

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA**

**DANIEL DE CASTRO MEDEIROS**

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CODIFICADA TEMPORALMENTE  
INTERFERE NO RECRUTAMENTO DE REDES NEURAIS  
ICTOGÊNICAS EM MODELOS ANIMAIS**

Belo Horizonte

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**DANIEL DE CASTRO MEDEIROS**

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CODIFICADA TEMPORALMENTE  
INTERFERE NO RECRUTAMENTO DE REDES NEURAIS  
ICTOGÊNICAS EM MODELOS ANIMAIS**

Dissertação a ser submetida ao Curso de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra  
Moraes

Belo Horizonte

2009

**Aos meus amados pais**

## Agradecimentos

Aos meus pais, Rafael Egídio de Medeiros e Maria da Glória de Castro Medeiros, pelo amor incondicional, apoio e força. Digo, sem sombra de dúvida, se não fossem vocês, não alcançaria objetivo algum. São meu alicerce, meu porto seguro. Amo vocês.

Ao meu orientador (mestre), Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes, pela oportunidade, que antes era apenas um sonho, de fazer ciência. E também pela paciência de ter, sempre com sabedoria extrema, guiado este aluno no caminho do saber.

À Tatiana Nader Lana, que o apoio a essa conquista veio desde estudar para a prova de seleção, no início dessa caminhada, até a revisar a dissertação, mesmo sem afinidade ao tema. Linda, seu amor e apoio foram determinantes para essa conquista. Sinta como se fosse conquista sua também. E, realmente, como você disse, a distância não foi capaz de diminuir nossa ligação.

Aos companheiros do Núcleo de Neurociência:

- Gustavo Rezende, pelo apoio nos experimentos e nos tramites da vivencia em Belo Horizonte.
- Flávio Mourão: companhia nos corujões e conversas filosóficas sobre a vida, o universo e tudo o mais...
- Maira de Castro Lima (prima), que além das ajudas na ciência, também na árdua e inatingível tarefa de entender a mente de *outrem*.
- Patrícia Maia, pelas orientações experimentais e também filosóficas.
- Mariana, pela amizade e companheirismo.
- Mariele Andrade (*in memoriam*), pelas conversas inspiradoras, companhia fundamental nas aulas e ombro nas lamentações de experimentos difíceis.
- Aos demais colegas do laboratório: Gustavo Lopes, João, Gabriel, Fumega, Lockman, Daniela Fontes, Suellen (*in memoriam*), Hércules, Maura, Shirley, Iva, Onésia, Mauro, Natália por me permitirem passar esse tempo com vocês.

À grande amiga Halliny, pelos conselhos, sugestões e ombro nos momentos complicados.

Aos professores que compõem o Núcleo de Neurociência, Dr. André Ricardo, Dra Maria Carolina, Dra. Grace e Dra. Juliana que, direta ou indiretamente, foram indispensáveis na conclusão deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, CAPES, FAPEMIG, CNPq pelo apoio financeiro.

## Sumário

1 - Introdução.....	15
1.1 - Tratamento.....	16
1.2 - Hiperexcitabilidade.....	16
1.3 - Redes neurais.....	17
1.4 - Estimulação elétrica.....	19
1.5 - Estudos em modelos animais.....	21
1.5.1 - Modelo de indução de crises epiléticas por infusão de pentilenotetrazol....	21
1.5.1 - Modelo de indução de crises espontâneas recorrentes por uso de pilocarpina	
.....	21
1.6 - Ressonância Magnética .....	23
2 - Justificativa e Objetivos .....	26
2.1 - Justificativa.....	26
2.2 - Objetivo geral .....	26
2.2.1 - Objetivos específicos.....	26
3 - Metodologia geral.....	28
3.1 - Padrões temporais de estímulos elétricos .....	28
3.2 - Estimulador.....	31
4 - Diferentes padrões temporais de estímulos elétricos em amígdala de ratos submetidos	
ao protocolo de PTZ .....	32
4.1 - Considerações iniciais .....	32
4.2 - Metodologia.....	33
4.3 - Resultados.....	35
4.3 - Discussão Parcial .....	38
5 - Ressonância magnética funcional para análise do recrutamento neural frente a	
diferentes padrões temporais de estímulos elétricos.....	41
5.1 - Considerações iniciais .....	41
5.2 - Metodologia.....	41
5.2.1 - Parâmetros de aquisição de imagens de RM .....	41
5.2.2 - Análise de imagens 1,4g/kg.....	44
5.3 - Resultados.....	44
5.4 - Discussão Parcial .....	46
6 - Diferentes padrões temporais de estímulos elétricos em núcleo anterior de tálamo de	
ratos submetidos ao protocolo de PTZ .....	48
6.1 - Considerações iniciais .....	48
6.2 - Metodologia.....	49
6.3 - Resultados.....	51
6.4 - Discussão Parcial .....	53
7 - Diferentes padrões temporais de estímulos elétricos em modelo de pilocarpina.....	56
7.1 - Considerações iniciais .....	56
7.2 - Metodologia.....	58
7.3 - Resultados.....	61
7.4 - Discussão parcial .....	65
8 - Conclusão e Perspectivas .....	67
9 - Bibliografia.....	70

Anexo..... 79

## Lista de abreviações

AP	Antero-Posterior
BOLD	Blood Oxygenation Level Dependent
CA1	Corno de Amon
CBZ	Carbamazepina
CEBIO	Centro de Bioterismo
CRE	Crises Recorrentes Espontâneas
CTCG	Crise Tônico Clônica Generalizada
DBS	Estimulação Elétrica Profunda
DV	Dorso-Ventral
ELT	Epilepsia de Lobo Temporal
EEG	Eletroencefalograma
FDA	Food and Drug Administration
FFT	Transformata Rápida de Fourier
GABA	Ácido Gama-amino-butírico
GEPR-9	Genetic Epileptic Prone Rats
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
K+	Íons de Potássio
LL	Latero-Lateral
MP	Mioclonia Parcial
NAT	Núcleo Anterior do Tálamo
NMDA	N-Metil D aspartato
NP- LH	Padrão temporal de estímulo cujos os pulsos escolhidos de forma aleatória apresentam uma distribuição linear em um gráfico de histograma.
NP-IH	Padrão temporal de estímulos cujos pulsos escolhidos de forma aleatória geram uma distribuição exponencial em um gráfico de histograma.
PB	Fenobarbital
PHT	Fenitoína
PTZ	Pentilenotetrazol
RF	Rádio Frequência
RMf	Ressonância Magnética Funcional
RM	Ressonância Magnética
SE	Status Epilepticus
SN	Sistema Nervoso
TLE	Epilepsia de Lobo Temporal
VNS	Estimulação do Nervo Vago
VPA	Ácido Valpróico
WAR	Wistar Audiogenic Rats

