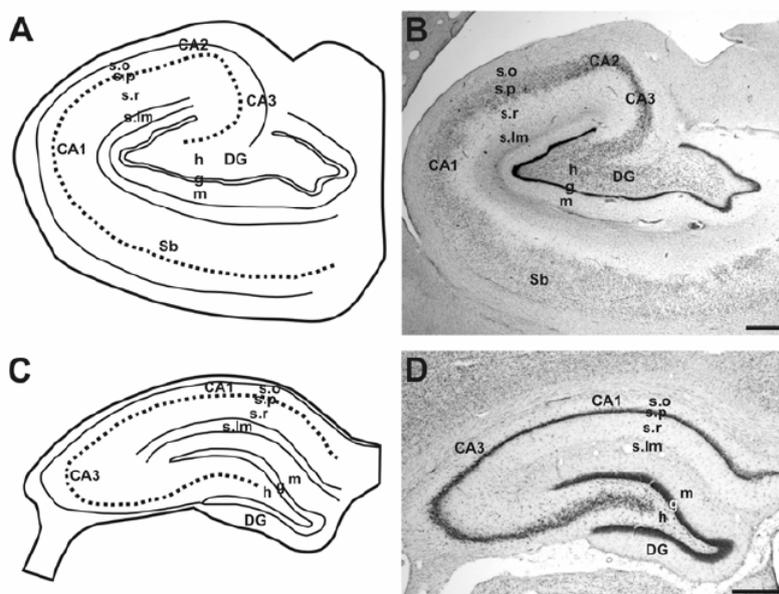


Figura II.1 - Anatomia do hipocampo. A- Hipocampo humano e C hipocampo de rato; Fotomicrografia digital ilustrando hipocampo com suas subregiões e camadas, humano em B e de rato em D; Abreviações: s.o, stratum oriens; s.p, stratum piramidales; s.r, stratum radiatum; s.lm, stratum molecular-lacunososo; Sb, subiculum; m, camada molecular; h, hilus; g, camada granular do giro dentado. Escala das barras: B- 1mm; D- 500 μ m (PIRTTILÄ, 2006).

Este possui distintas regiões que são interconectadas: o giro dentado (GD), corno Ammon (CA), complexo subicular, e córtex entorrinal (AMARAL e WITTER, 1989). O giro dentado é dividido em três camadas: camada granular, camada molecular e hilus (região polimórfica do giro dentado) (PIRTTILÄ, 2006). Sendo, o giro dentado, considerado uma região crítica na ELT (MARGERISON e CORSELLIS 1966).

A camada granular contém as principais células do giro dentado. Sendo composta por um empacotamento compacto de corpos celulares de células granulares. Estas células são neurônios que apresentam corpos celulares em forma de grãos, axônios curtos e arborização dendrítica próxima ao corpo celular. O GD também é usualmente dividido em três sub-regiões: lâminas supra-piramidal, ápice e lâmina infra-piramidal (figura II.2) (AMARAL e WITTER, 1989).

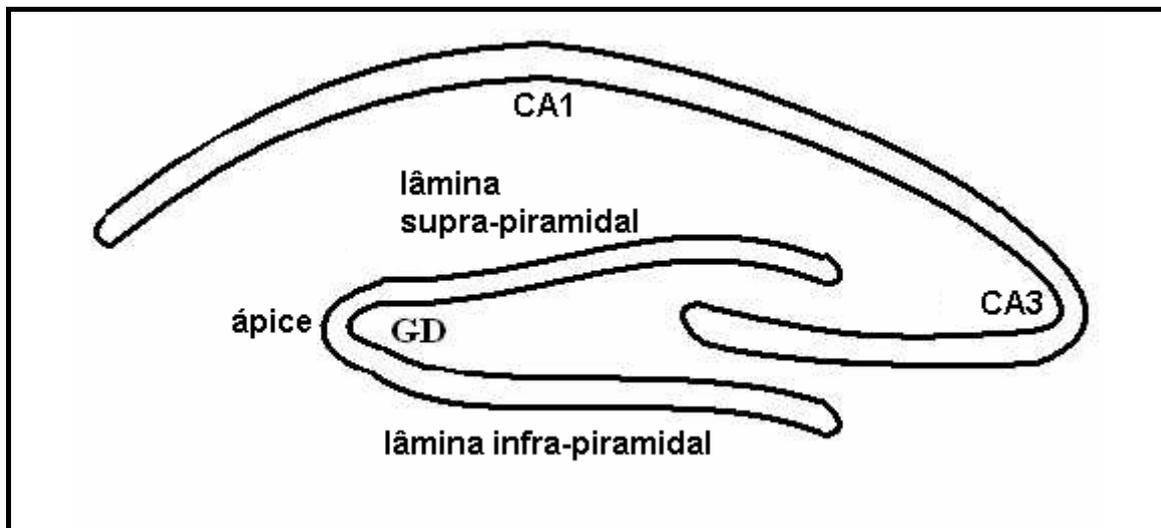


Figura II.2 - Desenho esquemático de um corte transversal do hipocampo mostrando as três sub-regiões do giro dentado. A região do ápice, que corresponde ao ponto de transição entre as lâminas suprapiramidal, que é a região mais próxima da região CA1, e infrapiramidal (modificado de MARTIN *et al.*, 2002).

O giro dentado é a região que recebe a maior porção de aferências da via perforante, atingindo, principalmente, os dois terços mais externos da camada molecular. É considerado como a principal região de entrada de informações no hipocampo (SCHARFMAN *et al.*, 2002; AMARAL e WITTER, 1989).

A camada molecular possui dendritos apicais, interneurônios dispersos e terminais sinápticos da via perforante (PIRTTILÄ, 2006). A camada polimórfica inclui diferentes tipos de células, como as células musgosas e interneurônios, sendo

caracterizada por um polimorfismo de células (PIRTTILÃ, 2006). O hipocampo propriamente dito é dividido em regiões CA1 (Corno de Ammon 1), CA2 e CA3 (figura II.3). O corno Ammon consiste de uma estrutura curva e estratificada, como representado na figura II.3, apresentando sete camadas: a molecular; lacunosa, *stratum radiatum*, s.piramidal, s. *alveus*, s. *oriens* e a zona epitelial (AMARAL *et al.*, 1991).

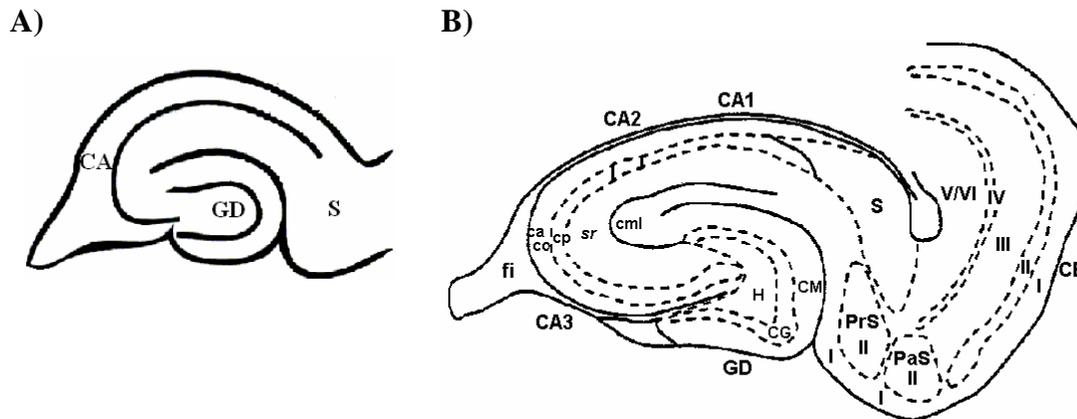


Figura II.3 – (A) Representação esquemática da fatia de hipocampo mostrando as três regiões básicas (modificado de PAN e STRINGER, 1996). B) Desenho esquemático, modificado de O’MARA *et al.* (2001), de uma seção horizontal através da formação hipocampal indicando várias regiões (corno Ammon, complexo subicular e giro dentado) e camadas (ca, camada *alveus*; co, camada *oriens*; cp, camada piramidal; sr, *stratum radiatum*; cml, camada molecular - lacunosa; H, hilus; CG, camada granular; CM, camada molecular e camadas I, II, III, IV, V e VI presentes no córtex entorrinal). O complexo subicular é composto pelos subículos (S), pré-subículo (PrS), pára-subículo (PaS). CE representa o córtex entorrinal e fi a fíbria hipocampal.

Os avanços no conhecimento da citoarquitetura e fisiologia celular do hipocampo foram facilitados pela utilização da técnica de fatias cerebrais (“*brain slices*”), que permitiram compreender, além das funções normais do hipocampo, a atuação de drogas e outras manobras experimentais durante experimentos envolvendo epilepsia. Essa técnica é particularmente útil para análise da atividade eletrofisiológica hipocampal, devido à manutenção do circuito neuronal intrínseco ao tecido, que permanece intacto na fatia transversa (ZIGMOND *et al.*, 1999). Segundo DA SILVA *et al.*, (2006), dentre as diferentes técnicas utilizadas em neurociência básica, a eletrofisiologia *in vitro* destaca-se como uma das ferramentas mais poderosas na compreensão da atividade neuronal, tanto em relação a células individuais, quanto em nível das redes neuronais.

II.2 As Epilepsias

As epilepsias referem-se a um grupo diverso, etiológica e clinicamente, de transtornos neurológicos caracterizados por crises epiléticas recorrentes, as quais resultam em uma atividade neuronal excessiva, anormal e hipersincrônica (ENGEL, 2001). Trata-se de uma disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações subjetivas ou comportamentais súbitas (crises epiléticas), com tendência a se repetirem por toda a vida do indivíduo. Estas crises refletem uma atividade nervosa anormal, de início súbito, acometendo uma ou mais regiões cerebrais (NABBOUT e DULAC, 2008).

A epilepsia é uma diversidade de desordens, que apresentam um aumento anormal de predisposição para crises. Esta diversidade se deve às numerosas bases celulares e moleculares envolvidas, bem como às características temporais e espaciais da crise (FISHER *et al.*, 2005). Tais crises podem ser de origem genética, com uma predisposição do cérebro ao aparecimento dessas crises, ou podem ser adquiridas, resultante de processos infecciosos, tumores, traumatismos decorrentes do parto ou mesmo de uma queda (BLOOM E ENGEL, 1992).

As crises epiléticas, segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) de 1989, são divididas fundamentalmente em: generalizadas e parciais. Na crise generalizada não há evidência do local de início, envolve simultaneamente os dois hemisférios cerebrais. Na crise parcial há evidências clínicas e eletroencefalográficas que apontam o local de início, que se restringe a uma porção de um hemisfério cerebral apenas. Uma crise parcial pode se generalizar no decorrer da crise e, desta forma, ser classificada como parcial secundariamente generalizada (LÖSCHER, 1997). São classificadas, também, como simples, quando há a preservação da consciência, ou complexas, quando ocorre a perda da consciência (MCNAMARA, 1994).

O *status epilepticus* é definido como uma crise epilética prolongada, a qual persiste por tempo suficiente ou repete-se com uma frequência tal que não permite a recuperação da consciência entre os ataques (CHEN e WASTERLAIN, 2006). Alguns estudos indicam que a incidência de *status epilepticus* é altíssima nos primeiros anos de vida (HOLMES, 1997; HAUSER, 1992).

Atualmente, aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia. Destes, 40% apresentam epilepsia do lobo temporal (ELT) (ANDRADE-

VALENÇA *et al.*, 2006). A ELT é caracterizada pelo aparecimento de crises espontâneas originadas em estruturas límbicas, especialmente o hipocampo (ENGEL *et al.*, 2003). A importância clínica da epilepsia do lobo temporal decorre não somente de sua elevada prevalência, mas também por ser refratária à maioria dos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente, sendo que, nestes casos, a remoção cirúrgica do foco epiléptico torna-se a única alternativa de tratamento (ENGEL, 1993).

Dentre os agentes etiológicos, a esclerose hipocampal é encontrada em 50-70% dos pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal (ENGEL *et al.*, 1997). Do ponto de vista anatomopatológico, a esclerose hipocampal caracteriza-se por perda neuronal e gliose reativa, especialmente das células das regiões CA1 e da região hilar, com relativa preservação de região CA2, *subiculum* e giro dentado (MCNAMARA, 1994). Associado à perda neuronal, observa-se também a dispersão das células granulares. Esta é caracterizada pela perda da justaposição habitual das células granulares na camada granular do giro dentado, produzindo aumento da sua espessura e dos espaços intercelulares (EL BAHH *et al.*, 1999; HOUSER, 1990). Adicionalmente, observa-se uma importante reorganização axonal, caracterizada por brotamentos de sinapses colaterais das células granulares (as fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro dentado (BABB *et al.*, 1991; TAUCK e NADLER, 1985).

Apesar da relação entre esclerose hipocampal e a epilepsia do lobo temporal já estar bem estabelecida, o mecanismo exato pelo qual a esclerose hipocampal participa da gênese das crises epiléticas ainda é tema de grande debate. Já em 1954, havia a proposta de que a esclerose hipocampal poderia estar associada a uma história prévia de injúria precipitante ocorrida em fases precoces do desenvolvimento cerebral (MEYER *et al.*, 1954). Dentre as injúrias, destacam-se as crises epiléticas prolongadas (*status epilepticus*) e as crises febris (MATHERN *et al.*, 2002). Atualmente, sabe-se que cerca de 80% dos pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal possuem história de crises febris e/ou *status epilepticus*, durante os primeiros anos de vida (VANLANDINGHAM *et al.*, 1998; MATHERN *et al.*, 1995; FRENCH *et al.*, 1993; FALCONER, 1971).

A elevada incidência de *status epilepticus* durante os períodos iniciais do desenvolvimento cerebral deve-se ao fato de o cérebro em desenvolvimento possuir uma maior pré-disponibilidade a atividade epilética do que o cérebro maturo. Isto se deve principalmente a um desbalanço entre os sistemas excitatórios e inibitórios, visto que o ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal aminoácido inibitório no cérebro

adulto, possui uma ação excitatória sobre o cérebro em desenvolvimento (HOLMES, 1997).

As crises epiléticas graves da infância podem levar a seqüelas neurológicas permanentes como crises recorrentes, distúrbios psiquiátricos e anormalidades de comportamento. Alguns autores sugerem que embora o cérebro imaturo tenha uma maior susceptibilidade a crises epiléticas do que o cérebro maduro, este apresenta maior resistência às lesões celulares secundárias às crises (HOLMES, 1997; PRIEL *et al.*, 1996).

Existe um considerável número de evidências correlacionando a ocorrência de crises duradouras ou *status epilepticus*, durante o período de desenvolvimento, com epilepsia na fase adulta (AICARDI e CHEVRIE, 1983). Entretanto, os processos dependentes da idade, envolvidos com a epileptogênese, permanecem pouco conhecidos.

Para um melhor entendimento do estudo das epilepsias se fez necessária a busca de modelos experimentais, os quais são ferramentas extremamente valiosas no estudo da prevenção, diagnóstico e tratamento dessa doença. (AVANZINI,1995).

II.3 Modelo da pilocarpina

Grande parte do conhecimento acerca dos mecanismos básicos das epilepsias advém de estudos em modelos animais. Dentre os modelos *in vivo* existentes, o que apresenta as principais características da ELT é o modelo da pilocarpina (CAVALHEIRO, 1995). Este modelo foi inicialmente descrito por TURSKI *et al.* (1983) e consiste na administração sistêmica de altas doses de pilocarpina (300 – 380 mg/Kg), um alcalóide extraído da planta *Pilocarpus jaborandi* ou *Pilocarpus microphyllus*, que age como agonista de receptores colinérgicos muscarínicos do tipo M1 no cérebro. A indução da crise se dá pelo efeito agonista colinérgico, e sua manutenção se deve a mecanismos excitatórios do tipo glutamatérgicos (MCDONOUGH e SHIH, 1997).

O seguimento temporal do modelo da pilocarpina permite dividi-lo em três fases: fase aguda, fase latente ou silenciosa e fase crônica. Na fase aguda os animais apresentam hiperatividade, tremores e clonias de patas nos primeiros 5 minutos. Este

comportamento é seguido pelo aumento na atividade motora, culminando em *status epilepticus* 30-40 minutos após a administração. Durante o *status epilepticus*, os animais apresentam automatismos orofaciais repetidos, salivação, clonias de patas e perda de equilíbrio. Eletrograficamente, o *status epilepticus* foi caracterizado por uma intensa atividade elétrica poliponta tanto cortical quanto hipocampal, a qual estende-se por aproximadamente 6 horas (HIRSCH *et al.*, 1992). Vinte e quatro horas após a indução do insulto, observa-se uma intensa morte celular em diversas regiões do sistema nervoso central, como córtex, tálamo e hipocampo (SANKAR *et al.*, 1997). Na formação hipocampal, o dano celular é mais proeminente nas regiões CA1 e hilo, quando comparadas as regiões CA2 e CA3 (SANKAR *et al.*, 1998).

A segunda fase, com duração em torno de 4 a 44 dias (média de 14,8 dias e mediana de 10 dias), é denominada de fase latente, sendo caracterizada, principalmente, por uma normalização comportamental. Nesta fase, os animais não apresentam nenhuma alteração comportamental evidente, bem como não são encontradas alterações nos padrões eletroencefalográficos. No entanto, acredita-se que os eventos de plasticidade sináptica, observadas na fase crônica, ocorram durante a fase latente (LEITE *et al.*, 2002).

A fase crônica é caracterizada, principalmente, pela ocorrência de crises convulsivas espontâneas de origem límbica, sendo que, aproximadamente, 80% dos animais apresentam crises epilépticas espontâneas na idade adulta (LEITE *et al.*, 2002). Além disso, observa-se uma importante reorganização axonal, caracterizada por brotamentos das fibras musgosas, na região da camada molecular interna do giro dentado. Tais alterações são similares as encontradas em pacientes com esclerose hipocampal, seguida de epilepsia do lobo temporal (BABB *et al.*, 1991; TAUCK e NADLER, 1985).

O modelo da pilocarpina tem contribuído para o avanço do conhecimento da ELT humana, pois possibilita que estudos longitudinais forneçam indícios sobre os mecanismos envolvidos com o processo epileptogênico, após uma única injeção do agente colinérgico. Algumas alterações, que ocorrem na epileptogênese em humanos durante anos, podem ser reproduzidas no modelo em apenas dias (figura II.4), sendo esta uma grande vantagem da utilização desse modelo (SILVA, 2009).

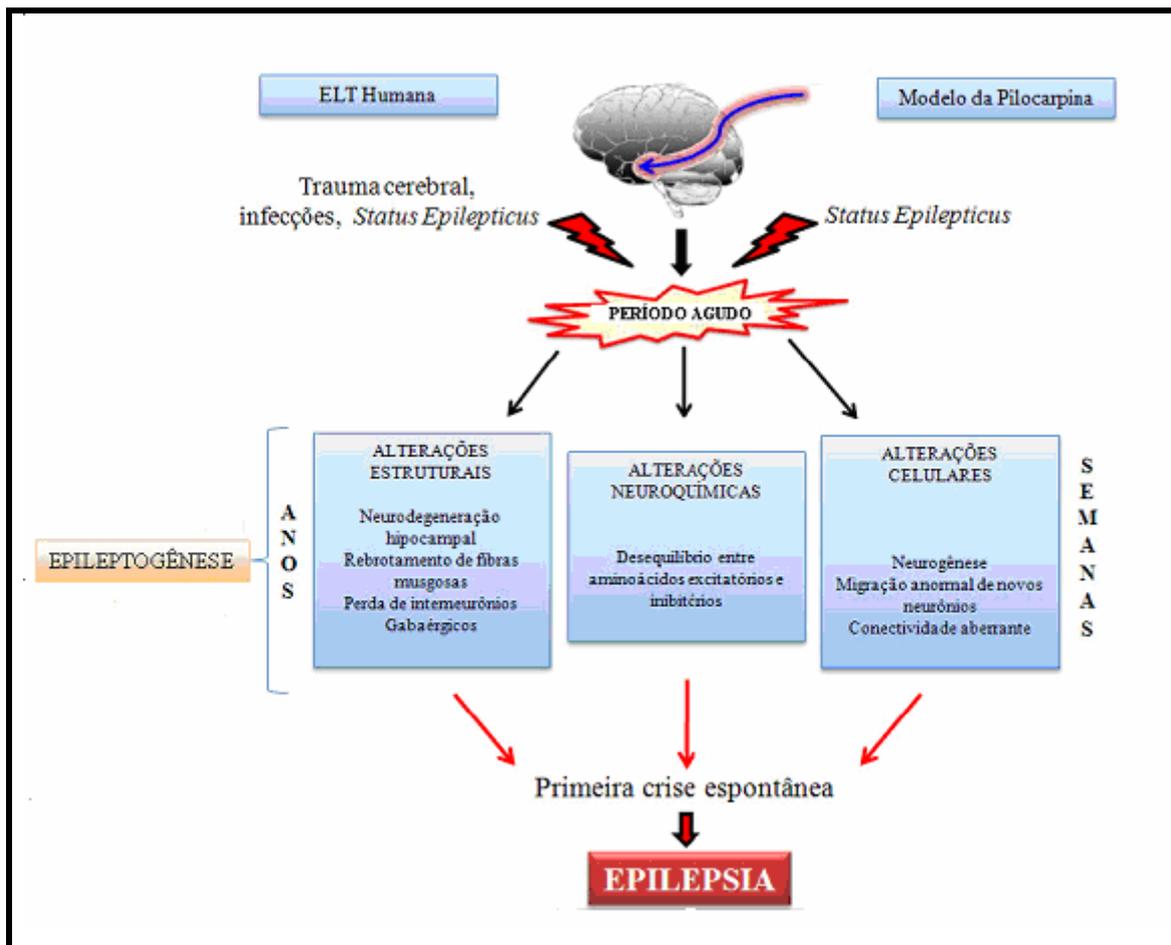


Figura II.4- Evolução cronológica na ELT humana e no modelo da pilocarpina, detalhando as alterações estruturais no cérebro, particularmente no hipocampo, envolvidas na gênese da Epilepsia (KURUBA *et al.*, 2009 modificado por SILVA, 2009).