## Lista de figuras

- Figura 01: Ratos foram estimulados com dois ou mais dos quatro padrões temporais de distribuição dos pulsos. Em ordem decrescente, Periódico (A, B), Burst (C, D), NP-LH (E, F) e NP-IH (G, H). Coluna da esquerda, histograma dos intervalos entre os pulsos (IPI) e coluna da direita tipificação da distribuição temporal de cada grupo.....30
- Figura 02: Esquemático do estimulador usado nos experimentos. Os números indicam as partes principais do aparelho, sendo 1: MP3 player; 2: 2 baterias de 9V; 3: amplificadores; 4: circuito retificador de corrente; 5: desacopladores ópticos; 6: Saída do sinal; 7: 4 baterias de 9V.....31
- Figura 03: Limiar de PTZ para início da crise mínima. Barras com asteriscos unem grupos com diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ . Teste *one way anova*.....36
- Figura 04: Limiar de PTZ para início da crise máxima. Barras com asteriscos unem grupos com diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ . Teste *one way anova*.....37
- Figura 05: Gráfico A: porcentagem de ocorrência dos IPIs do grupo NP-LH. Gráfico B: porcentagem de ocorrência de IPIs do grupo NP-IH. Gráfico C, porcentagem de ocorrência de IPIs de 220 a 280ms do grupo NP-LH comparado com o grupo NP-IH. Gráfico D, porcentagem de ocorrência de IPIs de 20 a 110ms do grupo NP-LH comparado com o grupo NP-IH.....40
- Figura 06: desenho esquemático dos 20 ciclos de silêncio – estímulo nos quais as imagens de RMf foram captadas de ratos wistar machos anestesiados com uretana (140g/kg).....42
- Figura 07: desenho esquemático dos períodos de silêncio e experimentais nas quais as imagens de RMf foram captadas.....43
- Figura 08: Imagens mostrando a atividade neural perante diferentes padrões temporais de estímulos elétricos. Maior atividade é mostrada com cores mais avermelhadas e menores, por cores azuis. Nota-se aumento da atividade da amígdala nos estímulos periódico e NP-IH.....45

Figura 09: Imagens mostrando a atividade neural perante infusão de PTZ, PTZ e estímulo periódico, PTZ e estímulo NP-IH. Maior atividade é mostrada com cores mais avermelhadas e menores, por cores azuis. Nota-se aumento da atividade perante infusão de PTZ e PTZ-periódico e menos atividade no grupo PTZ-NP-IH.....	46
Figura 10: Limiar de PTZ para início da crise mínima em estimulação ANT.....	52
Figura 11: Limiar de PTZ para início da crise máxima. Barras com asteriscos unem grupos com diferença estatística significativa, $p < 0,05$ . Teste <i>one way anova</i> .....	53
Figura 12: Número de crises ocorridas no período de ausência (controle) e presença de estímulo não periódico (NP-IH). Barras com asterisco unem os grupos com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Teste Mann Whitney.....	61
Figura 13: Índice de gravidade das crises ocorridas nos períodos de ausência e presença de estímulo não periódico. Teste estatístico: Mann Whitney.....	62
Figura 14: Tempo médio de todas as crises no período de ausência (controle) e presença (NP-IH) de estímulo. Barras com asterisco unem grupos com diferença estatística, $p < 0,05$ . Teste usado: Mann Whitney.....	63
Figura 15: Número de crises ocorridas no período de ausência (controle) e presença de estímulo periódico. Teste usado: Mann Whitney.....	64
Figura 16: Sequência de EEG de animal submetido a infusão de PTZ pela veia da calda concomitante a estimulação elétrica a 0,5Hz em complexo amigdalóide.....	69

## **Lista de tabelas**

Tabela 01: Latência para começo dos comportamentos referentes à crise mínima e à crise máxima referentes ao protocolo de estimulação elétrica codificada temporalmente em amígdala de ratos wistar.

Tabela 02: Latência para começo dos comportamentos referentes à crise mínima e à crise máxima referentes ao protocolo de estimulação elétrica codificada temporalmente em núcleo anterior do tálamo de ratos wistar.

## Resumo

Epilepsia é uma síndrome que acomete 2% da população mundial, sendo que 25% dos portadores de epilepsia são resistentes ao tratamento medicamentoso. A mudança de paradigma ao se focar o hipersincronismo em contrapartida à hiperexcitabilidade abre uma nova possibilidade de tratamento. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência de estímulos elétricos codificados no tempo nas crises convulsivas de modelos animais de epilepsia. Ao longo do estudo foram utilizados 4 padrões de estimulação elétrica, com igual número de estímulos por segundo (4 pulsos de 100us com ~300 uA), mas com diferente distribuição temporal dos intervalos entre pulsos (IPIs), sendo eles: periódico, IPIs fixos de 250ms; em-salva (*burst*), IPIs de 20ms alocados nos últimos 80ms de cada segundo; não periódico (NP) LH, IPIs aleatórios com distribuição linear do histograma; NP-IH, IPIs aleatórios seguindo uma distribuição exponencial do histograma. Para verificar a influência desses estímulos no hipersincronismo neural, foi utilizado, primeiramente, o modelo de PTZ de indução de crise. Ratos Wistar machos receberam cirurgicamente implante de eletrodo bipolar na amígdala e tiveram a veia da calda canulada para a infusão de PTZ (10mg/ml) a um fluxo de 1ml/min concomitantemente com os estímulos. Foi verificado que a latência (mg de PTZ/kg peso animal) para começo da crise mínima foi significativamente menor no grupo do padrão periódico ( $19,6 \pm 1,6$  mg/Kg) se comparado com o controle ( $26,9 \pm 1$  mg/Kg), que somente recebeu a infusão da droga. E o grupo do padrão NP-IH demonstrou, significativamente, maior latência tanto para começo da crise mínima quanto máxima se comparado com o grupo controle ( $35,50 \pm 3$  mg/Kg e  $88,4 \pm 9$  mg/Kg respectivamente). Imagens de ressonância magnética funcional foram realizadas durante estimulação periódica e NP-IH para confirmar os achados comportamentais, contudo, algumas alterações no modelo foram necessárias. Os ratos foram anestesiados com uretana (140g/kg) durante a infusão de PTZ (40mg/ml) pela veia da calda a um fluxo de 0,1ml/min. Imagens feitas sem infusão de PTZ mostraram uma maior ativação na área amígdala tanto para estímulos periódicos quanto NP-IH. No entanto, com a infusão de PTZ, o estímulo periódico se mostrou capaz de aumentar a atividade neural ipsilateral ao eletrodo enquanto o estímulo NP-IH apresentou um efeito contrário: diminuiu a atividade neural em áreas como tronco, sistema límbico e regiões temporais ipsilaterais ao eletrodo de estímulo. Com o intuito de verificar se outra área, além da amígdala, é também capaz de responder à diferença na codificação temporal dos estímulos periódico e NP-IH, eletrodos bipolares foram implantados cirurgicamente no núcleo anterior do tálamo de ratos wistar machos. Utilizando o mesmo protocolo de estimulação e infusão do primeiro experimento, não observamos diferença significativa entre os estímulos periódico e NP-IH para a latência de começo da crise mínima. Em contrapartida, ambos os estímulos aumentaram a latência para começo da crise máxima (controle:  $49 \pm 2$  mg/Kg; periódico:  $65 \pm 5$  mg/Kg NP-IH:  $70 \pm 3$  mg/Kg). Para averiguar a influência desses mesmos estímulos, periódico e NP-IH, em uma rede neural intrinsecamente hiperexcitável, repetimos o experimento em um modelo de Epilepsia de Lobo Temporal (ELT) que apresenta crises espontâneas recorrentes: modelo de Pilocarpina (PILO). Ratos Wistar machos foram primeiramente submetidos ao *status epilepticus* (SE) induzido por PILO (320mg/kg ip). Após um período de 45 dias do SE, eletrodos bipolares foram cirurgicamente implantados na amígdala desses animais. Entre

o 50° e o 58° dia pós SE, o comportamento dos animais foi gravado no período das 10 às 16 horas, sendo que nos quatro últimos dias um grupo deles recebeu o estímulo periódico e outro grupo o NP-IH. Durante o período no qual o grupo NP-IH recebeu estímulo ocorreram significativamente menos crises se comparado ao período de ausência do mesmo ( $0 \pm 2,0/2$  e  $4 \pm 10,1/7$  respectivamente). Corroborando para o efeito anti-convulsivo do padrão NP-IH, o tempo médio das crises foi significativamente menor no período de estimulação se comparado com o tempo de ausência do estímulo NP-IH ( $15 \pm 7/20$  e  $25 \pm 20/30$  respectivamente). Em contrapartida, não houve diferença no índice de gravidade das crises no período sem estímulo se comparado com o período de presença do mesmo. No que se refere à estimulação periódica, não houve diferença significativa no número de crises durante a apresentação do estímulo quando comparado ao período sem estimulação. Concluindo, a amígdala foi capaz de diferir entre padrões temporais de estímulos elétricos (o tálamo não apresentou resultados semelhantes) sendo que o estímulo periódico se mostrou pró-convulsivo enquanto o padrão de estímulo NP-IH foi anti-convulsivo para os modelos de PILO e PTZ.

## Abstract

Epilepsy is a syndrome that affects 2% of the world population, and 25% of patients with epilepsy are resistant to drug treatment. Shifting paradigm to more importance to hypersynchronism than hyperexcitability, opens a new possibility for treatment. The objective of this study was to analyze the influence of electrical stimuli time coded on seizures in animal models of epilepsy. Throughout the study, it was used 4 patterns of electrical stimulation, and an equal number of stimuli per second (4 pulses of 100 $\mu$ s with  $\sim$  300  $\mu$ A), but with different temporal distribution of the intervals inter pulses (IPIS), namely: periodic, fixed IPIS 250ms; burst, 20ms IPIS allocated in the last 80 ms of each second; not periodic (NP) LH, IPIS random and linear distribution on histogram; NP-IH, IPIS random following an exponential distribution on histogram. To check the influence of these stimuli in neural hypersynchrony, model of PTZ induced seizure was used. Male Wistar rats have surgically implanted bipolar electrode in the amygdala and they had the tail vein cannulated for the infusion of PTZ (10 mg/ml) at a rate flow 1ml/min concurrently with the stimuli. It was found that the latency (mg PTZ/Kg animal) for the beginning of the minimum seizure was significantly lower in the periodic pattern group ( $19.6 \pm 1.6$ ) compared with control ( $26.9 \pm 1$ ) that only received drug infusion. And the NP-IH group showed significantly greater seizure threshold for both, maximum and minimal seizure as compared with the control group ( $35.50 \pm 3$  and  $88.4 \pm 9$  respectively). Images of functional magnetic resonance imaging were performed during periodic and NP-IH stimulation to confirm the behavioral findings, however, some changes in the model were necessary. The rats were anesthetized with urethane (40mg/ml) during the infusion of PTZ (40mg/ml) by tail vein at a rate of 0.1 ml / min. Images made without infusion of PTZ showed a greater activation in the amygdala for both periodic stimuli as NP-IH. However, with the infusion of PTZ, the periodic stimulation has been shown higher neural activity ipsilateral to the stimulating electrode while NP-IH had an opposite effect: decreased neural activity in areas such as brain stem, limbic system and temporal regions ipsilateral electrode stimulation. In order to see if another area, beside amygdala, is also capable of responding to the difference in temporal coding of periodic stimuli and NP-IH, bipolar electrodes were surgically implanted in the anterior nucleus of the thalamus of male Wistar rats. Using the same protocol of stimulation and infusion of the first experiment, we observed no significant difference between the periodic stimuli and NP-IH for the latency of minimum seizure. In contrast, both stimuli increased seizure threshold (control:  $49 \pm 2$  mg/Kg; periodic:  $65 \pm 5$  mg/Kg and NP-IH:  $70 \pm 3$  mg/Kg). To investigate the influence of such stimuli, periodic and NP-IH, in a neural network intrinsically hyperexcitable, we repeat the experiment in a model of temporal lobe epilepsy (TLE) showing recurrent spontaneous seizures: a model of pilocarpine (PILO). Male Wistar rats were first submitted to status epilepticus (SE) induced by PILO (320mg/kg ip). After a period of 45 days of the SE, bipolar electrodes were surgically implanted in the amygdala of animals. Between the 50th and 58th day after SE, the animals' behavior was recorded during the period from 10 to 16 hours, and the last four days a group of them received the periodic stimulation and the other group NP-IH stimulation. During the period in which the NP-IH group received stimulation occurred significantly less seizures compared to the period of absence of electrical