Estudos ontogenéticos no modelo da PILO revelam que as consequências da pilocarpina são dependentes da idade (MOTTE *et al.*, 1998; PRIEL *et al.*, 1996). PRIEL *et al.* (1996) mostraram que os ratos só se tornam epiléticos crônicos se tratados a partir do 18º dia de vida. Antes desse período, embora apresentem estado de mal epilético duradouro após administração de pilocarpina, não desenvolvem lesão e nem apresentam crises espontâneas.

II.4 Na⁺/K⁺ - ATPase

Atualmente, existem muitas informações referentes a transportes de íons através de membranas biológicas. É difícil imaginar que o progresso no entendimento desses mecanismos de transporte iônico se deve, originalmente, a poucos pesquisadores que tinham a habilidade de observar fenômenos simples relacionados com a distribuição iônica, questionar suas origens e propor experimentos que levassem à conclusão de que deveria existir um mecanismo que transportasse íons ativamente contra seus respectivos gradientes eletroquímicos. Esse mecanismo, chamado de bomba de Na⁺/K⁺ por Dean em 1941, foi evidenciado através de experimentos que mostravam que íons Na⁺, dentro de fibras musculares, eram trocados por sódios radioativos adicionados ao meio extracelular. (SCHEINER-BOBIS, 2002).

Sabe-se que os gradientes iônicos transmembrânicos, principalmente de Na⁺ e K⁺, são essenciais para as atividades celulares. Sendo mais proeminente em células eletricamente excitáveis, que repetitivamente ganham Na⁺ e perdem K⁺. De acordo com BLANK (1995), embora a existência de um mecanismo de acumulação iônica preferencial nas células seja conhecido há mais de um século, foi somente em 1957 que SKOU identificou a Na⁺/K⁺ ATPase como sendo a enzima responsável pelo bombeamento seletivo de íons através da membrana celular e, conseqüentemente, pelo estabelecimento dos gradientes iônicos.

Em células eletricamente excitáveis, a criação e a manutenção dos gradientes de Na⁺ e K⁺ através da membrana celular são necessários para a geração do potencial de repouso e para a geração e propagação de potenciais de ação. Assim, é evidente que a bomba de Na⁺/K⁺ é um mecanismo de significância funcional primária em células que apresentam disparos de potenciais de ação durante longos períodos de tempo, tais como as células cardíacas e células nervosas (GLITSCH, 2001). Estudos voltados a elucidar mecanismos envolvidos com processos de excitabilidade neuronal mostraram alterações na ATPase Na⁺/K⁺ associadas com o processo epileptogênico (FERNANDES *et al.*, 1996; KINJO *et al.*, 2007).

A Na⁺/K⁺ ATPase é a enzima responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio através da membrana do neurônio e da glia, atuando como um mecanismo de retirada do potássio do meio extracelular para manter o gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal (GLYNN, 1993; GRISAR *et al.*, 1992). Esta enzima promove

a saída de três íons Na^+ e a entrada de dois de K^+ por molécula de ATP hidrolisada (figura II.5).

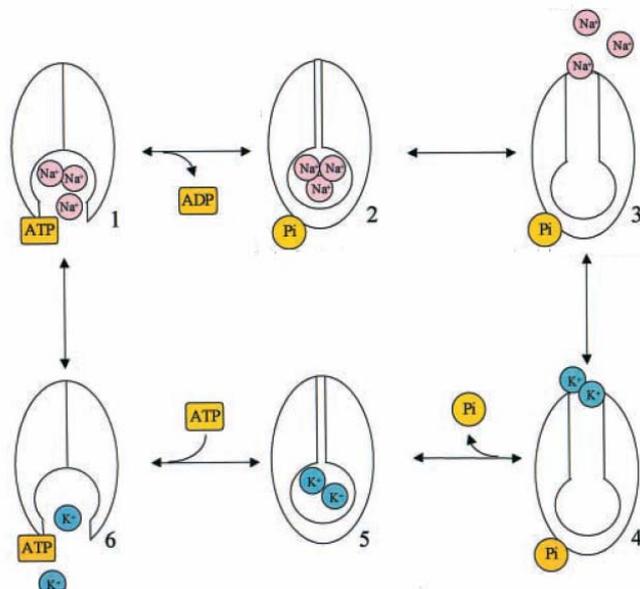


Figura II.5 - Representação esquemática do ciclo reacional da Na^+/K^+ ATPase. A Na^+/K^+ ATPase se liga ao ATP no estado conformacional E1 (etapa 1), isso leva a oclusão de 3 íons de Na^+ (etapa 2) e, em seguida, a liberação desse íon no meio extracelular (etapa 3). No estado conformacional E2, o K^+ se liga com uma alta afinidade (etapa 4), a desfosforilação da enzima leva a oclusão de 2 íons de K^+ (etapa 5), os quais são liberados na face citoplasmática, que corresponde ao retorno da enzima ao estado E1 (etapa 6) (SCHEINER BOBIS, 2002).

Devido a sua grande importância na manutenção do potencial de repouso e propagação dos impulsos da célula neuronal, uma anormalidade na atividade dessa enzima pode estar relacionada à hiperexcitabilidade neuronal (DONALDSON *et al.*, 1997) e, subsequente, desenvolvimento de epilepsia (MCNAMARA, 1994).

Uma das evidências que associa alterações na atividade da Na^+/K^+ ATPase com o aparecimento de crises pode ser verificada por meio do uso de um inibidor específico da enzima, a ouabaína, que induz descargas focais quando aplicado localmente (BALDY-MOULINIER *et al.*, 1973). Além disso, o tratamento de fatias hipocâmpais com ouabaína, causa um grande efluxo de íons K^+ , bem como despolarização (HAGLUND e SCHWARTZKROIN, 1990), atividade epiléptica e morte celular (LEES e LEONG, 1994). Portanto, uma diminuição da atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase pode levar a um acúmulo de íons K^+ no meio extracelular e, conseqüentemente, induzir

um aumento na atividade epiléptica. RUTECKI *et al.* (1985) demonstraram que a elevação da concentração de K^+ extracelular de 5 para 10 mM causa um aumento de 5 vezes na atividade epiléptica em fatias hipocampais. Recentemente, SLAIS *et al.* (2008) demonstraram que animais submetidos ao *status epilepticus* induzido por LiCl-pilocarpina apresentam um aumento nas concentrações extracelulares de K^+ (3,07 para 13,3 mM) 80 min após a indução do insulto. Estes altos níveis de K^+ extracelular podem estar relacionados à baixa atividade da Na^+/K^+ ATPase observada por OLIVEIRA *et al.* (2008), sendo, portanto, um fator determinante para a manutenção da atividade epiléptica excessiva e anormal, observada durante o *status epilepticus* induzido por LiCl-pilocarpina (HIRSCH *et al.*, 1992).

Além disso, alterações na atividade desta enzima têm sido verificadas em cérebros de pacientes epiléticos (GRISAR e DELGADO-ESCUETA, 1986) e em modelos experimentais de epilepsia (MORI *et al.*, 1998). Uma redução na atividade da Na^+/K^+ ATPase foi verificada no cérebro de ratos submetidos ao modelo de epilepsia focal induzido por congelamento (GRISAR *et al.*, 1983) e, também, no modelo de epilepsia crônica induzida por ácido caínico (ANDERSON *et al.*, 1994). Alteração na atividade da ATPase foi também observada no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina (FERNANDES *et al.*, 1996; KINJO *et al.*, 2007). Ratos adultos apresentaram uma redução na atividade da enzima, no hipocampo, durante os períodos agudo e latente, e um aumento durante a fase crônica. A redução na atividade da enzima, durante SE e 7 dias após, pode refletir prejuízos causados pela crise, englobando aspectos conformacionais ou metabólicos, enquanto o aumento na fase crônica pode representar uma reação compensatória contra a hiperexcitabilidade. Em animais em desenvolvimento, não se observou alteração na atividade da enzima quando estes eram submetidos a um episódio de SE no 9º dia de vida. No entanto, um aumento na atividade da enzima foi observado no hipocampo, aos 7 e 30 dias após terceiro episódio de SE, induzido durante desenvolvimento (7-9 dias pós-natal), que, segundo os autores, estaria refletindo um processo de hiperexcitabilidade (KINJO *et al.*, 2007).

II.4.1 Efeito da hipóxia sobre a Na^+K^+ ATPase

No tecido cortical, durante manobras experimentais de hipóxia, a atividade epileptiforme é bastante estudada. O efeito direto da hipóxia é a redução da produção de ATP, provocando, assim, uma redução da atividade da bomba de Na^+/K^+ . Durante essas manobras, muitos neurônios centrais tornam-se hiperpolarizados (HANSEN *et al.*, 1982). Se a oxigenação não é restaurada, o potencial de membrana começa a decrescer, primeiro gradualmente e, depois, rapidamente, como descrito por AITKEN *et al.* (1998). Durante essa rápida despolarização, os neurônios perdem muito K^+ citoplasmático, acumulando Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- (HANSEN, 1985) intracelular. Como verificado por CARVALHO (2003), corroborando os achados experimentais de XIONG e STRINGER (2000) e as previsões através de simulações computacionais por RODRIGUES (2003), a redução do efluxo de sódio pela bomba de sódio-potássio, comparativamente ao influxo desse mesmo íon pelos diferentes mecanismos de eletrodifusão, pode prolongar um evento epileptiforme não-sináptico. Esse prolongamento ocorre em razão do retardo da ocorrência do ponto crítico que define o término do evento. Como apontado por RODRIGUES (2003), figura II.6, o retardo da ocorrência do ponto crítico acarreta em um aumento na duração do evento epileptiforme ou, em alguns casos, em transição do estado de atividade epileptiforme para Depressão Alastrante (DA).

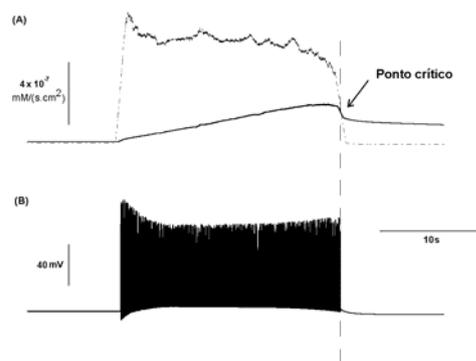


Figura II.6 – Análise do efeito da bomba de sódio-potássio, bombeando Na^+ para o meio extracelular, comparativamente ao influxo de Na^+ , através dos canais iônicos, durante um burst. (A) O influxo de Na^+ (curva tracejada) através dos canais é superior ao efluxo (curva contínua) resultante de bombeamento, através da bomba de sódio-potássio, durante os disparos de potenciais de ação (ver registro intracelular em B), que caracterizam o burst. Quando as posições dessas correntes se invertem, a partir do ponto crítico (seta), ocorre a repolarização da célula neuronal, indicando término do burst (RODRIGUES, 2003).

A administração do cianeto de sódio provoca um efeito similar ao da hipóxia, uma vez que os íons cianeto produzem uma forma de anóxia por inibição dos processos de respiração celular, agindo sobre a atividade da citocromo-oxidase, reduzindo, assim, a produção de ATP e, conseqüentemente, a atividade da bomba de Na^+/K^+ (MARTINS-FERREIRA, 1954).

A ouabaína, uma droga originalmente extraída do peixe baiacú, atua no sentido de inibir a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase. XIONG e STRINGER (2000) mostraram que a aplicação local de ouabaína (5 mM), na camada molecular do giro dentado de fatias do hipocampo, durante a ocorrência de eventos epileptiformes, causa um decréscimo no intervalo inter-evento e um aumento da duração de cada evento. Essas alterações podem ser visualizadas por meio do potencial extracelular, na figura II.7, medido na região dos corpos celulares granulares. Os autores observaram, ainda, a ocorrência de um acúmulo de K^+ no meio extracelular durante os *bursts*.

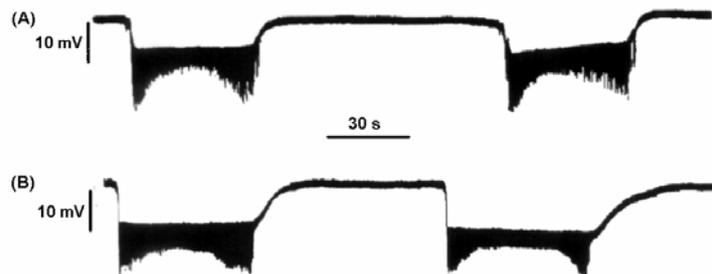


Figura II.7 – Efeito da aplicação local de ouabaína (5 mM), na região da camada molecular do giro dentado de fatias do hipocampo de rato, durante a ocorrência de eventos epileptiformes sustentados por conexões não-sinápticas. Os potenciais extracelulares de (A), medido antes da aplicação da droga, e de (B), após a aplicação, foram registrados na região dos corpos celulares de células granulares (adaptado de XIONG e STRINGER, 2000).

Com o objetivo de estudar o efeito bloqueador da ouabaína, RODRIGUES (2003) realizou simulações, para diferentes níveis de atividade da bomba de Na^+/K^+ . Na figura II.8, são apresentados os dois potenciais extracelulares correspondentes às simulações. Na simulação da parte B, a constante P_p' , que está associada à densidade de enzimas da bomba, foi reduzida de 50 % em relação à simulação da parte A. Pode-se observar que a redução do bombeamento pelas bombas de sódio-potássio causa uma

diminuição do intervalo inter-evento e um aumento na duração de cada evento, confirmando os achados experimentais reportado por XIONG e STRINGER (2000).

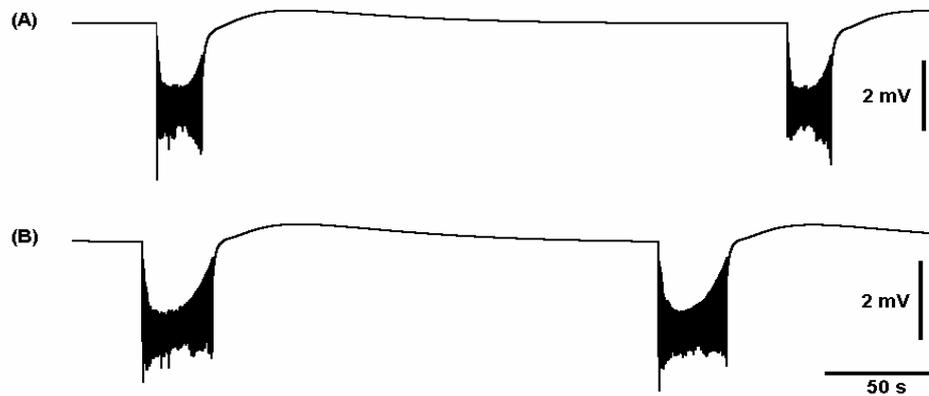


Figura II.8 – Efeito da redução da atividade da bomba de sódio-potássio durante a simulação das atividades epileptiformes. A densidade de enzimas $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP-ase}$ foi reduzida em 50%, em (B), em relação à simulação de (A). Há uma marcante redução no intervalo inter-evento e um aumento na duração dos eventos (RODRIGUES, 2003).

II.5 Mecanismos não-sinápticos

No início do século XX, C. Sherrington introduziu o termo sinapse para descrever os pontos de comunicação entre neurônios. A partir daí, estabeleceu-se uma polêmica sobre o mecanismo básico da comunicação neuronal. Durante a década de 30, J. C. Eccles *et al.* levantaram a hipótese de que as transmissões através das sinapses eram elétricas, enquanto H. H. Dale (juntamente com G. L. Brown, W. S. Feldberg, J. H. Gaddum e M. Voght) acreditava que eram químicas. Atualmente, sabe-se da coexistência das duas formas de transmissão, apesar da evidente supremacia das conexões sinápticas químicas em cérebro de vertebrado. Como a quantidade de substâncias químicas envolvidas nas transmissões através de sinapses, chamadas neurotransmissores, é muito grande e a maioria dos neurotransmissores tem mais de um tipo de receptor, torna-se enorme a diversidade de tipos de comunicação química.

Durante o início das crises epilépticas, as transmissões sinápticas químicas são predominantemente importantes. O efeito sináptico, durante as atividades epileptiformes *in vitro*, é normalmente aumentado com a geração de potenciais de ação repetitivos, os quais conduzem a um aumento da liberação de neurotransmissores em muitos terminais sinápticos (GUTNICK e PRINCE, 1972). Contudo, interações não sinápticas têm também importante participação na geração e sustentação das crises, principalmente por estarem associadas a processos de sincronização. Os efeitos não sinápticos são mais pronunciados durante intensa atividade neuronal, onde há aumento na $[K^+]_o$ e concomitante queda de Ca^{2+} . Essas condições deprimem as transmissões sinápticas e forçam o efeito de interações entre conjuntos de células neuronais.

As discussões sobre as interações não sinápticas ganharam grande importância a partir de 1982, quando dois trabalhos, publicados no intervalo de duas semanas (TAYLOR e DUDEK, 1982; JEFFERYS e HAAS, 1982), deram ênfase ao fato de que é possível a indução de atividades epileptiformes, durante o bloqueio das atividades sinápticas.

De fato, os mecanismos não-sinápticos, apesar de menos versáteis e menos específicos que as sinapses químicas, têm grandes conseqüências funcionais. A transmissão não-sináptica do impulso nervoso ocorre por meio da transferência de corrente iônica de uma célula para outra, através de canais (junções) que permitem que os íons do citoplasma de uma célula passem para o citoplasma de outra. Dentre esses mecanismos, quatro deles são predominantemente importantes e, por isso, merecem maior destaque: o acoplamento eletrotônico mediado por *gap-junctions*, o efeito de campo elétrico, o efeito efáptico e, por último, as flutuações iônicas. Todos esses processos têm significativa contribuição sobre atividades epileptiformes, principalmente por estarem relacionados à sincronização neuronal e a modulação da excitabilidade.

O acoplamento eletrotônico entre neurônios ou grupos de neurônios, pode ser mediado por pequenas estruturas que interligam os meios intracelulares, conhecidas como junções eletrotônicas ou *gap-junctions* (MACVICAR e DUDEK, 1982, JEFFERYS, 1995, CARLEN *et al.*, 2000). Essas estruturas são formadas por macromoléculas de proteínas, conexinas, que formam canais de aproximadamente 1,5 nm de diâmetro, que permitem a comunicação direta entre os meios citoplasmáticos de duas células adjacentes. Dessa forma, quando ocorrem potenciais de ação em uma célula, correntes fluem rapidamente através das *gap-junctions* e despolarizam a célula vizinha (JEFFERYS, 1995).

Os efeitos de campo elétrico ocorrem quando correntes elétricas produzidas por atividades neuronais mudam a excitabilidade de outros neurônios vizinhos não conectados. Ou seja, a corrente gerada por um neurônio é conduzida, através do meio extracelular, e atinge outros neurônios causando despolarizações em suas membranas (JEFFERYS, 1995). Esse efeito é facilmente identificado em experimentos de indução de atividades epileptiformes, pois, nesse caso, as correntes extracelulares, devidas aos potenciais de ação, são maiores por causa do sincronismo (TAYLOR e DUDEK 1984).

As interações efápticas, consistem em um tipo específico de comunicação elétrica, que ocorre entre neurônios vizinhos muito próximos. O fato de tanto o efeito efáptico, como o efeito de campo elétrico, ser mediado por correntes elétricas fluindo através do espaço extracelular (JEFFERYS, 1995) faz com que a fronteira entre esses dois tipos de interação não fique bem definida (DUDEK *et al.*, 1986). A diferença marcante entre as duas formas de comunicação é que o termo interação efáptica é usado restritamente para interações de campo elétrico presentes em somente dois ou poucos neurônios muito próximos, em nervos e axônios desmielinizados justapostos (JEFFERYS, 1995).

As flutuações iônicas caracterizam-se pelo movimento dos íons ao longo do meio extracelular. Podem contribuir para a comunicação neuronal, uma vez que o funcionamento normal do cérebro depende do equilíbrio extracelular de diversos tipos de íons, como potássio, cálcio, sódio, cloreto e magnésio (LUX *et al.*, 1986).