stimulation ( $0 \pm 2, 0/2$  and  $4 \pm 10, 1/7$  respectively). Corroborating to the anti-convulsive effect of the NP-IH, the mean seizure duration was significantly lower during stimulation compared with the period of absence of the stimulus NP-IH ( $15 \pm 7/20$  and  $25 \pm 20/30$  respectively). In contrast, no difference in the severity of crises in the period without stimulation compared with the period during which the same. With regard to periodic stimulation, no significant difference in the number of seizures during the stimulus presentation as compared to the period without stimulation. In conclusion, the amygdala is capable of distinguishing between temporal patterns of electrical stimulation (the thalamus did not show similar results) and the periodic stimulation proved being pro-convulsive as the NP-IH stimulus was anti-convulsive to the models and PILO PTZ.

# 1 - Introdução

Epilepsias são distúrbios neurológicos comuns que afetam 1 a 2% da população geral. Para que haja um diagnóstico positivo de epilepsia é necessária a presença de pelo menos uma crise, acompanhada de alterações permanentes no cérebro que aumentam sua susceptibilidade a outras crises. É necessário, também, que a esse quadro esteja associado a um distúrbio neurobiológico, cognitivo, psicológico ou social (FISHER, BOAS, BLUME, ELGER, GENTON, LEE, & ENGEL, 2005).

Segundo Mcnamara (1994), o termo epilepsia refere-se a uma desordem da função cerebral caracterizada por uma periódica e imprevisível ocorrência de crises epiléticas. Essas últimas são, por sua vez, uma mudança temporária do comportamento devido a um desordenado, sincrônico e rítmico disparo de populações de neurônios do sistema nervoso central. Essa mudança temporária ocorre devido a alterações encefálicas que levam à **hiperexcitabilidade** e **hipersincronismo** da atividade neural, podendo se manifestar de diversas formas, dependendo dos substratos neurais envolvidos (ENGEL, 1995).

Crises epiléticas são divididas em parciais e generalizadas. As crises parciais são aquelas que apresentam atividade eletroencefalográfica de uma rede neural epileptogênica limitada a uma porção definida do sistema nervoso central, subclassificadas em complexa ou simples na dependência de haver ou não perda da consciência, respectivamente. As crises parciais podem evoluir para generalizadas pelo recrutamento de outras estruturas cerebrais. Crises generalizadas apresentam uma ampla atividade eletroencefalográfica indicando um acometimento bilateral de extensas áreas do encéfalo, com presença ou não de manifestações motoras. Essas crises podem ainda se manifestar através de períodos de ausência em que se observa suspensão da consciência, sem importante atividade motora (ausência simples), ou acompanhada de discretas atividades motoras clônicas, atônicas, tônicas e autonômicas, e automatismos (ausências complexas) (ENGEL, 1995; TAYLOR & DUDEK, 1984).

## **1.1 - Tratamento**

Dentre as modalidades de tratamento das Epilepsias em uso corrente na clínica médica, duas se destacam como mais comumente usadas: intervenção medicamentosa, cirurgia de ablação. O tratamento farmacológico, de forma geral, objetiva diminuir a excitabilidade do tecido neural, aumentando o tônus inibitório. Tendo em vista as diferentes causas das epilepsias, o tratamento farmacológico é variado, sendo que cada droga tem efeito diferenciado em cada caso. Como exemplo, tem-se o barbitúrico fenobarbital (PB) que aumenta a inibição GABA-érgica ao prolongar a abertura dos canais de cloreto (GUERREIRO & MELO, 2004); a fenitoína (PHT) que atua de diversas formas no sentido de diminuir a excitabilidade do neurônio, interferindo, sobretudo, no transporte de sódio através da membrana (GARZON, JORGE, & LIBERALESSO, 2004); a carbamazepina (CBZ) que tanto atua diminuindo a condutância da membrana ao sódio, quanto na neurotransmissão sináptica excitatória, antagonizando purinas, monoaminas, acetilcolina e NMDA (COSTA, 2004); e também o ácido valpróico (VPA) cujos mecanismos farmacológicos ainda não foram bem elucidados, mas, ao que parece, é capaz de elevar os níveis de GABA no sistema nervoso central (YACUBIAN, 2005).

Outra forma de tratamento usado é submeter o paciente a um procedimento cirúrgico para a ressecção do foco epileptogênico. Obviamente, a determinação precisa do foco é crucial para o sucesso da cirurgia, portanto é recomendada, principalmente, a pacientes com crises de origem focal (MARINO Jr, 1993).

Porém, certos casos dessa síndrome são resistentes ao tratamento medicamentoso, de fato, 25% dos pacientes não obtêm controle adequado das crises com os fármacos existentes, chamadas de epilepsias refratárias. E dessas, 30% não são elegíveis para cirurgia (GUERREIRO, 2000).

## **1.2 - Hiperexcitabilidade**

Acredita-se que a excitabilidade aumentada é decorrente tanto de aspectos intrínsecos ao neurônio quanto de suas interações com outros neurônios (LOTHMAN et al., 1995; MANGAN et al., 1995; REMPE et al., 1995). Macnamara (1994) produziu uma

revisão na qual mostra diversas teorias para evidenciar a causa desse aumento na epilepsia. Como exemplo, tem-se as células em cisto dormente na qual, células inibitórias do hipocampo deixam de ser excitadas pela morte neuronal das células musgosas, levando a um estado de hiperexcitabilidade (SLOVITER, 1991). Esse quadro de excesso de excitação hipocampal também é evidenciado na teoria do brotamento das células musgosas (NADLER, 1980). Após um insulto, como no *status epilepticus*, há o brotamento de projeções das células granulares para sua própria árvore dendrítica na camada molecular do giro denteado levando a uma auto-excitação. Ainda nessa revisão são mostrados outros fatores não sinápticos no mecanismo ictogênico, como o aumento de K<sup>+</sup> em micro-domínios extracelulares próximos às células piramidais corticais e da região CA1 hipocampal que desencadeariam disparos numa frequência acima do normal para aqueles neurônios (TRAYNELIS, 1988).

Lothman e cols. (1995) usaram fatias para mostrar o aumento da excitação glutamatérgica ionotrópica mediada por receptores NMDA na região CA1 do hipocampo de ratos com epilepsia de lobo temporal (ELT). Neste estudo não foram encontradas alterações nos parâmetros elétricos da membrana celular. Mangan e cols. (1995), seguindo os trabalhos de Lothman, usaram a mesma técnica e o mesmo modelo de ELT para demonstrar os mecanismos da diminuição de potenciais pós-sinápticos inibitórios (IPSP) na região CA1 do hipocampo. Mais recentemente, Bernard e cols. (2004) descreveram uma canalopatia dendrítica adquirida em neurônios de ratos com modelos genéticos de ELT, acarretando hiperexcitabilidade neural.

### **1.3 - Redes neurais**

Em paralelo à característica de hiperexcitabilidade para ictogênese, as conexões entre substratos neurais parecem estar relacionadas com a propagação, manutenção e expressão motora da crise. Para o discernimento dessas conexões entre substratos e das redes neurais requeridas na propagação da atividade epiléptica, Eells *et al.* (2003) analisaram o número de neurônios marcados com Fos imunoreativo em específicas regiões no tronco encefálico e no prosencéfalo após diferentes fenótipos de crises induzidos por diferentes maneiras. Foi encontrado que mioclonias de membros anteriores,

automatismos faciais, que eram ditas crises límbicas, realmente ativam estruturas prosencefálicas como córtex, complexo amigdalóide, hipocampo e núcleos talâmicos; e que crises generalizadas com comportamento tônico-clônicas generalizadas ativam áreas tanto prosencefálicas quanto do tronco cerebral. E mais, encontrou que há estruturas como amígdala medial, hipotálamo ventral e córtex do colículo inferior que mostraram, marcadamente, um aumento de Fos quando ambos os fenótipos, tanto o límbico quanto o de tronco, eram evidenciados.

Outro estudo de substratos e suas conexões foi feito por Imamura *et al.* (2001). Neste, cortes seccionaram a comunicação do hipocampo ventral com o dorsal e crises foram induzidas com injeção de ácido caínico em amígdala lateral. Percebeu-se que, apesar do hipocampo dorsal apresentar também disparos epileptiformes, estes foram em menor intensidade e dessincronizados com a amígdala, hipocampo ventral e o córtex. Seguindo o foco em substratos neurais em circuitos reverberantes que parecem estar relacionadas com a propagação, manutenção e expressão crise, Guzman *et al.* (2004) usou cortes cirúrgicos em fatias para avaliar a participação do hipocampo e de áreas parahipocámpais na ictogênese, na sincronização e na manutenção da atividade ictal. Resultados indicaram que essas áreas são importantes para tais ações.

Em paralelo, Moraes e cols. (2005) isolaram circuitos prosencefálicos através de uma transecção pré-colicular completa em GEPR-9s (Genetic Epileptic Prone Rats) e observaram que, ainda que o prosencéfalo contribua para a atividade eletrográfica epileptiforme (mudança drástica na forma do EEG), o fenótipo comportamental das crises não se altera de forma significativa. Por fim, Moraes e cols. (2000) mostraram, através de registros eletrofisiológicos concomitantes a análise comportamental, que a incidência gradual do fenótipo de crises límbicas durante o abrasamento audiogênico de ratos WAR é acompanhada por um aumento da atividade epileptiforme no lobo temporal e por uma diminuição de manifestações comportamentais associadas a tronco encefálico (por exemplo, de crises tônico-clônicas generalizadas para automatismos faciais e elevação com quedas atônicas). Este último sugere que a modificação do comportamento convulsivo do modelo se deve a uma lenta transferência de atividade epileptiforme de uma rede neural para outra.

Percebe-se que além da hiperexcitação, o hipersincronismo das estruturas bem como as redes neurais são de extrema importância para a propagação e manutenção da crise epiléptica. Além do tratamento medicamentoso e cirúrgico, outra forma de intervenção nessas características seria pela estimulação elétrica de estruturas do sistema nervoso (SN), periférico ou central. Essa forma vem obtendo interessantes resultados na diminuição do número de crises e suas severidades na clínica médica e na pesquisa científica.

#### **1.4 - Estimulação elétrica**

Um dos alvos para metodologia de estimulação elétrica é o nervo vago. Essa técnica já vem sendo estudada há anos e conta com uma vasta bibliografia publicada além de hoje já ser aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) norte-americano como terapêutica para pacientes refratários. Revisões do tema podem ser encontradas em Binnie (2000), Valencia (2001) e Ben-Menachem (2002). Pensa-se que a ação da estimulação do nervo vago (VNS) seja por uma maior ativação de regiões do tronco encefálico como o *Locus Coeruleus*, provocando uma ampla e difusa liberação de norepinefrina, um neurotransmissor inibitório. Contudo, um dos problemas de se usar o nervo vago é a repercussão na regulação cardiovascular por se estimular um nervo diretamente envolvido neste processo. Na bibliografia podem-se encontrar diversos relatos de casos de morte-súbita em pacientes submetidos à estimulação elétrica do nervo vago.

Outra possibilidade é a utilização de estruturas centrais do sistema nervoso como alvo para a estimulação elétrica. Kinoshita e cols. (2004) avaliaram os efeitos da estimulação elétrica da superfície cortical em pacientes com epilepsia de lobo temporal em preparação para procedimento cirúrgico e comprovaram sua eficácia na supressão das crises. Em estruturas profundas do cérebro, muitos alvos terapêuticos já foram tentados, como *locus coeruleus*, núcleo caudado, tálamo, núcleo subtalâmico, amígdala, hipocampo (RYDER et al., 2004).

Apesar de muitos estudos comprovarem a eficiência da estimulação elétrica central na diminuição do número de crises, e até mesmo abolição das mesmas, ainda

especula-se a ação dessa forma de tratamento. Duas hipóteses principais são levantadas: inativação de redes ictogênicas e ativação de redes inibitórias.

- A inativação seria alcançada por estímulo de alta frequência que colocaria os neurônios circundantes ao eletrodo em estado refratário, impedindo assim que respondam aos estímulos pré-sinápticos.
- A ativação de redes inibitórias ocorreria pela escolha de regiões que são sabidamente liberadoras de neurotransmissores inibitórios para serem ativadas pelos estímulos elétricos (RYDER et al., 2004).