Tanto por meio de simulação (ALMEIDA *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2003), quanto por realizações de experimentos (XIONG e STRINGER, 2000), observa-se que a variação da concentração extracelular de K^+ causa grande alteração na excitabilidade neuronal. O aumento da concentração extracelular de K^+ gera a despolarização das membranas celulares neuronais. Uma diminuição no espaço extracelular aumenta as interações não-sinápticas por flutuações nas concentrações iônicas extracelulares, e, em razão do aumento da resistência extracelular, reforçam, diretamente, os efeitos de campo elétrico (DUDEK *et al.*, 1993; TRAUB *et al.*, 1985).

II.6 Modelo do alto K⁺

Os experimentos de indução de atividades epileptiformes (AEs) em fatias de hipocampo de ratos, nos quais os íons de Ca²⁺ são suprimidos na solução nutriente, mostram a importância das comunicações neuronais não-sinápticas sobre as crises epiléticas (JEFFERYS, 1995; XIONG E STRINGER, 2000; DUDEK *et al.*, 1993). Trabalhos ainda sugerem que reduções de cálcio não são essenciais para contribuição dos mecanismos não-sinápticos no desenvolvimento de atividade epilética (COSTA, 2009; BIKSON *et al.*, 2002; JENSEN e YAARI, 1997). Segundo ALMEIDA *et al.*, (2008), com essas evidências, a contribuição das conexões não-sinápticas podem ter uma maior relevância do que se suspeitava.

Inicialmente, as atividades epileptiformes sustentadas por conexões não-sinápticas foram estudadas apenas na região CA1 (KONNERTH, 1984; TAYLOR e DUDEK, 1982; JEFFERYS e HAAS, 1982), uma vez que nesta região as atividades podiam ser induzidas mais facilmente. Depois, SNOW e DUDEK (1984) mostraram que também é possível induzi-las nas regiões CA2, CA3 e giro dentado. Os eventos epileptiformes na região do giro dentado apresentam atividades neuronais síncronas com maiores durações e amplitudes, sob condições experimentais de alta concentração extracelular de K⁺ e baixa concentração de Ca²⁺ (figura II.9) (XIONG e STRINGER, 2000; CARVALHO, 2003; PAN E STRINGER, 1996)

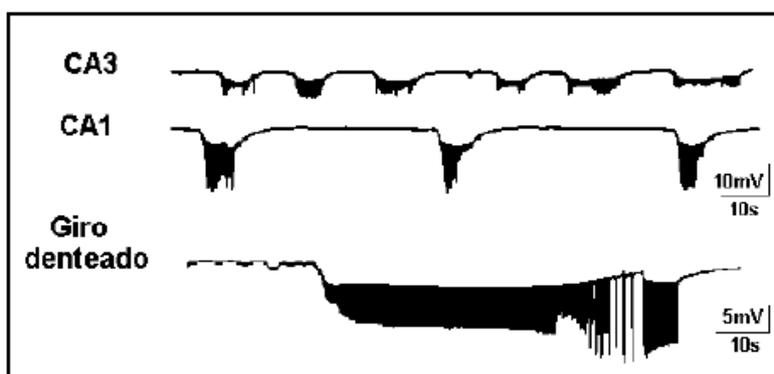


Figura II.9 - Registro de eventos epileptiformes não-sinápticos (salva de espículas formadas por potenciais de ação síncronos, denominadas *population spikes*, após um deslocamento negativo da linha de base) característicos das regiões do hipocampo, após perfusão com solução sem Ca²⁺ e com alta [K⁺]. Na região CA1, eventos epileptiformes, os *bursts* apresentam PS's com grandes amplitudes, na região CA3, os PS's ocorrem de forma mais estável e com menor intervalo de tempo entre os eventos. E no GD, há atividade neuronal intensa, com descargas em salva prolongadas e com variação negativa da linha de base seguido de PS's de grandes amplitudes (DUDEK *et al.*, 1993).

A AEs típicas da supressão de conexões sinápticas caracterizam-se por uma salva de espículas, formadas pelo disparo simultâneo de potenciais de ação, denominadas de populações de espículas (do inglês *population spike*), superpostas a um deslocamento negativo da linha de base. Esses eventos são chamados de descargas em salva (DS), caracterizadas por salvas de potenciais de ação (figura II.10) (JEFFERYS e HAAS, 1982; DUDEK *et al.*, 1993).

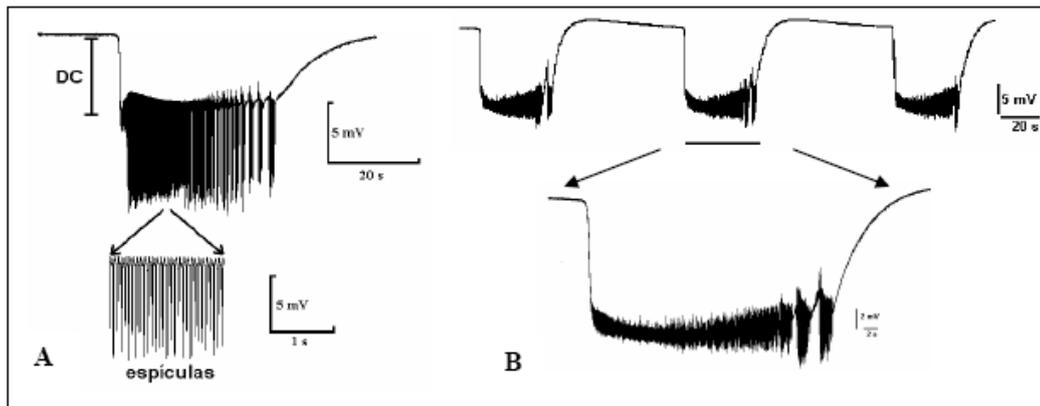


Figura II.10 – Descargas em salva (DS) características da região do giro dentado. Em A- Descarga em salva (*burst*), durante as atividades epileptiformes induzidas através do protocolo experimental alto- K^+ (8 mM) e zero- Ca^{2+} adicionado. Em B, exemplo de uma seqüência de descarga em salva (modificado de VIVAS, 2005).

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Animais experimentais

Para a realização deste trabalho, foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, com idades de 10, 21 e 60 dias de vida, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ). Os animais foram mantidos em biotério local, sob condições ambientais controladas: temperatura ambiente $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

III.2 Modelo de epilepsia induzida por pilocarpina

Para a indução do modelo de epilepsia, foi administrado cloridrato de pilocarpina (PILO), um agonista colinérgico muscarínico, na dose de 360 mg/Kg (Merck, USA), via intraperitoneal (ip), após 20 minutos do pré-tratamento com 1mg/kg de nitrato de metil-escopolamina por via subcutânea (sc) (Sigma). A administração da metil-escopolamina tinha por finalidade atenuar os efeitos periféricos provocados pela injeção de pilocarpina (PRIEL *et al.*, 1996).

Após a aplicação da PILO os animais apresentaram crises límbicas as quais evoluíram para *Status Epilepticus* (SE), sendo essa denominada fase aguda do modelo. Ao final desse período, inicia-se a fase latente, com duração média de 4 a 44 dias, caracterizada pela ausência de sinais comportamentais e eletrográficos de atividade epiléptica e que termina com o aparecimento da primeira crise espontânea (que ocorre durante toda a vida do animal), a qual marca o início do período crônico do modelo. Na figura III.1 está representado o delineamento experimental do modelo da pilocarpina utilizado neste trabalho.



Figura III.1 - Delineamento experimental do modelo da Pilocarpina. MS – metil escopolamina, SE – *Status Epilépticos*, induzido pela injeção de Pilocarpina, CER – crises espontâneas recorrentes. Ao longo da fase latente, 7 dias após o SE, as fatias de hipocampo foram preparadas para eletrofisiologia.

Os animais pertencentes ao grupo controle também receberam pré-tratamento com metil-escopolamina (1mg/kg); no entanto, receberam solução salina 0,9%, ao invés de pilocarpina.

O registro do potencial elétrico (PE) extracelular, durante indução experimental de epilepsia sustentada por conexões não-sinápticas, foi realizado sete dias após a aplicação da solução salina 0,9% (Grupo controle) e da PILO (Grupo tratado). Os parâmetros do PE dos dois grupos foram quantificados para comparação dos resultados.

III.3 Procedimentos experimentais para registro do potencial elétrico

III.3.1 - Isolamento do hipocampo e obtenção das fatias

Para o isolamento do hipocampo os animais foram decapitados, após anestesia em plano profundo, utilizando a nebulização com éter (WEISSINGER *et al.*, 2000). Em seguida, a calota craniana foi exposta fazendo um corte longitudinal no escalpo (figura III.2 A), sendo, depois, cortada mediana e lateralmente (figura III.2 B). Posteriormente, as partes superiores da calota craniana foram removidas (figura III.2 C). Uma vez exposto, o encéfalo foi imediatamente banhado com solução de composição semelhante ao fluido céfalo-raquidiano (Ringer Normal, composição descrita na Tabela III.1) utilizando-se um conta-gotas. Introduzindo uma espátula, inicialmente, sob o cerebelo e, posteriormente, sob a parte frontal do cérebro, este foi desconectado da medula (figura

III.2 D). Já completamente desconectado, o encéfalo foi cuidadosamente removido e imerso em solução de Ringer Normal resfriada de 0 a 2 °C (figura III.2 E).

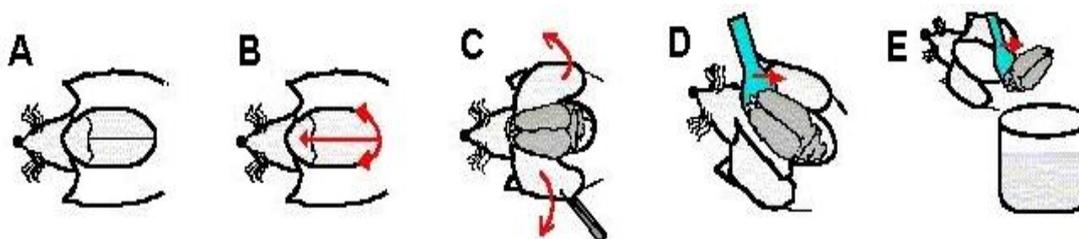


Figura III.2 - Procedimento realizado para a retirada do encéfalo da cavidade craniana. A) abertura do escalpo; B) corte mediano e lateral na calota craniana; C) remoção das partes superiores da calota craniana; D) retirada do encéfalo da cavidade craniana; E) remoção do mesmo para uma solução nutritiva semicongelada. (Modificado de PEREIRA, 2005).

Para o isolamento dos hipocampos, o encéfalo foi transferido para uma placa de Petri, coberta com papel filtro. Sob banho constante de toda a estrutura com solução de Ringer Normal gelada, o cerebelo (Figura III.3 , partes A, B e C) e, depois, os dois hemisférios cerebrais (Figura III.3 , partes D e E) foram separados com o auxílio de um bisturi. Enquanto um dos hemisférios era dissecado, o outro era mantido imerso em solução de Ringer Normal gelada. O procedimento de dissecação de cada hemisfério foi iniciado com um corte para separar o córtex frontal, seguido do posicionamento do hemisfério sobre a face de corte. A seguir, utilizando-se duas micro-espátulas, o tálamo foi removido (Figura III.3, parte F), permitindo assim a visualização da estrutura hipocampal. Introduzindo cuidadosamente as micro-espátulas por baixo e pelas laterais, o hipocampo foi desligado do restante do córtex (Figura III.3, partes G, H e I). O mesmo procedimento foi realizado com o outro hemisfério.

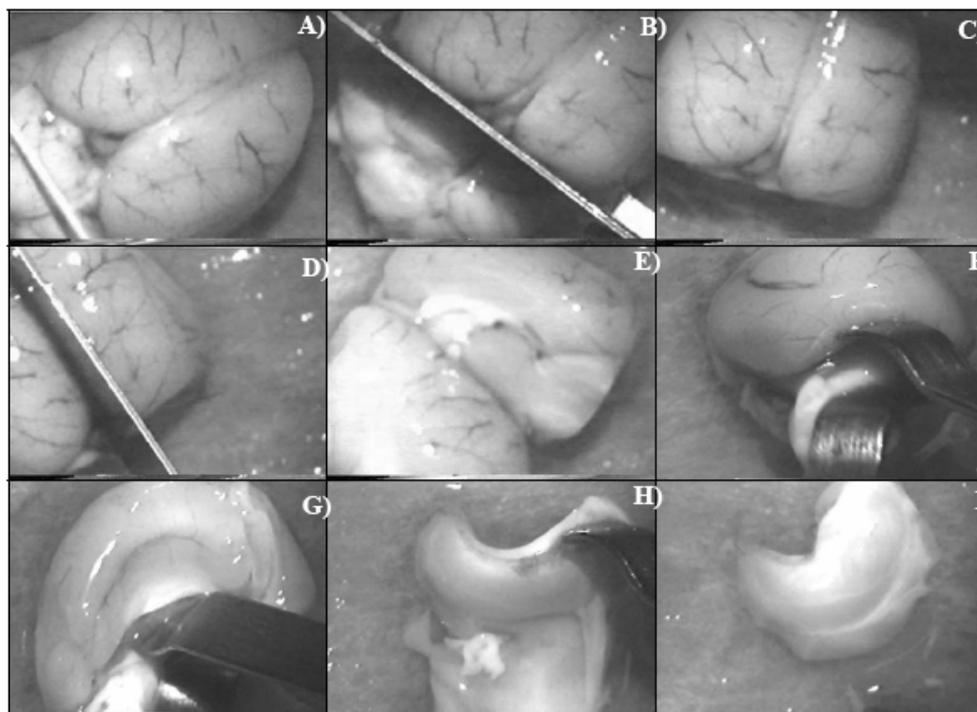


Figura III.3 – Isolamento do hipocampo do restante do encéfalo de rato. As fotos A, B, C, D e E demonstram os cortes realizados para facilitar a dissecação. Em F, G, H, são mostrados detalhes da separação do tálamo, com ajuda de micro-espátulas. Em I, está a imagem do hipocampo, após ser isolado do restante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

Após devidamente isolado, o hipocampo, com a face alveolar disposta para cima, foi levado ao fatiador do tipo *chopper*, para obtenção de fatias de 400 μm de espessura. Cálculos de difusão do oxigênio sobre o tecido sugerem que fatias com essa espessura podem ser mantidas oxigenadas, quando sob perfusão contínua (NICHOLSON e HOUNSGAARD, 1983). Com auxílio de um pincel de cerdas finas, cada hipocampo foi posicionado no *chopper*, de modo a estabelecer um ângulo de 70° em relação ao eixo da fímbria. Esse ângulo de corte foi utilizado visando preservar conexões intrínsecas do hipocampo (fibras musgosas, colateral de *Schaffer* e axônios da região CA1), as quais encontram-se dispostas transversalmente, com um ângulo de 70° , em relação ao eixo longitudinal do hipocampo (TEYLER, 1980; LOPES DA SILVA *et al.*, 1990). Na figura III.4, são apresentadas ilustrações do hipocampo e as conexões intrínsecas das lamelas.

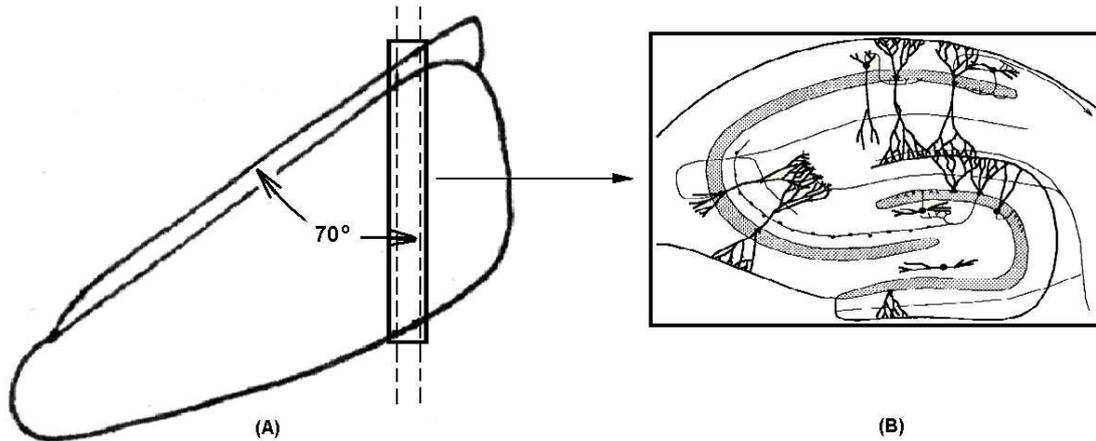


Figura III.4 - Representação esquemática do hipocampo com o respectivo ângulo de corte e suas conexões intrínsecas. Em (A), tem-se a representação esquemática do hipocampo, onde se identifica o ângulo de 70° em relação ao eixo da fimbria para o fatiamento, de modo a preservar as conexões intrínsecas,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

É importante que a lâmina do fatiador esteja bem ajustada, de forma que seu corte alcance metade da espessura do filtro de papel, permitindo um corte completo das fatias. Após cada corte, as fatias retiradas do terço médio do hipocampo foram colocadas em uma câmara de perfusão (Figura III.5), contendo solução de Ringer Normal oxigenada e à temperatura de aproximadamente 31,5 °C.

Após cerca de 50 minutos de perfusão, as fatias foram transferidas para a câmara de interface (Figura III.6), onde foram posicionadas sobre uma membrana de *Millipore*, para registro das atividades epileptiformes. As fatias foram inicialmente perfundidas com solução de Ringer Normal por cerca de 50 minutos. Posteriormente, a solução foi trocada pela solução de indução contendo alto K^+ e zero Ca^{2+} (composição descrita na Tabela III.1). O pH foi mantido em 7.4, por meio da saturação com carbogênio (95% O_2 e 5% CO_2) sob borbulhamento constante.

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

Tabela III.1 – Composição das soluções de perfusão e de indução (valores em mM).

Substância	Solução de perfusão (Normal)	Solução de indução
NaCl	127,0	127,0
KCl	2,0	7,0
MgSO₄*	1,5	1,5
NaHCO₃	26,0	26,0
KH₂PO₄	1,1	1,1
Glicose	10,0	10,0
CaCl₂*	2,0	0,0

* sais adicionados após ajuste do pH em 7,4

III.3.2 Equipamentos utilizados para indução das atividades epileptiformes

III. 3.2.1 - Câmara de perfusão

Uma câmara de perfusão foi utilizada para manter em descanso as fatias, preservando-as de lesões de excitotoxicidade, comuns após o procedimento de corte. A câmara é constituída de conexões e tubos em PVC, que são estruturados em forma de U (Figura III.5). O ramo de maior diâmetro consiste de um compartimento subdividido por uma rede de nylon, sobre a qual as fatias descansam. Todo o sistema foi preenchido com solução de Ringer Normal continuamente oxigenada, com fluxo estabelecido pelo borbulhamento, que permite uma perfusão suave e adequada. O pH da solução foi mantido constante, em torno de 7,4, devido à saturação promovida pelo borbulhamento com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). As fatias foram mantidas submersas nessa câmara por no mínimo 50 minutos, sendo a temperatura controlada em 31,5° C. Após esse período, as fatias estavam aptas ao protocolo de indução de atividade epileptiforme na câmara de interface.

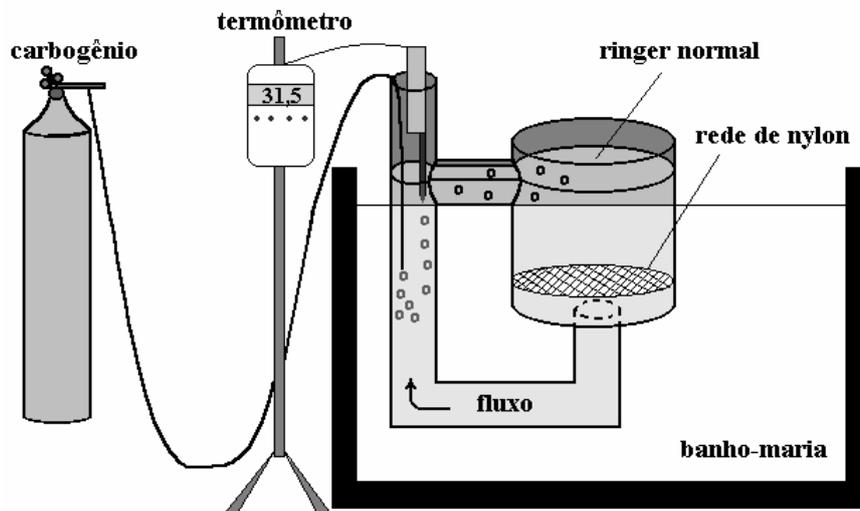


Figura III.5 – Diagrama esquemático da câmara de perfusão montada com tubos e conexões em PVC. A câmara é preenchida com solução de Ringer Normal, mantida à temperatura e oxigenação constantes. As fatias são depositadas no ramo de maior diâmetro sobre uma rede de nylon. (PEREIRA, 2005).