Percebe-se que, mesmo tendo-se duas hipóteses de ação das estimulações elétricas profundas (DBS), ambas destinam-se ao objetivo de diminuir a hiperexcitação de determinada região ou rede neural. Poucos estudos, porém, foram feitos tendo-se como pensamento central o uso de eletro-estimulação visando diminuir o excesso de sincronismo neural. E, os que existem, usaram modelos matemáticos para estudar as interações das redes neurais.

Um desses estudos foi realizado por Tass e cols (2003). Este propôs uma técnica que, por meio de 4 eletrodos, colocaria diferentes populações neuronais em estado refratário em cada momento, alternadamente, com intuito de dessincronizar uma rede neural maior. Em seus modelos matemáticos, chegou à conclusão que, diferentemente dos estímulos de alta frequência que inativam a rede, os estímulos que propõe seriam capazes de, além de diminuir a sincronia, permitir que a rede funcione normalmente nos períodos entre os estímulos.

Em outro trabalho, feito por Lumer e cols (1997), notou-se que estímulos aplicados em uma rede neural artificial, na mesma frequência de oscilação normal dessa rede, porém com atrasos temporais (*jitter*), são capazes de diminuir a sincronia entre áreas. Percebe-se com esse estudo que a aspecto temporal, além de outras características dos estímulos como frequência e amplitude, é importante em um recrutamento neural sincrônico.

Portanto a tentativa de diminuir o hipsincronismo por meio de estimulação elétrica ainda se mantém como uma proposta terapêutica a ser estudada para a tentativa

de interrupção das crises epiléticas. É que um aspecto importante para alcançar tal intento é dando-se maior importância aos aspectos temporais do recrutamento neural.

## **1.5 - Estudos em modelos animais**

Modelos experimentais que mimetizam tanto crises convulsivas quanto epilepsias têm contribuído enormemente para um melhor entendimento das epilepsias. Esses modelos podem mimetizar um amplo espectro de características, tanto clínicas quanto anatomopatológicas.

### **1.5.1 - Modelo de indução de crises epiléticas por infusão de pentilenotetrazol**

A droga Pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista gabaérgico, provoca crises convulsivas dependendo da dose administrada. É um modelo de mimetiza as crises epiléticas e vem sendo utilizado para estudos de novos métodos anticonvulsivantes. O PTZ acarreta dois tipos diferentes de crises motoras em roedores: crises mioclônicas e crises tônico-clônica-generalizada dependendo da dose e da via de administração escolhida (VELISEK, 1992). A primeira, também chamada de crise mínima, tem manifestações mais leves, como espasmos, mastigação e clonias de cabeça e membros, elevação e queda. Estão envolvidas estruturas do sistema límbico e por isso, o PTZ é tido como modelo de epilepsia de lobo temporal. Já a segunda também chamada de crise máxima, tem sua manifestação motora na forma de convulsões tônico-clônicas e envolvem estruturas por todo cérebro, principalmente áreas de tronco, caracterizando um modelo de epilepsia generalizada.

### **1.5.1 - Modelo de indução de crises espontâneas recorrentes por uso de pilocarpina**

O modelo da pilocarpina é particularmente interessante, pois se assemelha ao quadro humano de epilepsia, sendo caracterizado por crises recorrentes espontâneas (CRE).

A pilocarpina atua no sistema colinérgico, como agonista dos receptores muscarínicos (CAVALHEIRO, 2000) e, quando aplicada sistêmica, intra-amígdala, ou intra-hipocampal, é capaz de induzir atividade epiléptica apresentando crises motoras e dano neural (TURSKI, 1983).

O modelo possui três fases distintas:

- 1) fase aguda: logo após a injeção, caracterizada por crises repetidas por no mínimo 30 minutos, chamado de *Status Epilepticus* (SE).
- 2) fase latente: período após a recuperação do SE onde não há manifestação comportamental ou eletroencefalográfica de crises epiléticas.
- 3) fase crônica: tendo seu início com a primeira crise espontânea, quatorze dias ou mais da indução do SE e é caracterizada pela recorrência desta.

Este modelo tem sido bastante utilizado para o estudo das alterações fisiopatológicas relacionadas à fase crônica da epilepsia, (CRE), que mimetiza as crises parciais complexas e a patologia associada de esclerose hipocampal e modificação sináptica encontrada em humanos com crises intratáveis de lobo temporal (TURSKI *et al*, 1983; LEITE *et al*, 1990). A intensidade das modificações sinápticas, a frequência e a latência para as CRE são determinadas pela duração do SE (LEMONS & CAVALHEIRO, 1995).

Um mecanismo proposto para a ictogênese induzida por pilocarpina é por haver, inicialmente, uma ativação das vias colinérgicas muscarínicas cujos eferentes ativam vias glutamatérgicas. O que reforça a hipótese desse mecanismo é o fato de que é possível bloquear crises induzidas por pilocarpina por meio do pré-tratamento com antagonistas colinérgicos. No entanto, o tratamento com esses mesmos antagonistas após a instalação do SE não bloqueia as crises (TURSKI *et al*, 1984). Portanto, a iniciação das crises é feita por agonista colinérgico, mas a manutenção é glutamatérgica.

Dados que reforçam essa hipótese mostram que regiões lesadas pelo SE induzido por pilocarpina não são necessariamente aquelas onde existe grande presença de receptores colinérgicos (WASTERLAIN & SHIRASAKA, 1994). Sendo assim, a

excitotoxicidade induzida pela excessiva liberação de glutamato seria responsável pelas amplas lesões observadas nesse modelo.

## **1.6 - Ressonância Magnética**

A Ressonância Magnética possui diversas aplicações, tanto no estudo de sistemas biológicos quanto no estudo de materiais. O caráter não invasivo desta técnica possibilita a realização de estudos seriais, onde um mesmo indivíduo é acompanhado ao longo do tempo, permitindo não só a redução do número de animais utilizados, mas também o acompanhamento da dinâmica temporal da evolução de processos patológicos ou de maturação estrutural. A chamada RM funcional (RMf) possibilita a criação de mapas de ativação cerebral com resolução espacial superior a qualquer outra técnica não invasiva e com resolução temporal da ordem de segundos. Tais mapas fornecem aos experimentadores informações sobre a dinâmica de ativação de áreas cerebrais em resposta a estímulos somato-sensoriais ou à ação de fármacos. Inferências podem ser feitas sobre a participação de determinadas áreas em alterações comportamentais observadas em condições análogas (p.e. o efeito de uma droga sobre a atividade locomotora pode ser relacionado às áreas ativadas pela mesma droga durante a RMf). As técnicas utilizadas para o imageamento de animais são exatamente as mesmas utilizadas em aparelhos clínicos. Tal aspecto torna a RM de animais de pequeno porte uma ferramenta valiosa no processo de transporte dos resultados de experimentos pré-clínicos para a clínica.

De forma simplificada essa técnica utiliza um forte campo magnético para orientar certos elementos atômicos, principalmente o hidrogênio. Para melhor entendimento, inicialmente podemos considerar os átomos de hidrogênio como minúsculos peões, apresentando movimentos de rotação e precessão em torno de um eixo principal. Ao posicionarmos tais átomos dentro de um campo magnético, seus eixos de rotação, também chamados de “spins”, sofrerão um processo de alinhamento com esse campo magnético. Parte dos spins se alinhará no mesmo sentido enquanto que uma parte ligeiramente menor se alinhará em sentido oposto ao campo. Dessa forma, teremos como

resultante um diminuto vetor de momento magnético com uma componente principal na mesma direção e sentido que o campo magnético principal e outra perpendicular ao mesmo. Em outras palavras, os átomos de hidrogênio estarão alinhados com o campo magnético e realizando movimentos de precessão com uma frequência que é diretamente proporcional à magnitude do campo magnético principal, frequência essa conhecida como frequência de Larmor. Consideremos agora que um pulso de radiofrequência (RF) seja aplicado perpendicularmente a esse vetor resultante de spins, com frequência igual à frequência de Larmor. O que observamos é que os spins gradualmente saem de seu estado de “repouso” em alinhamento com o campo magnético, passando a adquirir uma orientação perpendicular ao mesmo. Além disso, os átomos de hidrogênio em ressonância com o pulso de RF estarão realizando movimento de precessão em sincronia (dizemos que os spins estão em coerência de fase). Nessa situação, os átomos de hidrogênio estão em um estado de energia superior, um equilíbrio instável, que é mantido pelo pulso de RF. Uma vez retirado o pulso de RF, os spins retornarão rapidamente ao estado de repouso inicial, alinhados com o campo magnético principal, emitindo, nesse processo, energia em forma de RF proporcional à energia absorvida na primeira fase do processo. Esse sinal de RF é utilizado na geração das imagens.

Para que seja possível a obtenção de imagens do corpo, é necessário que algum tipo de decodificação espacial seja empregado. Como a frequência de oscilação dos spins de um mesmo tipo de átomo depende do campo magnético ao qual tais átomos estão sujeitos, pequenas variações controladas no campo magnético resultarão em grupos de spins com frequências discretamente diferentes. Dessa forma, para se conseguir uma decodificação espacial aplicam-se gradientes magnéticos nos três eixos ortogonais de forma a controlar a frequência e a fase dos spins em diferentes posições do corpo. O sinal medido pode ser então analisado através da Transformada Rápida de Fourier (FFT) revelando as componentes em frequência do sinal, que terão intensidades proporcionais à quantidade de átomos de hidrogênio oscilando em cada frequência específica. Com efeito, a manipulação dos spins através da aplicação controlada de campos magnéticos e pulsos de RF, resulta na obtenção de imagens de tecidos vivos de forma não invasiva. Além disso, aspectos funcionais de diferentes partes da anatomia podem ser estudados de forma dinâmica, quer seja através da aquisição de seqüências rápidas de imagens, quer

seja através do estudo de contraste gerado de forma endógena (p.e. contraste BOLD – Blood Oxygenation Level Dependant) ou exógena (p.e. agentes de contraste baseados em Gadolínio, Manganês ou Óxido de Ferro).

## **2 - Justificativa e Objetivos**

### **2.1 - Justificativa**

No tratamento de uma doença catastrófica como nos casos da epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, a mudança de paradigma em termos de terapêutica ao se focar o hipersincronismo em contrapartida à hiperexcitabilidade, abre uma possibilidade para um grande número de pacientes que atualmente não possuem opção farmacológica nem cirúrgica de tratamento. Ou seja, uma mudança de ênfase em como se abordar a problemática das crises epiléticas, dando-se maior importância aos aspectos de dinâmica temporal de recrutamento neural para explicar a ictogênese. O fator tempo, na escala de milissegundos, pouco tem sido explorado no estudo de como a atividade de uma rede neural que, outrora funcionando de forma normal, passa repentinamente a desenvolver um padrão hipersincrônico, cuja expressão clínica é a crise epilética.

### **2.2 - Objetivo geral**

Analisar o efeito anti e pró convulsivo de padrões temporais de estímulos elétricos em redes neurais hiperexcitáveis em modelos animais.

#### **2.2.1 - Objetivos específicos**

- Verificar alteração na latência para começo das crises mínimas e máximas no protocolo de PTZ mediante diferentes padrões temporais de estímulos elétricos na amígdala de ratos.
- Analisar o recrutamento sináptico pelo aumento ou diminuição da atividade neural mediante diferentes padrões temporais de estímulos elétricos na amígdala de ratos utilizando-se Ressonância Magnética Funcional.
- Verificar se o tálamo é capaz de interferir na ictogênese mediante diferentes padrões temporais de estímulos elétricos usando-se como ferramenta a latência

para começo das crises mínimas e máximas no protocolo de PTZ e estimulação do núcleo anterior do tálamo.

- Verificar alteração na frequência das crises espontâneas recorrentes mediante os padrões de estímulo NP-IH e periódico em animais submetidos ao protocolo de pilocarpina.

### **3 - Metodologia geral**

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal-CETEA, sob o protocolo 150/06 que se encontra em anexo.

#### **3.1 - Padrões temporais de estímulos elétricos**

Todos os padrões de estímulo elétrico usados nesse trabalho seguiram uma regra comum: haver somente 4 pulsos por segundo (4 Hz) no intuito de fornecer sempre a mesma quantidade de energia. Essa frequência base foi escolhida por três razões:

- Ser uma frequência de oscilação de uma ampla rede, desde regiões límbicas e corticais até tronco, durante um episódio de crise (MORAES et. al, 2005).
- A banda de frequência theta (2 a 8hz) se sobressai na comunicação de estruturas límbicas, principalmente amígdala, hipocampo, tálamo e desses para o córtex. Logo 4Hz seria uma frequência que alcançaria, pelas conexões anatômicas normais, o maior número de estruturas (MILLER, 2008; BUZÁKI, 2002).
- A oscilação theta possui a função de indução de memória amígdala-hipocampal. Logo, 4Hz é uma frequência que possivelmente propicia uma maior codificação temporal para essas estruturas, levando-as a uma modificação nos pesos sinápticos (BUZSÁKI, 2002; PAPE, 2005).