III.3.2.2 – Câmara de interface

Após a permanência na câmara de perfusão, as fatias eram transferidas para a câmara de interface, onde ocorre indução das atividades epileptiformes, bem como os registros do sinal elétrico. Existe uma ampla variedade de câmaras de interface. A câmara utilizada neste trabalho é uma variante daquelas utilizadas em diversos trabalhos que visam o estudo de fatias *in vitro* (HATTON *et al*, 1980; PAN e STRINGER, 1996; SHWARTSKRON, 1975). Ilustrada pela figura III.6, a câmara consiste de dois módulos acopláveis: a cuba (figura III.7) e o banho-maria conectados a uma mesa estática. O banho-maria é composto de quatro resistores cerâmicos de 5Ω , 20 W de dissipação, ligados em paralelo, encerrados em invólucros de vidro, e dois borbulhadores que dispersam carbogênio no interior do recipiente. Os resistores, submetidos a tensões contínuas, até 12 V, permitem o aquecimento controlado da água do banho-maria. As tensões são controladas via software, desenvolvido em plataforma LABVIEW 6.1 (NATIONAL INSTRUMENTS), especialmente para esse tipo de controle. O equipamento é capaz de manter temperaturas constantes em torno de 32°C, com

precisão de um décimo de grau. A água contida no banho-maria aquece as paredes do tubo em torno do cilindro central, no interior do recipiente. Esse mesmo tubo conduz as soluções para cuba, permitindo a perfusão das fatias com a solução sob temperatura devidamente controlada. Tubos de silicone conduzem o oxigênio ao interior do banho-maria. Os borbulhadores dispersam o carbogênio dentro da água, tornando-o aquecido e umidificado para, em seguir, ser direcionado sobre a face superior das fatias mantidas na cuba.

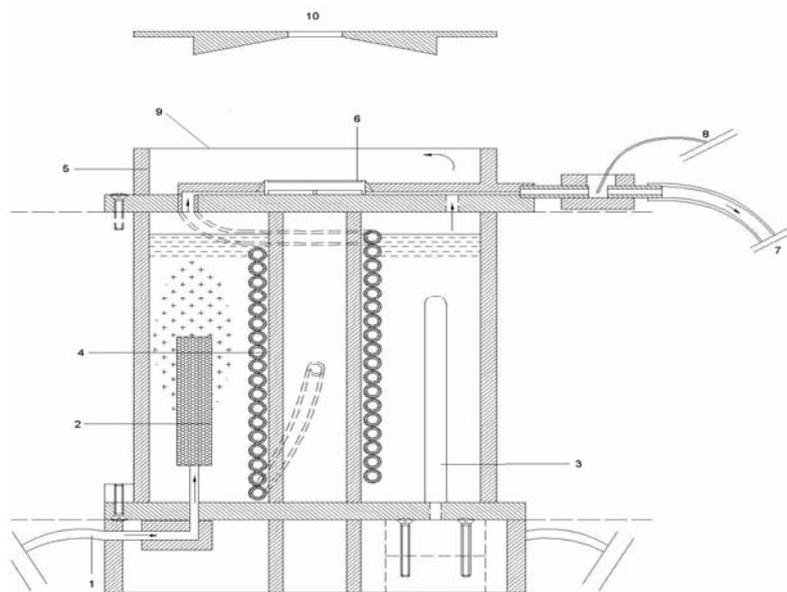


Figura III.6 – Diagrama esquemático da câmara de interface (banho-maria e cuba). Em 1, tem-se a representação do tubo de silicone que conduz o carbogênio para o interior da câmara. Em 2, um dos dois borbulhadores de oxigênio existentes na câmara. Em 3, está representado uma das quatro resistências envolvidas em invólucros de vidro. Em 4, tem-se o tubo de silicone que conduz a solução até as fatias. Em 5, está representada a cuba, que pode ser vista em maiores detalhes na figura III.7. Em 6, a membrana de Millipore, sobre a qual as fatias são depositadas. Em 7, tem-se o tubo para sucção da solução. Em 8, o fio terra da solução. Finalmente, em 9, o disco de acrílico com um orifício ao centro, e, em 10, o disco que recobre a cuba (Modificado de VIVAS, 2005).

A cuba é composta por dois cilindros e uma base em acrílico, acoplada superiormente ao banho-maria (figura III.7). O cilindro central, onde se encontra a membrana de Millipore (0.4 μ M *Millicell culture plate inserts*; *Millicell, Bedford, MA, USA*), para deposição das fatias, possui um volume bem reduzido, de aproximadamente 0.34 ml, o que permite que toda a solução em contato com as fatias seja constantemente renovada. A base em acrílico apresenta pequenos orifícios para que o carbogênio, depois de atravessar o banho-maria, possa, já umidificado, atingir as fatias. Uma tampa, em forma de disco, encobre o ambiente em torno das fatias, permitindo uma melhor oxigenação e contribuindo para homogeneizar a temperatura no interior da cuba. A tampa contém um orifício central, que permite a inserção do eletrodo de registro do sinal elétrico, bem como a exaustão do carbogênio.

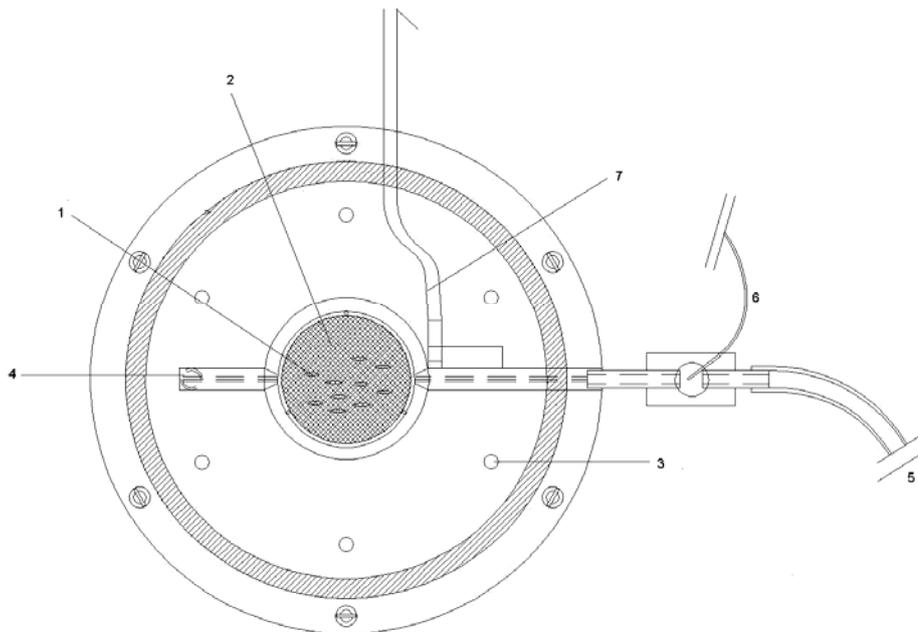


Figura III.7 – Representação esquemática da cuba utilizada para indução das AE's. As fatias, em 1, são sustentadas por uma membrana de Millipore, posicionada sobre o cilindro central, representada em 2. Em 3, tem-se a representação dos orifícios na base da cuba, que permitem que o carbogênio, depois de umidificado e aquecido, atinja as fatias. Em 4, está representado o canal por onde a solução chega às fatias, e em 5, o tubo por onde ocorre a sucção da solução. Em 6, tem-se a representação do fio terra da solução, e, finalmente, em 7, tem-se a representação do termômetro que controla a temperatura da solução que chega às fatias. (Modificado de VIVAS, 2005).

III.4 - Sistemas de medição, aquisição e visualização

Para aquisição dos sinais do potencial elétrico extracelular (PE), foi utilizado um eletrodo formado por filamentos de prata e micropipeta de vidro (modelo THINWALL, TW150F-3 – WPI). A pipeta foi estirada em um puxador de pipetas (modelo DMZ UNIVERSAL PULLER – ZEITZ-INSTRUMENTS) e preenchida com solução de NaCl 1,0M, produzindo uma impedância de 5 a 10 M Ω , suficiente para proporcionar um baixo nível de ruído. Os filamentos de prata foram cloretados para evitar o efeito de bateria provocado pela acumulação de cargas na interface metal-líquido. A cloretagem foi feita mergulhando-se dois filamentos de prata em solução de HCl 1,0 M. Em seguida, utilizando-se uma fonte de corrente contínua, foi aplicada uma tensão de até 1,0 V entre os filamentos durante 15 minutos, aproximadamente. O filamento ligado ao terminal positivo atrai os íons Cl $^-$, formando uma capa escura sobre a superfície, enquanto o outro terminal atrai os íons H $^+$.

Após cloretado, o eletrodo foi conectado a uma *headstage* (modelo AI 402 \times 50, ULTRALOW NOISE AMPLIFIER – AXON INSTRUMENTS), interligada a um amplificador (modelo CYBERAMP 380 – AXON INSTRUMENTS), para a aquisição do sinal. O programa SAE (Sistema Auxiliar de Experimentos), desenvolvido no LANE (SILVA, 2000), foi utilizado para controle do amplificador, digitalização, exibição em tempo real e armazenamento de arquivos. A amostragem do sinal foi feita utilizando a taxa de 10.000 amostras por segundo e o sinal foi amplificado 500 vezes. Um filtro foi utilizado para redução do ruído de fundo.

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

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

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

Para minimizar as vibrações mecânicas durante os experimentos, utiliza-se uma mesa anti-vibração, que consiste de um tampo de pedra suspenso por câmaras de ar, onde são dispostos os equipamentos. As câmaras de ar permitem ajustar o nível de trabalho da mesa. No intuito de isolar os equipamentos de possíveis interferências eletromagnéticas, a mesa foi envolvida por uma gaiola de Faraday. Na Figura III.8, um desenho esquemático representa os equipamentos utilizados para aquisição dos sinais do PE.

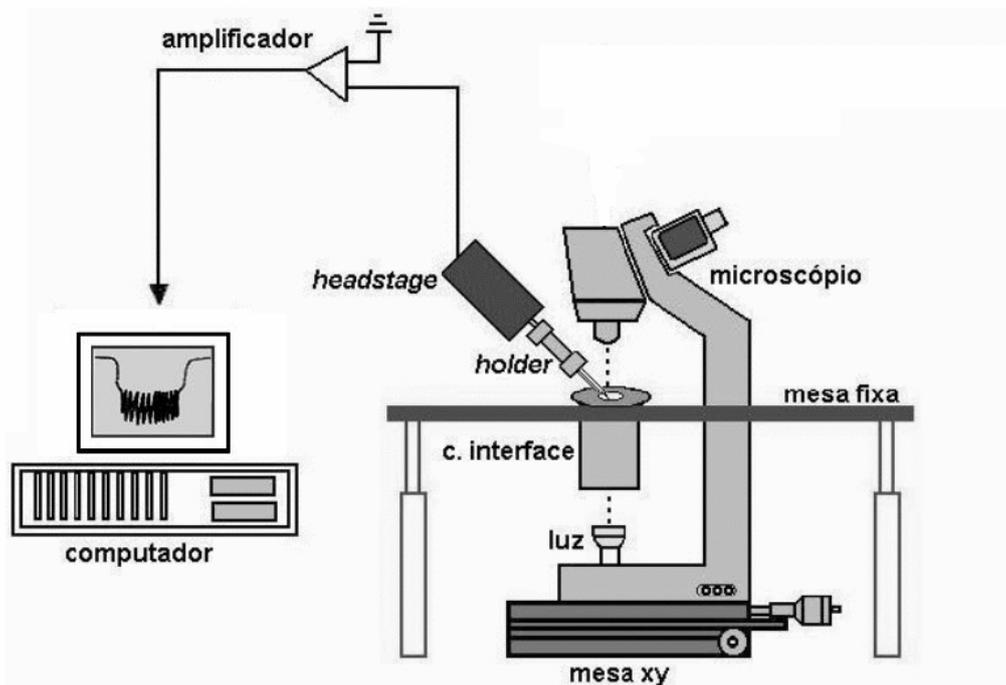


Figura III.8 - Diagrama esquemático do *setup* experimental utilizado para o registro do PE. O PE foi registrado a partir do posicionamento do eletrodo de registro no GD. O eletrodo é conectado a uma *headstage* por meio de um *holder*. A *headstage* é interligada a um amplificador biológico. Os sinais são armazenados em um computador. As fatias são iluminadas pela luz gerada na base do microscópio (Modificado de PEREIRA, 2005).

III.5 - Manobras de hipóxia

Após o início das atividades epileptiformes não sinápticas, foram realizadas manobras de hipóxia, que interferem na atividade da bomba de Na/K. A manobra de hipóxia consiste da supressão ou redução da oxigenação do tecido. O efeito direto da hipóxia é, portanto, a redução da produção de ATP, provocando, assim, redução na atividade (ou eficiência) da bomba de Na/K. Se a oxigenação for restabelecida sem danos irreversíveis à atividade neuronal, a repolarização volta ao seu nível normal e as funções celulares são recuperadas (SOMJEN, 2001).

Manobras de hipóxia foram realizadas, durante o evento e no intervalo entre os eventos epileptiformes não sinápticos, as quais consistiram do bloqueio da perfusão do tecido com carbogênio.

A fim de verificar, de forma controlada, o efeito da hipóxia sobre as atividades epileptiformes, a manobra de hipóxia durante o evento consistiu do bloqueio da perfusão do tecido com carbogênio, exatamente no momento em que a linha de base do sinal extracelular iniciava sua excursão descendente e esse bloqueio foi mantido até que o sinal iniciasse sua excursão ascendente (Figura III.9 A). Já a manobra de hipóxia no intervalo entre eventos iniciava-se após a finalização de um evento e era cessada no momento em que se iniciava o próximo evento (Figura III.9 B).

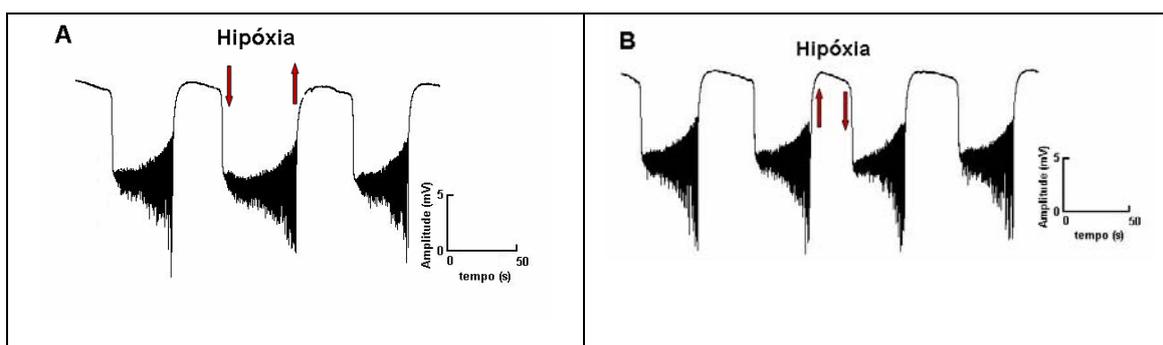


Figura III.9 – Representação da manobra de hipóxia. Em A, está representada a manobra de hipóxia durante um evento epileptiforme não-sináptico e, em B, a manobra de hipóxia no intervalo entre dois eventos epileptiformes não-sinápticos.

Com isso, o que se pretendia era medir o efeito da redução da atividade da bomba de Na/K, submetendo o tecido a um mínimo de interferência sobre sua homeostase. A não interferência sobre o equilíbrio homeostático do tecido foi garantida

pela confirmação da recuperação das dinâmicas morfológicas e temporais tais quais as dos eventos imediatamente anteriores à manobra de hipóxia.

III.6 - Análise quantitativa dos parâmetros do potencial elétrico

Para análise quantitativa do PE extracelular, foram observados os seguintes parâmetros: amplitude da componente DC (DC), amplitude média dos PS's (PS), amplitude máxima dos PS's (A_{max}), duração dos eventos (DE), intervalo entre eventos (IE) e latência (LT).

A análise dos parâmetros foi realizada utilizando-se uma amostra correspondente a 6 *bursts* em cada experimento. Em relação as manobras de hipóxia foram também analisadas 6 manobras durante o evento e 6 no intervalo entre os eventos para cada experimento.

O parâmetro latência (LT) foi calculado subtraindo-se o tempo de início das AEs pelo tempo de início de perfusão das fatias com solução contendo zero cálcio e alto potássio (Solução de indução).

A quantificação dos parâmetros do PE extracelular foi realizada utilizando-se programas desenvolvidos no Laboratório de Neurociência Experimental e Computacional (LANEC), em plataforma MATLAB, para leitura e análise dos arquivos contendo potenciais elétricos.

III.6.1- Análise quantitativa da amplitude da componente DC

A Transformada Discreta de Fourier (DFT) foi utilizada como ferramenta e aplicada ao sinal do potencial elétrico extracelular, para separar a componente DC dos PS's, cujas componentes juntas formam os *bursts* epileptiformes.

A partir do cálculo da DFT do sinal elétrico, foi possível cortar a frequência baixa, abaixo de 10 Hz, que corresponde à componente DC do sinal cujas componentes apresentam frequência alta, correspondente aos PS's, conforme exemplo ilustrado na Figura. III.10. Posteriormente, fazendo a Transformada Inversa de Fourier, foi obtido o sinal contendo apenas a componente DC, sem os PS's.

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

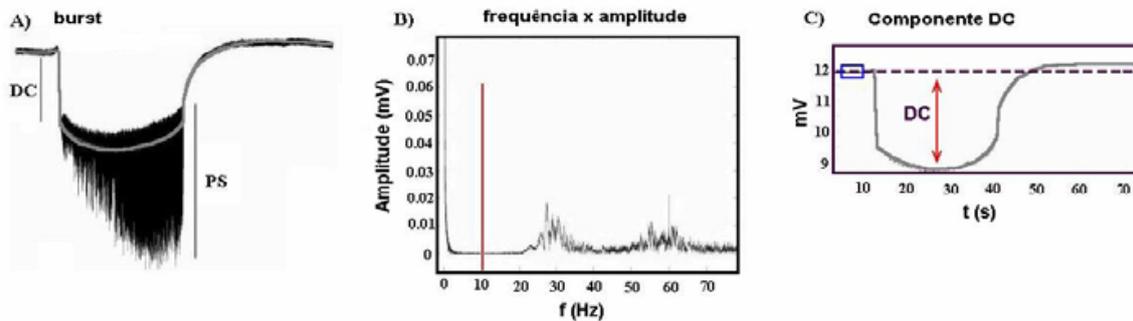


Figura III.10 - Procedimento para obtenção da componente DC. A) Sinal completo de um *burst* contendo a componente DC e os PS's. B) Sinal elétrico após aplicação da Transformada de Fourier, indicando o espectro de frequência. A frequência do sinal foi cortada abaixo de 10 Hz. C) Sinal elétrico da componente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

III.6.2 - Análise quantitativa da amplitude dos *Populations Spikes*

A amplitude dos PS's, a qual corresponde à alta frequência dos *bursts*, também foi encontrada utilizando-se o cálculo da Transformada Discreta de Fourier (DFT) do sinal elétrico, que corta frequências inferiores a 10 Hz, correspondente à componente DC, restando um sinal cujas componentes em frequência correspondem aos eventos PS's. Para determinar a amplitude média dos PS's, o programa de análise do PE calcula a integral do módulo desse sinal e o valor encontrado é dividido pela duração do evento, correspondendo ao parâmetro (em mV), indicado nas análises como parâmetro PS. Já o parâmetro A_{max} (mV) foi determinado pelo programa por meio da marcação das maiores amplitudes alcançadas pelos PS's em cada *burst*. Na Figura III.11, tem-se a ilustração dos procedimentos para obtenção dos PS's.

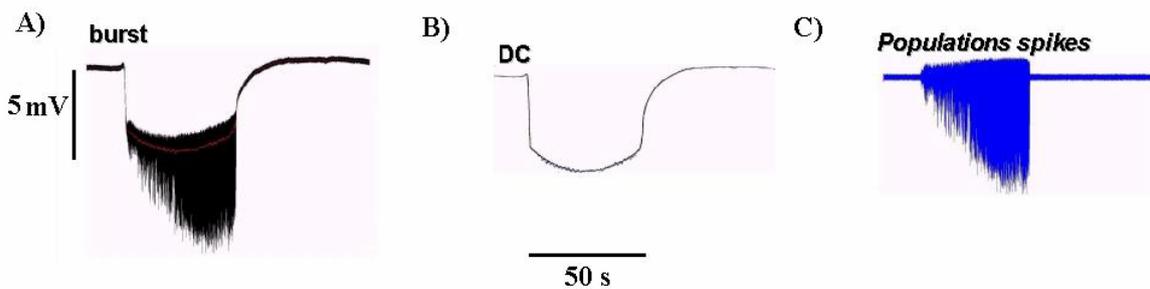


Figura III.11 - Representação do procedimento adotado para obtenção da amplitude dos PS's. Em (A), observa-se o sinal completo, em (B) o sinal da componente DC, que será subtraído do sinal completo e, em (C), o resultado da subtração, que é o sinal referente aos PS's.

III.6.3 - Análise quantitativa da duração do evento

A partir da linha de base e do sinal da componente DC, o parâmetro DE foi calculado. Para isso, foram adotados os instantes t_{final} e t_{inicial} , que estão representados na figura III.12.

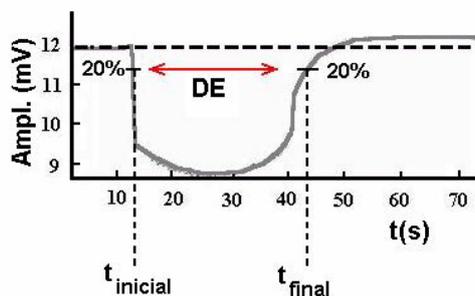


Figura III.12 - Exemplo da técnica utilizada para o cálculo do parâmetro DE. Considerando t_{inicial} , quando o sinal atinge uma variação de 20% em relação à linha de base, e t_{final} , quando o sinal retorna a 20% em relação à linha de base, o parâmetro DE foi calculado subtraindo-se o instante t_{final} pelo instante t_{inicial} de cada evento.

Para esse cálculo, o instante t_{inicial} foi considerado quando o sinal atinge uma variação de 20% da amplitude máxima, em relação à linha de base, e, o instante t_{final} , quando o sinal retorna a 20% da amplitude máxima em relação à linha de base. O parâmetro DE foi calculado subtraindo-se o instante t_{final} pelo instante t_{inicial} de cada evento.

III.6.4- Análise quantitativa do intervalo entre eventos

O cálculo do parâmetro IE foi realizado utilizando-se os mesmos parâmetros de identificação do instante $t_{inicial}$ e do instante t_{final} dos eventos. Dessa forma, o IE foi considerado como sendo o intervalo de tempo entre o instante t_{final} até o instante $t_{inicial}$. Na figura III.13, ilustra-se esse procedimento.

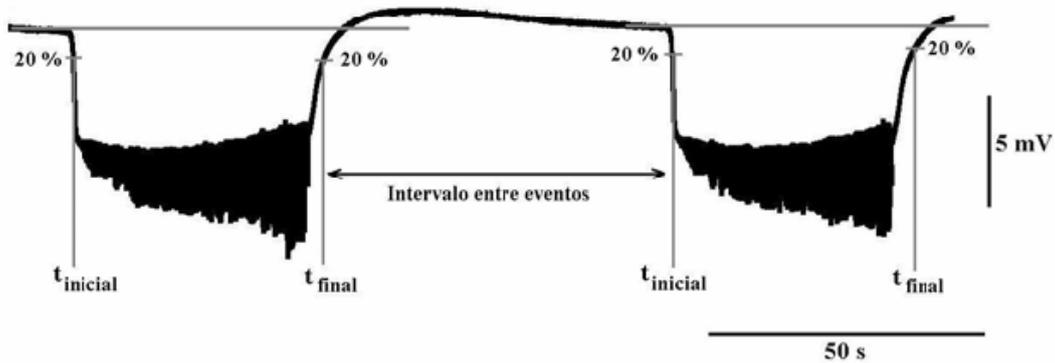


Figura III.13 - Representação do procedimento adotado para obtenção do IE. Considerando $t_{inicial}$, quando o sinal atinge uma variação de 20% em relação à linha de base, e t_{final} , quando este sinal retorna a 20% em relação à linha de base, o parâmetro IE foi calculado como o intervalo de tempo entre o instante t_{final} de um evento e o instante $t_{inicial}$ do evento subsequente.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

IV. 1 Indução de epilepsia do lobo temporal pela pilocarpina

Os resultados experimentais apresentados neste trabalho se referem a três faixas etárias: P-10 (ratos com 10 dias de vida); P-21 (ratos com 21 dias de vida) e P-60 (ratos com 60 dias de vida). Para cada faixa etária os animais foram divididos em grupo controle e grupo tratado.

Na Tabela IV.1 são apresentados os resultados da indução ELP, pela injeção de PILO, em animais pertencentes ao grupo tratado, que, como se observa, reproduziu dados semelhantes aos relatados na literatura, indicando que nossos resultados estão dentro dos padrões.

Tabela IV.1 - Resultados da indução ELP pela injeção de PILO.

Faixa Etária (dias)	Nº total de Animais	Animais em SE	Mortalidade		SE sobreviventes
			SE	Pós-SE	
10	10	10 (100%)	1 (10%)	0 (0%)	9 (90%)
21	27	27 (100%)	15 (55,5%)	3 (11,1%)	9 (33,3%)
60	45	20 (44,4%)	11 (55%)	3 (15%)	6 (30%)
Total	82	57 (69,5%)	27 (47,5%)	6 (10,5%)	24 (42%)

O processo de indução ELP pela injeção de pilocarpina proporcionou um alto índice de SE (69,5%) e uma taxa elevada de mortalidade (58%), como pode ser observado pelo levantamento total apresentado na Tabela IV.1.

Após o término do SE os animais experimentais apresentaram-se debilitados, necessitando de cuidados especiais (hidratação e alimentação) até completa recuperação do quadro, restabelecido cerca de cinco dias após o insulto.

IV. 2 Atividade epileptiforme não-sináptica

As atividades epileptiformes induzidas foram registradas de 18 experimentos referentes ao grupo tratado (P-10; P-21 e P-60), sendo 6 experimentos para cada grupo etário, e, 18 experimentos para o grupo controle (P-10; P-21 e P-60), também com 6 experimentos para cada grupo etário.

Para cada experimento, foi realizado o registro do potencial elétrico extracelular por meio de um eletrodo posicionado na camada granular do giro dentado. Esse registro foi realizado sete dias após o tratamento com pilocarpina (Grupo Tratado), ou sete dias após a injeção de solução salina (Grupo Controle). Para induzir as AE's não-sinápticas, foi utilizado o protocolo experimental de perfusão das fatias hipocâmpais, no qual a solução continha alto- K^+ (8 mM) e zero- Ca^{2+} adicionado.

Utilizando-se o método *t-student*, com nível de significância igual a 5% ($\alpha = 0,05$), foram comparados os valores médios dos parâmetros do PE, obtidos de experimentos realizados com animais do grupo controle (P-10; P-21 e P-60) e experimentos realizados com animais do grupo tratado (P-10; P-21 e P-60).

Na figura IV.1 são apresentados os valores médios do parâmetro LT (minutos), com seus respectivos desvios padrão, para cada faixa etária. Foi considerado sempre o grupo controle primeiro (barras em preto) e depois o grupo tratado (barras em cinza). Os valores encontrados foram: $49,51 \pm 5,61$ e $46,66 \pm 5,42$; $60,83 \pm 14,62$ e $55 \pm 7,95$; $78 \pm 4,89$ e $51,66 \pm 5,57$, respectivamente para os grupos P-10, P-21 e P-60.

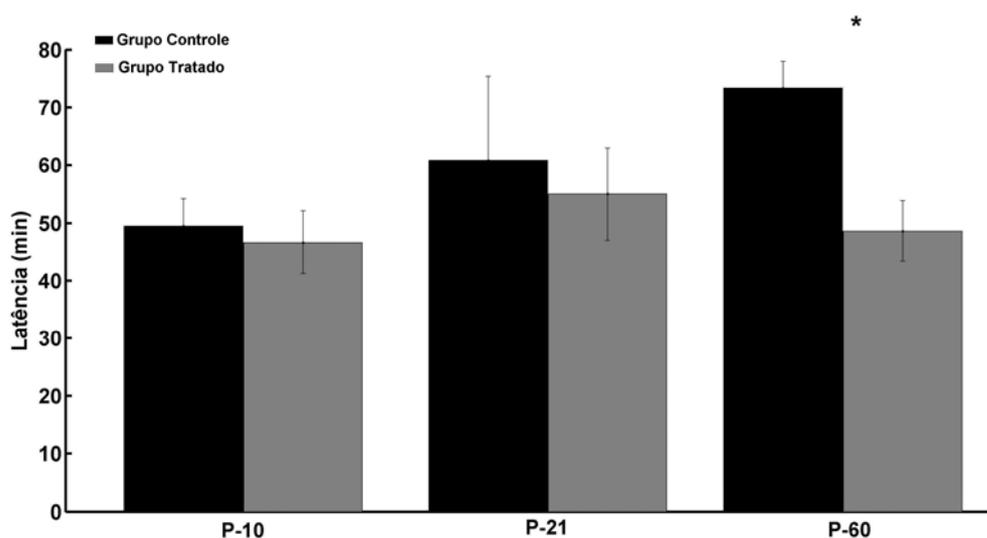


Figura IV.1 – Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro LT, referente as faixas etárias P-10; P-21 e P-60, respectivamente. Barras em preto, grupo controle e barras em cinza, grupo tratado.

Foi encontrada diferença significativa entre as médias comparadas somente para a faixa etária P-60. Pelo gráfico de barras foi possível observar uma redução do parâmetro LT do grupo tratado quando comparado ao grupo controle ($p= 0,007$).

IV. 2.1 Hipóxia

Com o objetivo de verificar possíveis alterações na atividade da bomba de Na/K dos animais do grupo tratado (animais que receberam pilocarpina), manobras de hipóxia no período ictal (parâmetro DE) e no período interictal (parâmetro IE) foram realizadas durante os experimentos. A manobra de hipóxia consiste da supressão ou redução da oxigenação do tecido. O efeito direto da hipóxia é, portanto, a redução da produção de ATP, provocando, assim, a diminuição na atividade (ou eficiência) da bomba de Na/K. Se a oxigenação for restabelecida sem danos irreversíveis à atividade neuronal, a repolarização volta ao seu nível normal e as funções celulares são novamente recuperadas (SOMJEN, 2001).

IV.2.1.1 - Efeito da hipóxia sobre o período ictal

As manobras de hipóxia, realizadas durante o evento, consistiram do bloqueio da perfusão do tecido com carbogênio exatamente no momento em que a linha de base do sinal extracelular iniciava sua excursão descendente. Esse bloqueio foi mantido até que o sinal iniciasse sua excursão ascendente.

Na figura IV.2, estão representados exemplos de manobras de hipóxia realizadas durante o evento. As manobras de hipóxia durante o evento analisadas neste trabalho ficaram restritas ao exemplo A, onde é possível observar um retorno ingreme da linha de base após a hipóxia. Foi possível observar, também, que no decorrer do tempo de experimentação, aproximadamente 3 horas após o início das AEs não-sinápticas, quando uma manobra de hipóxia durante um evento era realizada (exemplo B), não ocorria o mesmo retorno ingreme da linha de base como o que foi observado em A, sugerindo não estar acontecendo uma preservação do estado metabólico do tecido. Por isso, essas manobras foram excluídas das análises.

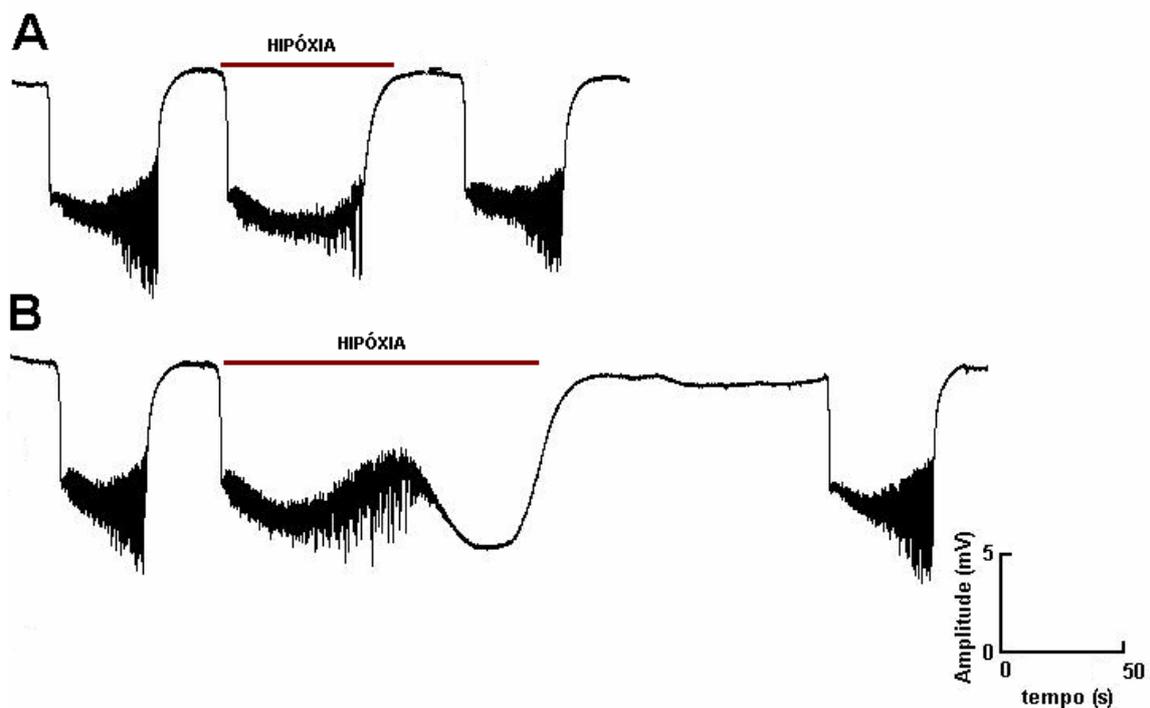


Figura IV.2 – Exemplos de registro do potencial extracelular (A e B). Primeiro sob condições normais, sob bloqueio do fornecimento de carbogênio durante o evento (hipóxia) e novamente sob condições normais logo após o bloqueio de carbogênio.

Com isso, o que se pretendia era medir o efeito da redução da atividade da bomba de Na/K, submetendo o tecido a um mínimo de interferência sobre sua homeostase. A não interferência sobre o equilíbrio homeostático do tecido foi garantida pela confirmação da recuperação das dinâmicas morfológicas e temporais, tais quais as dos eventos imediatamente anteriores à manobra de hipóxia.

Os valores médios e os desvios padrão encontrados para o parâmetro DE (valores normalizados), referente ao grupo controle e grupo tratado foram iguais a $1,42 \pm 0,03$ e $1,36 \pm 0,01$; $1,51 \pm 0,1$ e $1,68 \pm 0,1$; $1,46 \pm 0,04$ e $1,32 \pm 0,04$, respectivamente para as faixas etárias P-10, P-21 e P-60 (figura IV.3).

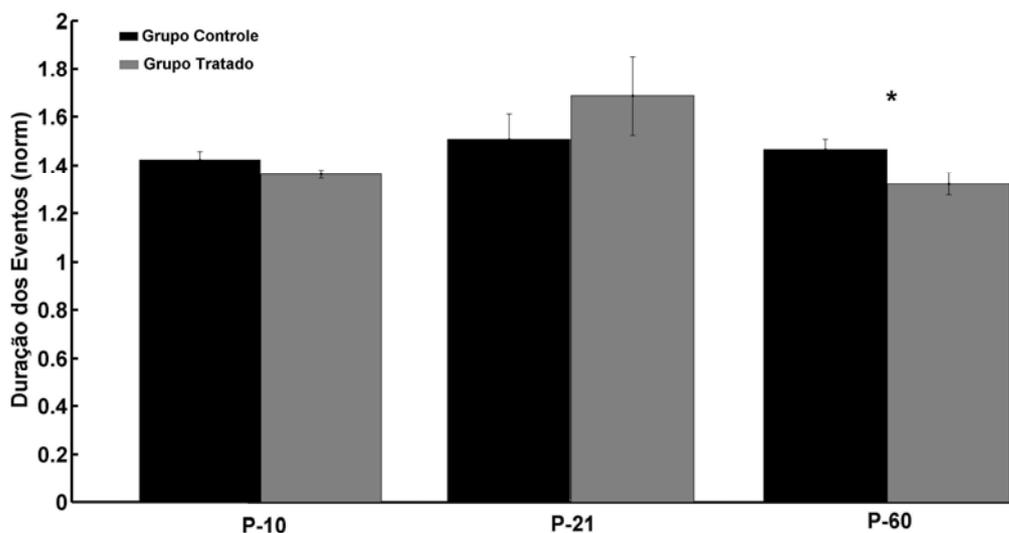


Figura IV.3 – Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro DE, referente as faixas etárias P-10; P-21 e P-60, respectivamente. Barras em preto, grupo controle e barras em cinza, grupo tratado.

Pelo gráfico apresentado na figura IV.3 é possível observar que durante a manobra de hipóxia, ocorreu um aumento no parâmetro DE, quando esse era comparado com o evento imediatamente anterior ao da hipóxia, e, que esse aumento ocorreu para as 3 faixas etárias estudadas, porém, para as faixas etárias P-10 e P-21 não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado.

Entre as médias comparadas foram encontradas diferenças significativas somente para a faixa etária P-60 ($p= 0,02$). Na figura IV.4 estão representados trechos típicos de manobras de hipóxia (no período ictal) realizadas em animais da faixa etária P-60, pelo traçado do potencial elétrico extracelular é possível observar que o aumento na DE, durante a hipóxia, foi maior em animais do grupo controle.

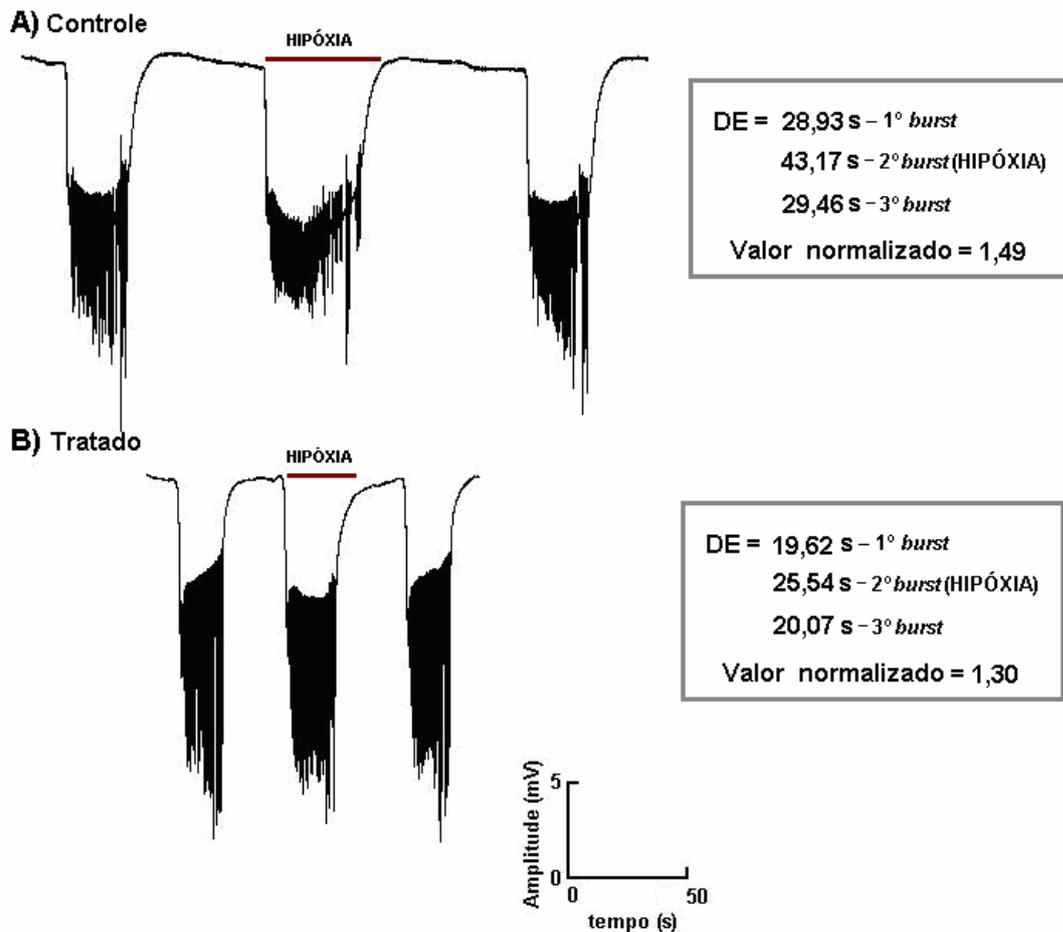


Figura IV.4 – Exemplos típicos do registro do potencial extracelular de animais do grupo etário P-60. Em A, grupo controle e em B, grupo tratado. Primeiro *burst* sob condições normais, segundo sob bloqueio do fornecimento de carbogênio durante o evento (hipóxia) e novamente sob condições normais logo após o bloqueio de carbogênio (terceiro *burst*).

IV.2.1.2 - Efeito da hipóxia sobre o período interictal

As manobras de hipóxia, realizadas no intervalo entre eventos, consistiram do bloqueio da perfusão do tecido com carbogênio no momento em que terminava um evento, sendo que esse bloqueio era mantido até que se iniciasse o próximo evento. Na figura IV.5 está representado um exemplo típico de manobra de hipóxia no intervalo entre os eventos. Para garantir a homogeneidade das manobras estudadas, foram consideradas somente as que apresentaram *bursts* subsequentes à manobra de hipóxia com morfologia tais quais as dos eventos imediatamente anteriores à manobra de hipóxia.

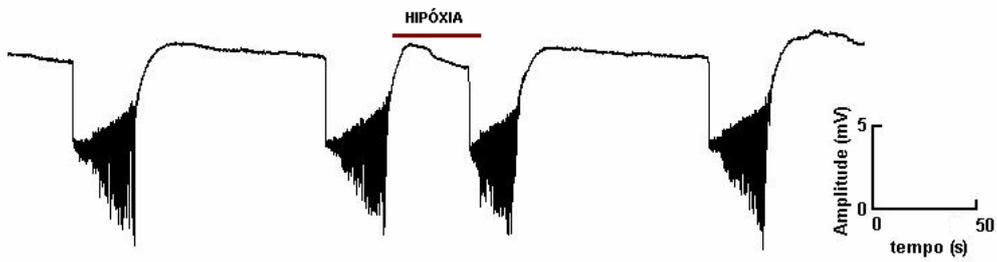


Figura IV.5 – Exemplo típico do registro do potencial elétrico extracelular, representando a hipóxia no intervalo entre eventos (período interictal).

No gráfico da figura IV.6 estão apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrão, encontrados para o parâmetro IE (valores normalizados) em cada faixa etária. Esses valores, referente ao grupo controle e grupo tratado, foram iguais a $0,84 \pm 0,01$ e $0,82 \pm 0,02$; $0,71 \pm 0,01$ e $0,70 \pm 0,02$; $0,50 \pm 0,03$ e $0,70 \pm 0,02$, respectivamente para os grupos P-10, P-21 e P-60.

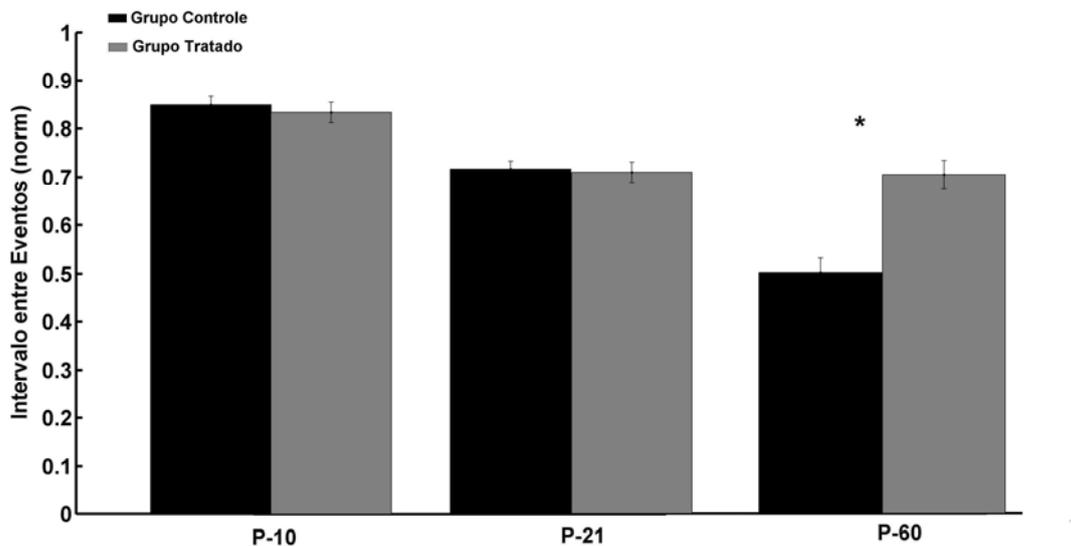


Figura IV.6 – Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro IE, referente as faixas etárias P-10; P-21 e P-60, respectivamente. Barras em preto, grupo controle e barras em cinza, grupo tratado.

Para as três faixas etárias estudadas, ocorreu uma redução do parâmetro IE durante a manobra de hipóxia. Os grupos P-10 e P21 não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado. A análise mostrou, também, que a diferença

entre os valores médios do parâmetro IE durante as manobras de hipóxia, são estatisticamente significantes para a faixa etária P-60, ou seja, a redução do intervalo entre os eventos para o grupo controle foi maior que a redução apresentada pelo grupo tratado ($p < 0,05$). Na figura IV.7 estão representados trechos típicos de manobras de hipóxia (no período interictal) realizadas em animais da faixa etária P-60, pelo traçado do potencial elétrico extracelular é possível observar essa diferença.

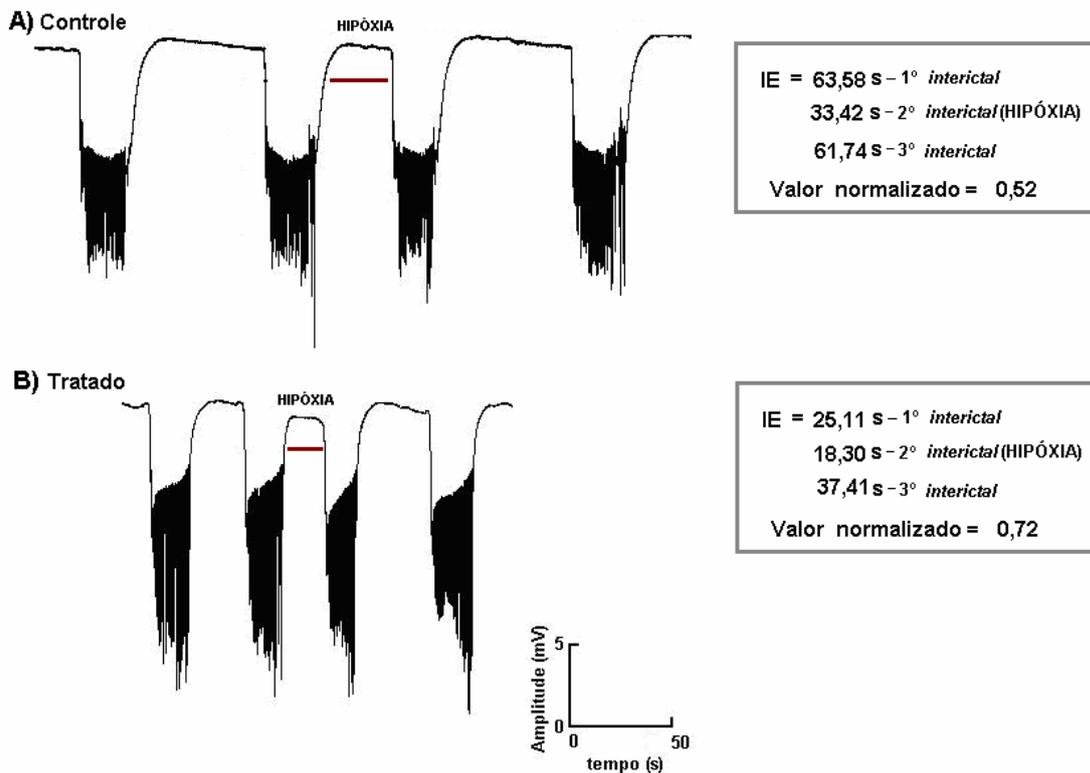


Figura IV.7 – Exemplos típicos do registro do potencial extracelular de animais do grupo etário P-60. Em A, grupo controle e em B, grupo tratado. Primeiro IE sob condições normais, segundo sob bloqueio do fornecimento de carbogênio durante o evento (hipóxia) e novamente sob condições normais logo após o bloqueio de carbogênio (terceiro IE).

IV. 2.2 Parâmetros do potencial elétrico das atividades epileptiformes não-sinápticas

Para identificar as possíveis alterações na morfologia do potencial elétrico extracelular entre grupo controle e grupo tratado, os valores médios da amplitude da componente DC (DC), amplitude média dos PS's (PS), amplitude máxima dos PS's (A_{max}), duração dos eventos (DE) e intervalo entre eventos (IE), foram medidos.

Para obter esses valores, foram analisados 6 *bursts* de cada experimento, correspondentes a um período de aproximadamente 10 minutos após o início das AEs não-sinápticas e antes do início das manobras de hipóxia. Esse critério foi adotado devido ao fato de ocorrer mudanças nos eventos epileptiformes ao longo do experimento e após as manobras de hipóxia.

As amplitudes médias e desvios padrão da componente DC (mV), figura IV.8, encontradas para o grupo controle e grupo tratado de cada faixa etária, foram $2,70 \pm 0,1$ e $4,11 \pm 0,35$; $6,11 \pm 0,4$ e $5,35 \pm 0,2$; $6,63 \pm 0,6$ e $7,06 \pm 0,7$, respectivamente para os grupos P-10, P-21 e P-60. Para as faixas etárias P-21 e P-60 não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado. Já para a faixa etária P-10, um aumento significativo da componente DC ($p= 0.0006$) foi observado para animais pertencentes ao grupo tratado.

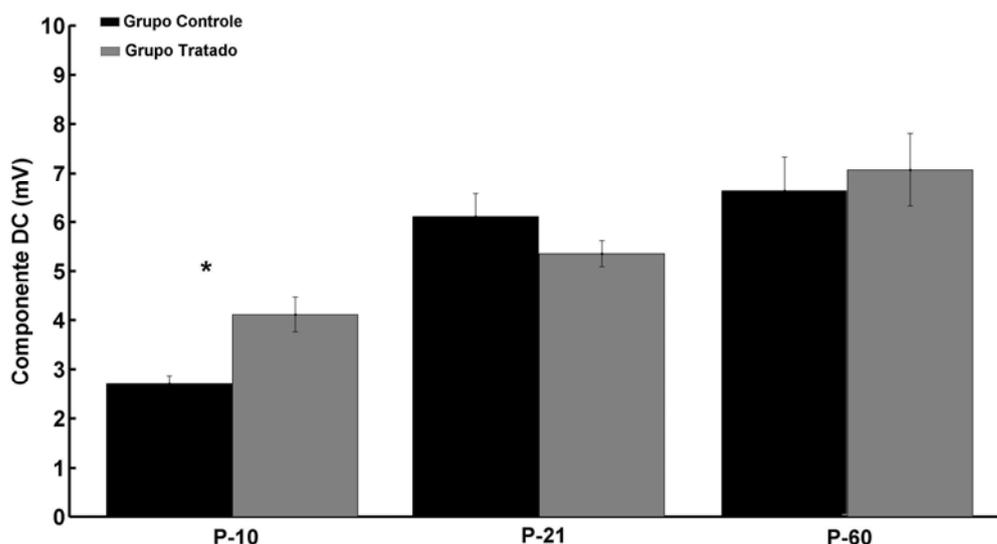


Figura IV.8 – Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para componente DC (mV), referente as faixas etárias P-10; P-21 e P-60, respectivamente. Barras em preto, grupo controle e barras em cinza, grupo tratado.

Os valores médios e desvios padrão encontrados para o parâmetro PS's (mV), grupo controle e grupo tratado, foram iguais a $0,02 \pm 0,001$ e $0,04 \pm 0,002$; $0,38 \pm 0,04$ e $0,37 \pm 0,05$; $0,40 \pm 0,05$ e $0,54 \pm 0,06$, respectivamente para os grupos P-10, P-21 e P-60 (figura IV.9).

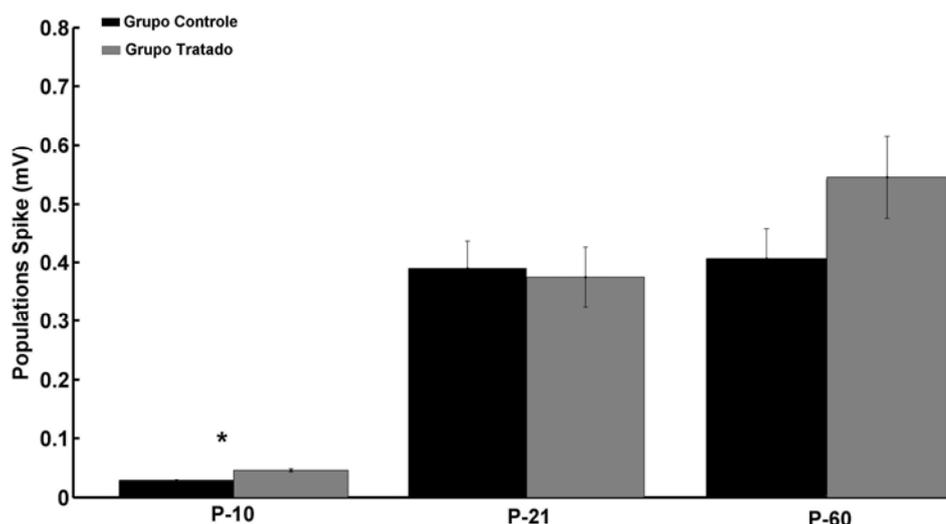


Figura IV.9 – Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados amplitude média dos PS's (mV), referente as faixas etárias P-10; P-21 e P-60, respectivamente. Barras em preto, grupo controle e barras em cinza, grupo tratado.

Foi encontrada diferença significativa entre as médias comparadas somente para a faixa etária P-10. Pelo gráfico de barras, foi possível observar um aumento dos PS's em animais pertencentes ao grupo tratado, quando estes eram comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). As faixas etárias P-21 e P-60 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

No gráfico da figura IV.10 estão apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrão, encontrados para a A_{max} dos PS's (mV) em cada faixa etária. Esses valores, referente ao grupo controle e grupo tratado, foram iguais a $0,45 \pm 0,08$ e $1,31 \pm 0,1$; $7,62 \pm 0,5$ e $11,10 \pm 0,4$; $4,80 \pm 0,6$ e $9,73 \pm 1,23$, respectivamente para os grupos P-10, P-21 e P-60.

As três faixas etárias estudadas apresentaram diferenças significativas entre grupo controle e grupo tratado, sendo possível observar um aumento da A_{max} dos PS's para o grupo tratado quando este era comparado com o grupo controle, apresentando um $p = 6,68 \times 10^{-6}$ (faixa etária P-10), $p = 2,72 \times 10^{-5}$ (faixa etária P-21) e $p = 0,0009$ (faixa etária P-60).

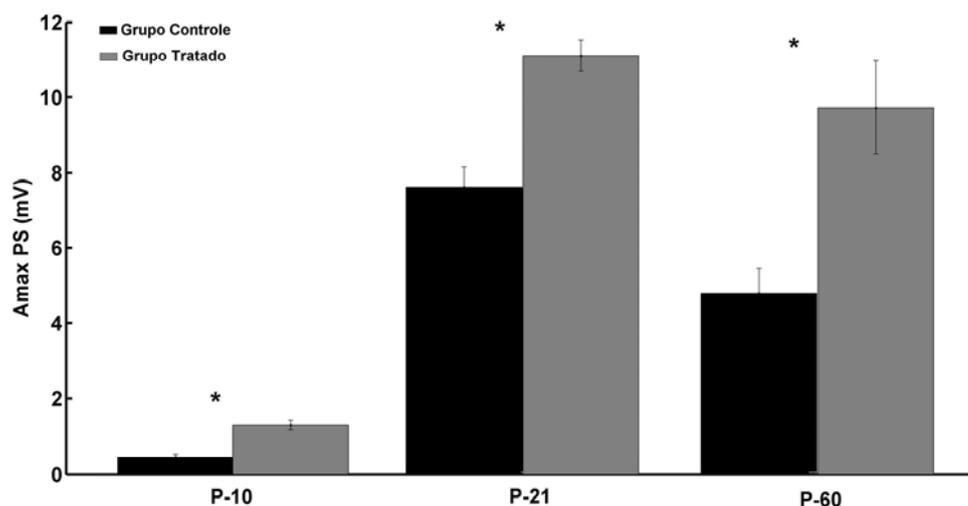


Figura IV.10 – Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados amplitude máxima dos PS's (mV), referente as faixas etárias P-10; P-21 e P-60, respectivamente. Barras em preto, grupo controle e barras em cinza, grupo tratado.

No gráfico da figura IV.11 estão apresentados os valores médios e os desvios padrão encontrados para a duração dos eventos (segundos), em cada faixa etária. Esses valores, referente ao grupo controle e grupo tratado, foram iguais a $29,95 \pm 1,16$ e $29,66 \pm 0,92$; $43,74 \pm 1,69$ e $39,59 \pm 1,57$; $27,47 \pm 1,95$ e $20,67 \pm 1,77$, respectivamente para os grupos P-10, P-21 e P-60.

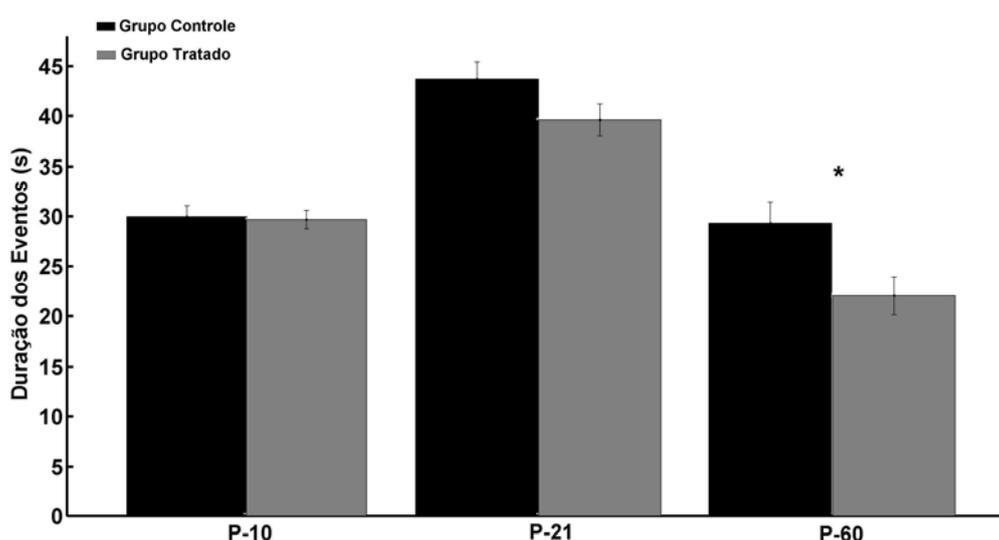


Figura IV.11– Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados duração do evento (segundos), referente as faixas etárias P-10; P-21 e P-60, respectivamente. Barras em preto, grupo controle e barras em cinza, grupo tratado.

Somente para a faixa etária P-60 foram encontradas diferenças significativas entre as medias comparadas. Pelo gráfico de barras foi possível observar uma redução da duração dos eventos de animais do grupo tratado, quando comparados ao grupo controle ($p=0,01$). Já para as faixas etárias P-10 e P-21 não foram encontradas diferenças significativas.

As amplitudes médias e desvios padrão do intervalo entre eventos (segundos), figura IV.12, encontradas para cada faixa etária, grupo controle e grupo tratado, foram $36,69 \pm 2,12$ e $38,12 \pm 3,40$; $57,09 \pm 2,72$ e $59,26 \pm 4,36$; $109,08 \pm 9,32$ e $46,41 \pm 2,35$, respectivamente para os grupos P-10, P-21 e P-60.

Para as faixas etárias P-21 e P-60 não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado. Foi encontrada diferença significativa para a faixa etária P-60 ($p<0,05$), indicando uma redução do intervalo entre eventos (IE) para animais do grupo tratado.

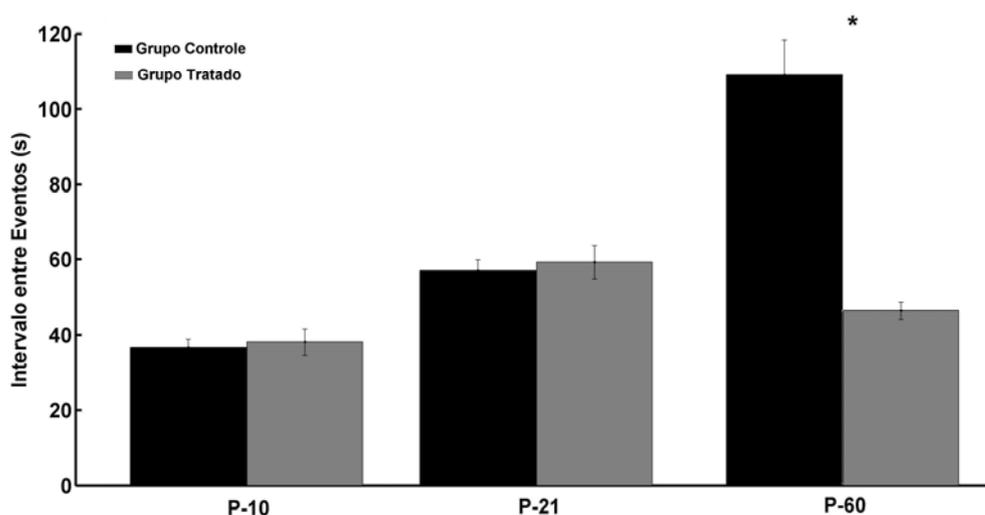


Figura IV.12 – Gráfico representativo dos valores médios e desvios padrão encontrados para o intervalo entre eventos (segundos), referente as faixas etárias P-10; P-21 e P-60, respectivamente. Barras em preto, grupo controle e barras em cinza, grupo tratado.

Diante dos dados apresentados, foi possível observar alterações morfológicas no traçado do PE, entre grupo tratado e grupo controle, para as diferentes faixas etárias estudadas.

Para a faixa etária P-10, foi possível perceber que o PE de animais do grupo tratado, quando comparado ao PE de animais do grupo controle, apresentou um aumento significativo dos parâmetros DC, PS's e A_{max} dos PS.

Na figura IV.13 são apresentados trechos típicos de experimentos da faixa etária P10, assim denominados por apresentarem parâmetros cujos valores se aproximam mais dos valores médios de cada grupo.

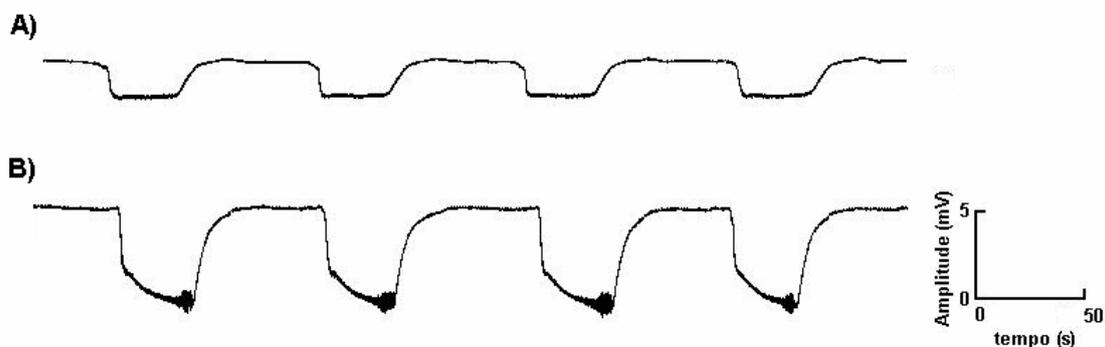


Figura IV.13 - Trechos típicos do PE extracelular referente a faixa etária P-10. Em A, grupo controle e, em B, grupo tratado.

Já para a faixa etária P-21, foi possível perceber que o PE de animais do grupo tratado, quando comparado ao PE de animais do grupo controle, apresentou um aumento estatisticamente significativo somente para parâmetro A_{max} dos PS.

Trechos típicos de experimentos da faixa etária P21 são apresentados na figura IV.14, assim foram denominados por apresentarem parâmetros cujos valores se aproximam mais dos valores médios de cada grupo.

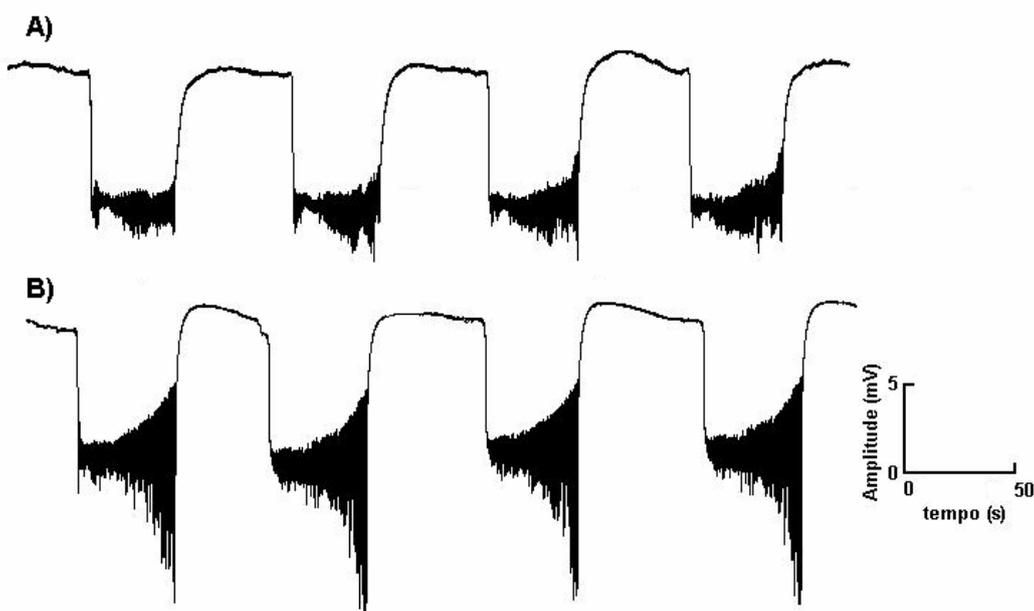


Figura IV.14 - Trechos típicos do PE extracelular referente a faixa etária P-21. Em A, grupo controle e, em B, grupo tratado.

Para a faixa etária P-60, foi possível perceber que o PE de animais do grupo tratado, quando comparado ao PE de animais do grupo controle, apresentou um aumento significativo para o parâmetro A_{max} dos PS e uma redução estatisticamente significativa para os parâmetros DE e IE.

Na figura IV.15, são apresentados trechos típicos de experimentos da faixa etária P60, assim denominados por apresentarem parâmetros cujos valores se aproximam mais dos valores médios de cada grupo.

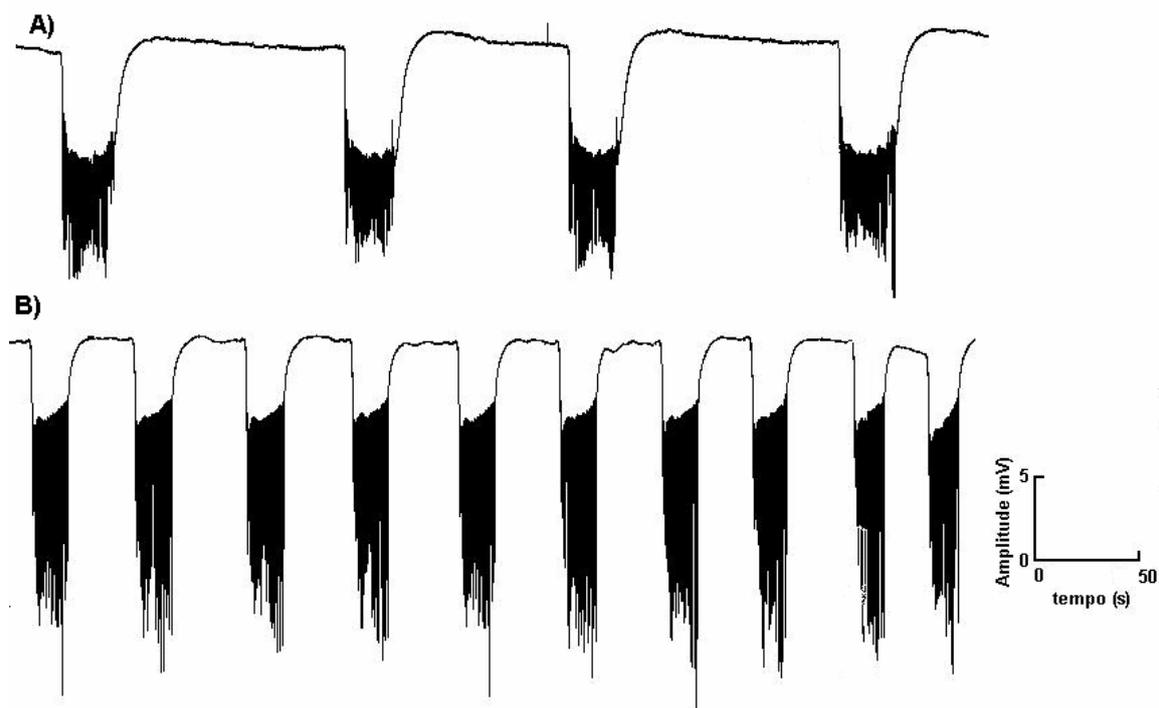


Figura IV.15 - Trechos típicos do PE extracelular referente a faixa etária P-60. Em A, grupo controle e, em B, grupo tratado.

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

O objetivo principal do presente trabalho foi identificar o efeito do *status epilepticus*, induzido por pilocarpina, sobre a manobra de hipóxia durante as atividades epileptiformes sustentadas por conexões do tipo não-sináptico em ratos com diferentes idades. Foram realizados experimentos de indução de atividades epileptiformes não-sinápticas, no GD de fatias de hipocampo de rato, por meio da perfusão com solução contendo zero cálcio adicionado e alto potássio, para as três faixas etárias estudadas (P-10; P21 e P-60).

A pilocarpina altera o efeito da hipóxia de duas maneiras: (i) reduz o aumento da duração do evento e (ii) diminui a redução do intervalo entre eventos, ambos provocados pelo bloqueio da oxigenação sobre o tecido. A pilocarpina também causa alterações de parâmetros do potencial elétrico extracelular que caracterizam as atividades epileptiformes não-sinápticas.

V. 1 Atividade epileptiforme não-sináptica

No que se refere ao parâmetro latência (LT), referentes aos grupos controle (P-10; P-21 e P-60), foi observado que a latência para início das AEs é aumentada em função da idade. Esses resultados corroboram os achados de RESENDE (2006) que demonstrou que animais mais jovens apresentam uma maior suscetibilidade às descargas epileptiformes, indicada pelos valores mais reduzidos do parâmetro latência. Segundo ALMEIDA *et al.* (2008), o tempo para início das AEs não-sinápticas é modulado pelo acúmulo de Cl⁻ intracelular, o qual é sustentado pelo equilíbrio dinâmico estabelecido pelos cotransportadores KCC (responsável pelo efluxo do Cl⁻) e NKCC (responsável pelo influxo do Cl⁻), que fazem com que o potencial de *Nernst* do Cl⁻ supere o potencial de membrana. Esse aumento na concentração intracelular de Cl⁻ resulta em uma redução do potencial de *Nernst* desse íon, o nível de excitabilidade neuronal aumenta e, por conseguinte, reduz a latência. Segundo LOMBROSO (2007), a alta concentração de cloreto intracelular, em neurônios corticais neonatais, se deve à reduzida expressão do co-transportador KCC e à grande prevalência do co-transportador NKCC. Isso confirma nossos dados de uma menor latência encontrada para animais mais jovens.

Na literatura, observa-se que o aumento da idade está associado com uma redução da fração volume extracelular ($\alpha = Vol_{extra}/Vol_{tecido}$), em tecidos corticais de ratos (LEHMENKÜHLER *et al.* 1993). Uma inspeção desse mecanismo, previsto pelo modelo de ALMEIDA *et al.* (2008), indica que aumento da extrusão de Cl^- , com a redução do volume extra, se deve também ao aumento da eficiência da bomba de Na^+/K^+ , em função da redução desse volume. Assim, se de forma mais eficiente a bomba consegue controlar os níveis de potássio extracelular, então, mais eficientemente serão restabelecidos os gradientes de concentração intracelular desse íon, favorecendo o aumento da concentração de KCl e, portanto, da saída desse composto para o meio extracelular, em função de seu gradiente de concentração.

Nossos dados também mostraram que nas faixas etárias P-10 e P-21 a administração sistêmica de pilocarpina não causou alterações no parâmetro latência, já para faixa etária P-60, à PILO associou-se uma redução significativa desse parâmetro. Essa redução parece estar relacionada com uma redução na atividade da Na^+/K^+ - ATPase, durante a fase latente do modelo da pilocarpina, encontrada por FERNANDES *et al.* (1996). LI *et al.* (2008) observaram uma redução na expressão de KCC e um aumento de NKCC em animais submetidos ao SE por pilocarpina. Essas alterações na expressão desses cotransportadores também influenciam diretamente na redução do parâmetro latência, observado em nosso trabalho. Acreditamos, que para as faixas etárias P-10 e P-21, a não alteração no parâmetro latência, entre grupo controle e grupo tratado, pode estar relacionada à maior resistência do cérebro imaturo a lesões celulares secundárias às crises (HOLMES, 1997; PRIEL *et al.*, 1996), uma vez que alterações na expressão dos cotransportadores de Cl^- podem estar associadas à indução de lesão no tecido (COULL *et al.*, 2003; JIN *et al.*, 2005).

V.1.1 Hipóxia

Recentemente, ALMEIDA *et al.* (2008), por meio de simulações computacionais, demonstraram que a duração do evento epileptiforme não-sináptico é modulada pela relação entre as correntes de influxo e efluxo de Na^+ , respectivamente, pelos canais iônicos e pela bomba de Na/K. De acordo com esse modelo teórico, a duração do evento consiste do intervalo de tempo estabelecido entre o 1º ponto crítico, definido pelo momento em que o influxo de Na^+ pelos canais supera seu efluxo pela

bomba de Na/K, e o 2º ponto crítico, definido pelo momento no qual o efluxo de Na⁺ pela bomba supera seu influxo pelos canais. O intervalo entre os eventos é definido pelo intervalo de tempo entre o 2º ponto crítico de um evento e o 1º ponto crítico do evento subsequente.

Durante as manobras de hipóxia, pode se observar aumento e redução estatisticamente significativos, respectivamente, para os parâmetros duração do evento (período ictal) e intervalo entre eventos (período interictal) para o grupo controle e grupo tratado das três faixas etárias estudadas. VIVAS (2005), por meio de simulações computacionais, observou que, durante manobras de hipóxia, devido à redução de adenosina trifosfato (ATP), a bomba de Na/K tem sua atividade reduzida, causando aumento na duração do evento e redução no intervalo entre eventos. Consubstanciando essa evidência, XIONG e STRINGER (2000) demonstraram que a aplicação local de *oubaiína* (5 mM), na camada molecular do giro dentado de fatias do hipocampo, durante a ocorrência de eventos epileptiformes, causa um decréscimo no intervalo entre eventos e um aumento da duração do evento.

Seria pertinente questionar o efeito da hipóxia sobre outros canais dependentes de ATP. No entanto, investigações acerca de outros canais sensíveis à adenosina trifosfato, como é o caso de alguns canais de K⁺ (K_{ATP}), revelam um papel neuroprotetor mediante a hiperpolarização celular, decorrente de sua abertura, quando a concentração intracelular de ATP é reduzida, por exemplo, durante a hipóxia (MATSUMOTO *et al.*, 2002). Portanto, a hipóxia, atuando sobre esses canais de K⁺, levaria a uma redução da duração do evento (período ictal) e um aumento no intervalo entre eventos (período interictal).

Em relação à faixa etária P-10 e P-21, quando a comparação é feita entre grupo controle e grupo tratado, não foram observadas alterações significativas referentes às manobras de hipóxia. KINJO *et al.* (2007) demonstraram que um único episódio de SE, induzido pela pilocarpina, em ratos jovens, não é suficiente para causar alterações na atividade da Na⁺/K⁺ - ATPase e que episódios consecutivos de SE podem induzir a um aumento significativo na atividade dessa enzima, 7 dias após o SE.

Já para a faixa etária P-60, alterações significativas foram observadas durante as manobras de hipóxia. Em relação ao efeito da hipóxia sobre o período ictal, foi possível observar que o aumento na DE, durante a hipóxia, foi maior em animais do grupo controle. Já para o efeito da hipóxia sobre o período interictal, observou-se que a redução no IE, durante a hipóxia, foi maior no grupo controle. FERNANDES *et al.*

(1996) relataram uma redução da atividade da Na^+/K^+ - ATPase, no hipocampo de ratos adultos, durante a fase latente do modelo da pilocarpina. Esses dados, somados aos dados obtidos nesse trabalho, sugerem um possível aumento na expressão dessa enzima de ratos adultos tratados com pilocarpina. KANG *et al.* (2003) observaram um aumento na expressão da Na^+/K^+ - ATPase no hipocampo de *gerbils*, 12 horas após a ocorrência de uma crise. Esse aumento na expressão da Na^+/K^+ - ATPase pode justificar as alterações observadas na hipóxia, durante o período ictal e o período interictal.

Por outro lado, há que se considerar, ainda, a possibilidade de aumento da afinidade da Na^+/K^+ - ATPase ao ATP para o grupo P-60 tratado. Se o *status epilepticus* implica em um aumento da afinidade ao ATP (redução da $K_{d_{ATP}}$), implicará em uma menor alteração da corrente para uma mesma variação de ATP, causada pela hipóxia. Uma vez que a dependência da corrente da bomba em função da concentração de ATP é dada pela relação de Michaelis-Mentel:

$$I_{bomba} \propto \frac{[ATP]}{[ATP] + K_{d_{ATP}}},$$

onde $K_{d_{ATP}}$ é uma constante de dissociação. Nessa relação, podemos observar que uma redução da $K_{d_{ATP}}$ pode diminuir a alteração da corrente da bomba em função de uma mesma redução da concentração de ATP (RODRIGUES *et al.*, 2009).

V.1.2 Parâmetros do potencial elétrico das atividades epileptiformes não-sinápticas

A interpretação das modificações dos grafo-elementos em termos das possíveis alterações causadas pela pilocarpina para as três faixas etárias estudadas foi realizada a partir de informações da literatura.

As alterações das atividades epileptiformes não-sinápticas em função da faixa etária, observadas no grupo controle, confirmam o comportamento observado por RESENDE (2006) e DAMAZIO (2007), que relataram as influências das alterações morfológicas, ocorridas durante a fase de desenvolvimento do animal sobre eventos epileptiformes registrados no espaço extracelular.

Proposições teóricas sobre a gênese do DC apontam para uma origem eletroquímica desse potencial (ALMEIDA *et al.*, 2004). Simulações computacionais mostram que a provável origem do DC são variações locais nas concentrações iônicas extracelulares. Essas alterações seriam responsáveis pela formação de potenciais de *Nernst* ao longo do espaço extracelular e a flutuações iônicas (JEFFERYS, 1995), um importante mecanismo de acoplamento lento das atividades neuronais. Alterações na componente DC foram observadas somente para a faixa etária P-10. Nesta faixa, observou-se um aumento do DC para ratos tratados. Sugere-se que este aumento esteja relacionado alterações na excitabilidade do tecido, o que por sua vez pode resultar num aumento do recrutamento neuronal e, conseqüentemente, em maiores flutuações iônicas extracelulares. Para as faixas etárias P-21 e P-60, não foram observadas alterações da componente DC, entre os grupos controle e grupo tratado. Nestas faixas etárias, a pilocarpina deve causar também um aumento da excitabilidade do tecido, o que leva a um aumento do recrutamento neuronal e, conseqüentemente, aumento do DC. Porém, outro efeito da PILO é a dispersão das células granulares que é caracterizada pela perda da justaposição habitual das células granulares na camada granular do giro dentado, produzindo um aumento da sua espessura e dos espaços intercelulares (KURUBA *et al.*, 2009; EL BAHH *et al.*, 1999; HOUSER, 1990). Isso leva a uma redução da componente DC. Os efeitos do aumento do recrutamento neuronal e da dispersão celular devem-se anular, fazendo com que a PILO não tenha efeito sobre a componente DC nas faixas etárias P-21 e P-60.

Os PS's, associados a mecanismos acopladores rápidos, tais como efeito de campo e conexões eletrotônicas (TAYLOR e DUDEK, 1982), são variações rápidas do potencial extracelular, com a morfologia espiculada de um potencial de ação invertido, oriundos da somação de campos elétricos gerados por disparos síncronos de potenciais de ação por células neuronais do entorno do sítio de medição. Confirmando nossas suposições sobre um aumento no recrutamento neuronal devido ao aumento na excitabilidade, observa-se um aumento da amplitude máxima dos *populations spikes* (A_{\max} PS) dos três grupos tratados (P10; P-21 e P-60).

Para os parâmetros DE e IE, referentes às faixas etárias P-10 e P-21, não foram observadas alterações significativas entre grupo controle e tratado, isso pode estar relacionado ao fato de que, em animais mais jovens, um único episódio de SE não é suficiente para causar alterações na atividade da Na^+/K^+ - ATPase (KINJO *et al.*, 2007). No caso da faixa etária P-60, os parâmetros DE e IE apresentaram diferenças

significativas entre grupo controle e tratado. No que se refere à redução da duração do evento de animais do grupo tratado, pode-se dizer que um aumento na expressão da Na^+/K^+ - ATPase levaria a essa redução, pois, um maior número de bombas poderiam produzir um fluxo maior de Na^+ , adiantando o 2º ponto crítico, que caracteriza o fim do evento. Adicionalmente, reduções na expressão do KCC, como observadas por *LI et al.* (2008), podem causar uma redução da duração do evento, como indicam as simulações computacionais de *ALMEIDA et al.* (2008). Essas simulações computacionais também indicam que uma redução na expressão de KCC e uma maior expressão do NKCC levam a um menor intervalo entre eventos, como observado em P-60.

CAPÍTULO VI - CONCLUSÃO

A indução de epilepsia do lobo temporal por meio da pilocarpina promove alterações sobre o efeito da hipóxia durante as atividades epileptiformes não-sinápticas e modifica também as características do potencial elétrico extracelular, sugerindo que essas modificações, dependendo da faixa etária, podem estar associadas a alterações estruturais (dispersão das células granulares e brotamentos de fibras musgosas), e, fisiológicas (redução da atividade e aumento na expressão da Na^+/K^+ - ATPase, e, alterações na expressão dos cotransportadores KCC e NKCC). Esses achados enfatizam que estudos envolvendo a pilocarpina devem levar em consideração os mecanismos não-sinápticos, os quais podem modular a atividade neuronal, mesmo na presença das sinapses.

Propostas para continuação do trabalho

- Investigação da expressão da enzima Na^+/K^+ ATPase no giro dentado do hipocampo de ratos sete dias após a indução do *SE*.
- Investigação do efeito do *SE* induzido pela pilocarpina, sobre a afinidade da Na^+/K^+ ATPase a adenosina trifosfato (ATP).
- Investigação da expressão dos cotransportadores de cloreto, KCC e NKCC, em diferentes faixas etárias, durante a fase latente do modelo da pilocarpina.

CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AICARDI, J., e CHEVRIE, J. J. (1983). Consequences of status epilepticus and children. *Adv. Neurol.* v. 34, p.115-125.
- AITKEN, P. G., TOMBAUGH, G. C., TURNER D. A., *et al.*, (1998). Similar Propagation of SD and Hypoxic SD-like Depolarization in Rat Hippocampus Recorded Optically and Electrically. *J. Neurophysiol.* v. 80, p. 1514-1521.
- ALMEIDA, A. C., RODRIGUES, A. M., SCORZA, F. A., CAVALHEIRO, E. A., TEIXEIRA, H. Z., DUARTE, M. A., SILVEIRA, G. A., ARRUDA, E. Z. (2008). Mechanistic hypotheses for nonsynaptic epileptiform activity induction and its transition from the interictal to ictal state: Computational simulation. *Epilepsia.* v. 49(7), p. 1-17.
- ALMEIDA, A. C. G., TEIXEIRA, H. Z., DUARTE, M. A., INFANTOSI, A. F. C. (2004). Modeling extracellular space electrodiffusion during Leão's spreading depression. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* v. 51, p. 450-458.
- AMARAL, D. G., DOLORFO, C., ALVAREZ-ROYO, P. (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus.* v.(4), p.415-435.
- AMARAL, D.G., WITTER, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* v.31(3), p. 571-591.

- ANDERSON, W. R., FRANCK, J. E., STHAL, W. L., e MAKI, A. A. (1994). Na⁺K⁺-ATPase is decreased in hippocampus of kainite-lesioned rats. *Epilepsy Res.* v.17p. 221-231.
- ANDRADE-VALENÇA, L. P. A., VALENÇA, M. M., VELASCO, T. R., LEITE, J. P. (2006). Epilepsia do lobo temporal mesial associada a esclerose hipocampal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* V.12(1), p. 31-6.
- ARISI, G. M., CAIRASCO, N. G. (2006). Hippocampal doublecortin-positive granular neurons have abnormal dendritic morphology in the temporal lobe epilepsy pilocarpine model. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* v. 12(3), p. 135-138.
- AVANZINI, G. (1995). Animal models relevant to human epilepsies. *Ital J Neurol Sci.* v. 16(1-2), p. 5- 8.
- BABB, T. L., KUPFER, W. R., PRETORIUS, J. K., CRANDALL, P. H., LEVESQUE, M. F. (1991). Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience.* v. 42, P. 351-363.
- BALDY-MOULINIER, M., ARIAS, L. P. e PASSOUANT. (1973). Hippocampal epilepsy produced by ouabain. *Eur. Neurology.* V. 9, p.333-348.
- BLANK, M. (1995), An Ion Pump Mechanism Based on Channel Processes in the Na,K-ATPase. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* v. 38, p. 275-279.
- BLOOM, F.E. e ENGEL, Jr. J. (1992). Aberrant genetic expression and opportunities for epilepsy research. In: J. Engel Jr.; Wasterlain, C.; Cavalheiro, E. A.; Heinemann, U. and Avanzini, G. (Eds.), *Molecular Neurobiology of Epilepsy*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. p. 1-18.
- CAVALHEIRO, E. A. (1995). The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* v.16, p. 33-37.

- CAVALHEIRO, E. A., LEITE J. P., BORTOLOTTO Z. A., TURSKI W. A., IKONOMIDOU C. e TURSKI L. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats : structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. v.32, p. 778-782.
- CARLEN, P. L., SKINNER, F., ZHANG, L., NAUS, C., *et al.* (2000). The Role of Gap Junctions in Seizures. *Brain Res. Rev.*, v. 32, pp. 235-241.
- CARVALHO, J. P. (2005). Caracterização Óptica e Eletrofisiológica entre os Estados de Epilepsia e Depressão Alastrante. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del-Rei, MG, Brasil.
- CARVALHO, R. S. (2003). Transições Espontâneas de Burstings Epileptiformes para Depressão Alastrante. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del Rei, MG, Brasil.
- CHEN, J. W., WASTERLAIN, C.G. (2006). Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurol*. v. 5, p. 246-256.
- COSTA, M. A. (2009). Natureza não-sináptica das atividades epileptiformes ictais. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del Rei, MG, Brasil.
- CURIA, G., LONGO, D., BIAGINI, G., JONES, R. S.G., AVOLI, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neuroscience*.v. 172, P.143–157.
- DA SILVA, A. V., SILVA, A. C., *et al.* (2006). Fatores Determinantes da Viabilidade Neuronal em Fatias Hipocampais de Pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Mesial. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. V. 12(3), p. 139-141.
- DONALDSON, J., ST-PIERRE, J., MINICH, J., e BARBEAU, A. (1997) .Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase. *Can. J. Biochem*. v.49, p. 1217-1224.

- DUDEK, F. E., KIM, Y. I., BOUSKILA, Y. (1993). Electrophysiology of the suprachiasmatic nucleus: synaptic transmission, membrane properties, and neuronal synchronization. *J Biol Rhythms*. 8 Suppl:S33-7.
- DUDEK, F. E., SNOW, R. W., TAYLOR, C. P. (1986). Role of Electrical Interactions in Synchronization of Epileptiform Bursts. *Advances in Neurology*. v. 44, p. 593-617.
- EL BAHH, B., LESPINET, V., LURTON, D., COUSSEMACQ, M., LE GAL LA SALLE, G., ROUGIER, A. (1999). Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. v. 40, p. 1393-1401.
- ENGEL, J. Jr., (1993). Surgical treatment of epilepsy. Raven Press, New York.
- ENGEL, J. Jr., (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. v. 42, p.796-803.
- ENGEL, J. Jr., WILSON, C., BRAGIN, A. (2003). Advances in understanding the process of epileptogenesis based on patient material: what can the patient tell us? *Epilepsia*. v.44(12), p. 60-71.
- ENGEL, J. JR., WILLIAMSON, P. D., WIESER, H. G. (1997). Mesial temporal lobe epilepsy. In Engel J, Jr., Pedley TA, (Eds) *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Lippincot-Raven, Philadelphia.
- ESCLAPEZ, M., HIRSCH, JC., BEN-ARI, Y., BERNARD, C. (1999). Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*. v.60, p.408:449.
- FALCONER, M. A. (1971). Genetic and related aetiological factors in temporal lobe epilepsy. A review. *Epilepsia*. v. 12, p. 13-31.

- FERNANDES, M. J. S., NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G., e CAVALHEIRO, E. A. (1996). Na^+/K^+ ATPase Activity in the rat hippocampus: A study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem. Int.* v.28(5/6), p. 497-500.
- FISHER, R.S., VAN EMDE, B.W., BLUME.W., *et al.* (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the ILAE and the Internatinal Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* v. 46, p. 470-472.
- FRENCH, J.A., WILLIAMSON, P. D., THADANI, V. M., DARCEY, T. M., MATTSON, R. H., SPENCER, S. S., SPENCER, D. D. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol.* v. 34, p. 774-780.
- GLYNN, I. M. (1993). Annual review prize lecture: All hands to the sodium pump. *Journal of Physiology.* v. 462, p. 1-30.
- GLITSCH, H. G. (2001). Electrophysiology of the Sodium-Potassium-ATPase in Cardiac Cells. *Physiological Reviews.* v. 81, p. 1791-1826.
- GOFFIN. K., NISSINEN. J., VAN LAERE, K., PITKANEN, A. (2007). Cyclicly of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Exp Neurol.*
- GRISAR, T. e DELGADO-ESCUETA, A. V. (1986). Astroglial contribution in humam temporal lobe epilepsy: K^+ activation of Na^+/K^+ ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes. *Brain Res.* v. 364, p.1-11.
- GRISAR, T., FRANCK, G., e DELGADO-ESCUETE, A. V. (1983). Glial contribution to seizure: K^+ activation of (Na^+/K^+) ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes of epileptogenic cortex. *Brain Res.* v. 261, p.75-84.

- GRISAR, T., GUILLAUME, D., E DELGADO-ESCUETA, A. V. (1992). Contribution of Na⁺/K⁺ ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res.* v.12, p. 141-149.
- GUTNICK, M. J., PRINCE, D. A. (1972). Thalamocortical Relay Neurons: Antidromic Invasion of Spikes from a Cortical Epileptogenic Focus. *Science*, v. 176, p. 424-426.
- HAGLUND, M. M., SCHWARTZKROIN, P. A. (1990). Role of Na-K pump potassium regulation and IPSPs in seizures and spreading depression in immature rabbit hippocampal slices. *J Neurophysiol.* V. 63, p. 225- 239.
- HANSEN, A. J. (1985). Effect of Anoxia on Ion Distribution in the Brain. *Physiol. Rev.* v. 65, p. 101-148.
- HANSEN, A. J., HOUNSGAARD, J., JAHNSEN, H., (1982). Anoxia Increases Potassium Conductance in Hippocampal Nerve Cells. *Acta Physiol. Scand.*, v. 115, p. 301-310.
- HATTON, G. I., DORAN A. D., SALM, A. K., et al. (1980). Brain Slice Preparation: Hypothalamus. *Brain Res. Bull.*, v. 5, p. 405-414.
- HAUSER, W..A. (1992). Seizure disorders: the changes with age. *Epilepsia* 33(4):S6-S14.
- HIRSCH, E., BARAM, T. Z., SNEAD, O. C. (1992) Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res.* v. 583, p. 120-126.
- HOLMES, G. L. (1997). Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia.* v.38, p.12-30.
- HOUSER, C. R. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* v. 535, p. 195-204.

- JEFFERYS, J. G. (1995). Nonsynaptic Modulation of Neuronal Activity in the Brain: Electric Currents and Extracellular Ions. *Physiol. Rev.*, v. 75, p. 689-723.
- JEFFERYS, J. G., HAAS, H. L. (1982). Synchronized Bursting of CA1 Hippocampal Pyramidal Cells in the Absence of Synaptic Transmission. *Nature*, v. 300, p. 448-450.
- JENSEN, M. S. e YAARI, Y. (1997). Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *Journal Neurophysiology*. v. 77, p. 1124-1133.
- JIN, X., HUGUENARD, J. R. e PRINCE, D. A. (2005). Impaired Cl^- extrusion in layer V pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex. *J. Neurophysiology*, v. 93, p. 2117-2126.
- KANG, T. C., PARK, S. K., HWANG, I. K., AN, S. J., WON, M. H. (2003). Altered Na^+/K^+ ATPase immunoreactivity within GABAergic neurons in the gerbil hippocampal complex induced by spontaneous seizure and vigabatrin treatment. *Neurochem Int.* v.45(1), p.179-187
- KINJO, E. R., ARIDA, R. M., OLIVEIRA, D, M., FERNANDES, M. J. S. (2007). The Na^+/K^+ ATPase activity is increased in the hippocampus after multiple status epilepticus induced by pilocarpine in developing rats. *Brain Research*. v. 1138, p. 203-207.
- KONNERTH, A., HEINEMANN, U. YAARI, Y. (1984). Slow Transmission of Neural Activity in Hippocampal Area CA1 in Absence of Active Chemical Synapses. *Nature*, v. 307, p. 69-71.
- KURUBA, R., HATTIANGADY, B., SHETTY, A, K. (2009). Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behavior*. v. 14, p.65-73.

- LEITE, J. P., GARCIA-CAIRASCO, N., CAVALHEIRO, E. A. (2002). New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res.* v. 50, p. 93-103.
- LEES, G. J., LEONG, W. (1994). Brain lesions induced by specific and non-specific inhibitors of sodiumpotassium ATPase. *Brain Res.* v. 649, p.225-233.
- LEHMEMKÜHLER, A., SYKOVÁ, E., SVOBODA, J., ZILLES, K., NICHOLSON, C. (1993). Extracellular Space Parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience.* v. 55, p. 339-351.
- LI, X., ZHOU, J., CHEN, Z., CHEN, S., ZHU, F., ZHOU, L., (2008). Long-term expressional changes of Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter 1 (NKCC1) and K⁺-Cl⁻ co-transporter 2 (KCC2) in CA1 region of hippocampus following lithium-pilocarpine induced status epilepticus (PISE). *Brain Research.* v.1221, p.141-146.
- LOMBROSO, C. T. (2007). Neonatal seizures: gaps between the laboratory and the clinic. *Epilepsia.* v.48, p. 83-106.
- LOPES DA SILVA, F. H. (1990). Anatomic Organization and Physiology of the Limbic Cortex. *Physiological Reviews.* v. 70, p. 453-511.
- LUX, H., D., HEINEMANN, U., DIETZEL, I. (1986). Ionic Changes and Alterations in the Size of the Extracellular Space during Epileptic Activity. In: Basic Mechanism of Epilepsies: cellular and molecular aspects. *Advances in Neurology*, v. 44, Raven Press, New York.
- MCDONOUGH, J. H. JR., SHIH, T. M. (1997). Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev.* v. 21, p.559-579.

- MACVICAR, B. A., DUDEK, F. E. (1982). Electrotonic Coupling between Granule Cells of Rat Dentate Gyrus: Physiological and Anatomical Evidence. *J. Neurophysiol.* v. 47, p. 579-592.
- MARTIN, L. A., TAN, S. S., GOLDOWITZ, D. (2002). Clonal Architecture of the Mouse Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, v. 22(9), p. 3520-3530.
- MARTINS-FERREIRA, H. (1954). Variações lentas de voltagem do córtex cerebral. *Instituto de Biofísica, Rio de Janeiro*.
- MATHERN, G. W., ADELSON, P. D., CAHAN, L. D., LEITE, J. P., (2002). Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res.* v.135, p. 237-251.
- MATHERN, G. W., PRETORIUS, J. K., BABB, T. L. (1995). Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures. *J Neurosurg.* v. 82, p. 220-227.
- MATSUMOTO, N., KOMIYAMA, S., AKAIKE, N. (2002). Pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. *Journal Physiolog.* v. 541(2), p. 511-520.
- MCNAMARA, J. O. (1994). Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* v.14, p. 3413-3425.
- MEYER, A., FALCONER, M. A., BECK, E. (1954). Pathological findings in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* v.17, p. 276-285.
- MORI, M., LAPA, R. C. R. S., SCERNI, D. A., FUNKE, M. G., CAVALHEIRO, E. A., e NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. (1998). Sinaptogênese Hipocampal e Epilepsia: Estudo em um Modelo Experimental. *Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology.* v. 4 (3), p. 125:135.

- MOTTE, J., FERNANDES, M. J. S., BARAM, T. Z., e NEHLIG, A. (1998). Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in lithium-pilocarpine seizures in adult rats. *Brain Res.* v.793, p.61-72.
- NABBOU, R., DULAC, O. (2008). Epileptic syndromes in infancy and childhood. *Curr Opin Neurol.* v. 21, p.161-166.
- NICHOLSON, C., HOUNSGAARD, J. (1983). Diffusion in the slice microenvironment and implications for physiological studies. , *Fed. Proc.*, v. 42, p. 2865-2868.
- OLIVEIRA, D. L., BAVARESCO, C., MUSSULINI, B. H., FISCHER, A., SOUZA, D., WYSE, A., WOFCHUK, S. (2008). Early life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus reduces hippocampal glutamate uptake and Na⁺/K⁺ ATPase activity. In: I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica - Neurolatam, 2008, Buzios - RJ. I Neurolatam.
- PAN, E., STRINGER, J. L. (1996). *Burst* Characteristics of Dentate Gyrus Granule Cells: Evidence for Endogenous and Nonsynaptic Properties. *J. Neurophysiol.* v. 75, p.124-132.
- PEREIRA, L. S., (2005). As Conexões Sinápticas e Não-sinápticas no Hipocampo e a Propagação da Depressão Alastrante. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del-Rei, MG, Brasil.
- PRIEL, M. R., SANTOS, N. F. e CAVALHEIRO, E. A. (1996) Developmental aspects of of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research.* V. 26, p. 115-121.
- PIRTTILÄ, T. (2006). Expression and functions of cystatin C in epileptogenesis and epilepsy. Finland: Kuopio.

- RESENDE, M.J.F. (2006). Alterações eletrofisiológicas, durante epilepsia experimental sustentada por conexões não-sinápticas, em giro denteado de ratos em desenvolvimento. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João Del Rei, MG, Brasil.
- RODRIGUES, A.M. (2003). Modelo eletroquímico de atividades epileptiformes sustentadas por modulações não-sinápticas. Dissertação de M. Sc., FIQUINE/UFSJ, São João del-Rei.
- RODRIGUES, A. M., INFANTOSI, A. F. C., ALMEIDA, A. C. G. (2009). Palytoxin and the sodium/potassium pump—phosphorylation and potassium interaction. *Physical Biology*. v. 6, p.13.
- RUTECKI, P. A., LEBEDA, F. J., JOHNSTON, D. (1985). Epileptiform activity induced by changes in extracellular potassium in hippocampus. *J Neurophysiol*. v.54, p. 1363-1374.
- SANKAR, R., SHIN, D. H., LIU, H., MAZARATI, A., PEREIRA DE VASCONCELOS, A., WASTERLAIN, C.G. (1998). Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci*. v.18, p. 8382-8393.
- SANKAR, R., SHIN, D. H., WASTERLAIN, C. G. (1997). Serum neuron-specific enolase is a marker for neuronal damage following status epilepticus in the rat. *Epilepsy Res*. v. 28, p. 129-136.
- SCHARFMAN, H. E., SOLLAS, A. L., SMITH, K. L., JACKSON, M. B., GOODMAN, J. H. (2002). Structural and functional asymmetry in the normal and epileptic rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. v.454(4), p.424-39.
- SCHEINER-BOBIS, G. (2002). The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem*. v. 269(10), p. 2424-33.

- SCHWARTZKROIN, P. A. (1975). Characteristics of CA1 Neurons Recorded Intracellularly in the Hippocampal in Vitro Slice Preparation. *Brain Res.* v. 85, p. 423-436.
- SILVA, I. R. (2009). Abordagem Metabólica na Avaliação da Neuroproteção Promovida pelo Agonista Adenosinérgico A1 no Modelo de Epilepsia Induzida por Pilocarpina. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de pós graduação em Neurologia/Neurociências.
- SILVA, S. F. (2000). Análise de Sincronismo entre o Potencial Extracelular e o Sinal Óptico Intrínseco em Retina de Aves Durante a Depressão Alastrante. Dissertação de M. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SLAIS, K., VORISEK, I., ZOREMBA, N., HOMOLA, A., DMYTRENKO, L., SYKOVA, E. (2008). Brain metabolism and diffusion in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Neurol.* v. 209, p. 145-154.
- SNOW, R. W., DUDEK, F. E. (1984). Synchronous Epileptiform Bursts without Chemical Transmission in CA2, CA3 and Dentate Areas of the Hippocampus. *Brain Research*, v. 298, p. 382-385.
- SOMJEN, G. G., (2001). Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading Depression-Like Depolarization. *Physiol Rev.* v. 81, p. 1065-1096.
- TAUCK, D. L., NADLER, J. V. (1985). Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci.* v. 5, p. 1016-1022.
- TAYLOR, C. P., DUDEK, F. E. (1982). Synchronous Neural Afterdischarges in Rat Hippocampal Slices without Active Chemical Synapses. *Science*, v. 218, p. 810-812.

- TAYLOR, C. P., DUDEK, F. E. (1984). Synchronization without active chemical synapses during hippocampal afterdischarges. *J Neurophysiol.* v.52(1), p. 143-155.
- TEYLER, T. J. (1980). Brain Slice Preparation: Hippocampus. *Brain Res Bull.* v. 5, p. 391-403.
- TRAUB, R. D., WONG, R. K., MILES, R., KNOWLES, W. D. (1985). Neuronal interactions during epileptic events in vitro. *Fed Proc.* v.44(15), p.2953-5.
- TURSKI, L., IKONOMIDOU, C., TURSKI, W. A., BORTOLOTTI, Z. A. e CAVALHEIRO, E. A. (1989). Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse.* v.3, p. 154-71
- TURSKI, W. A., CAVALHEIRO, E. A., SCHWARZ, M., CZUCZWAR, S. J., KLEINROK, Z., TURSKI, L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* v. 9, p.315-335.
- VANLANDINGHAM, K. E., HEINZ, E. R., CAVAZOS, J. E., LEWIS, D.V. (1998). Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol.* v.43, p. 413-426.
- VIVAS, P. G. (2005). Efeito da hipóxia e da palitoxina sobre a atividade epileptiforme não sináptica no hipocampo. Dissertação de M. Sc., UFSJ, São João del Rei, MG, Brasil.
- WEISSINGER, F., BUCHHEIM, K., SIEGMUND, H., HEINEMANN, U., MEIERKORD, H., (2000). Optical Imaging Reveals Characteristic Seizure Onsets, Spread Patterns, and Propagation Velocities in Hippocampal-Entorhinal Cortex Slices of Juvenile Rats. *Neurobiology of Disease.* v. 7, p. 286-298.

XIONG, Z. Q., STRINGER, J. L. (2000). Sodium Pump Activity, not Glial Spatial Buffering, clears Potassium after Epileptiform Activity Induced in The Dentate Gyrus. *J. Neurophysiol.* v. 83, p. 1443-1451.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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