Porém, os estímulos diferenciaram entre si pela distribuição temporal desses 4 pulsos no tempo. Ao longo do trabalho foram usados dois ou mais de 4 padrões de distribuição, sendo eles:

- Periódico: os pulsos eram separados entre si por um intervalo fixo de tempo de 250ms.

- *Burst*: os pulsos eram separados entre si por um intervalo de 20ms sendo todos alocados nos últimos 80ms de cada segundo (burst).
- Não periódico (NP) LH: Intervalo entre os pulsos escolhidos de forma aleatória, respeitando-se um intervalo mínimo de 20ms entre pulsos, gerando uma distribuição linear (LH- distribuição linear no histograma).
- NP-IH: intervalo entre os pulsos escolhidos de forma aleatória, respeitando-se um intervalo mínimo de 20ms entre pulsos, gerando uma distribuição exponencial (IH- distribuição exponencial no histograma).

Os padrões periódicos e *burst*, foram construídos no programa *AdobeAudition* 1.0 e os padrões LH e IH no programa *Matlab*® R2007b.

Na figura 1 pode-se perceber, à esquerda, a distribuição em um histograma dos intervalos entre os pulsos (IPIs) dos quatro tipos de padrões e à direita a típica distribuição temporal de cada.

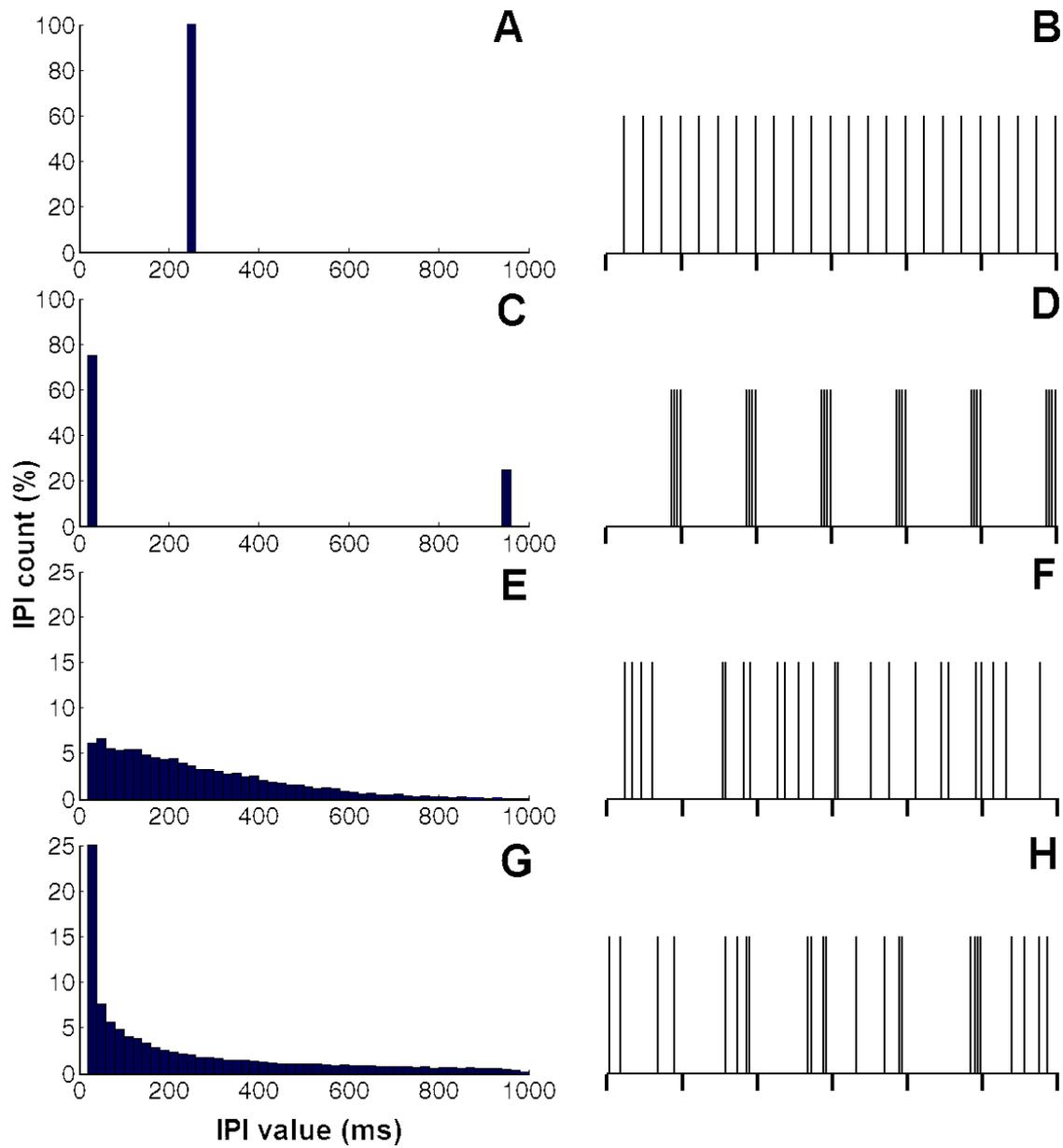


Figura 01: ratos foram estimulados com dois ou mais dos quatro padrões temporais de distribuição dos pulsos. Em ordem decrescente, Periódico (A, B), *Burst* (C, D), NP-LH (E, F) e NP-IH (G, H). Coluna da esquerda, histograma dos intervalos entre os pulsos (IPI) e coluna da direita tipificação da distribuição temporal de cada grupo.

### 3.2 - Estimulador

O estimulador usado nos experimentos foi desenvolvido no próprio Núcleo de Neurociências pelo Professor Doutor Márcio Flávio Dutra Moraes e o doutorando João Nietzsche. Além de um circuito elétrico, alimentado por baterias (com o intuito de desacoplar o sistema da rede elétrica), é composto também de um aparelho de MP3 player cuja finalidade é acionar o sistema por meio de uma trilha sonora com a distribuição temporal de cada grupo.

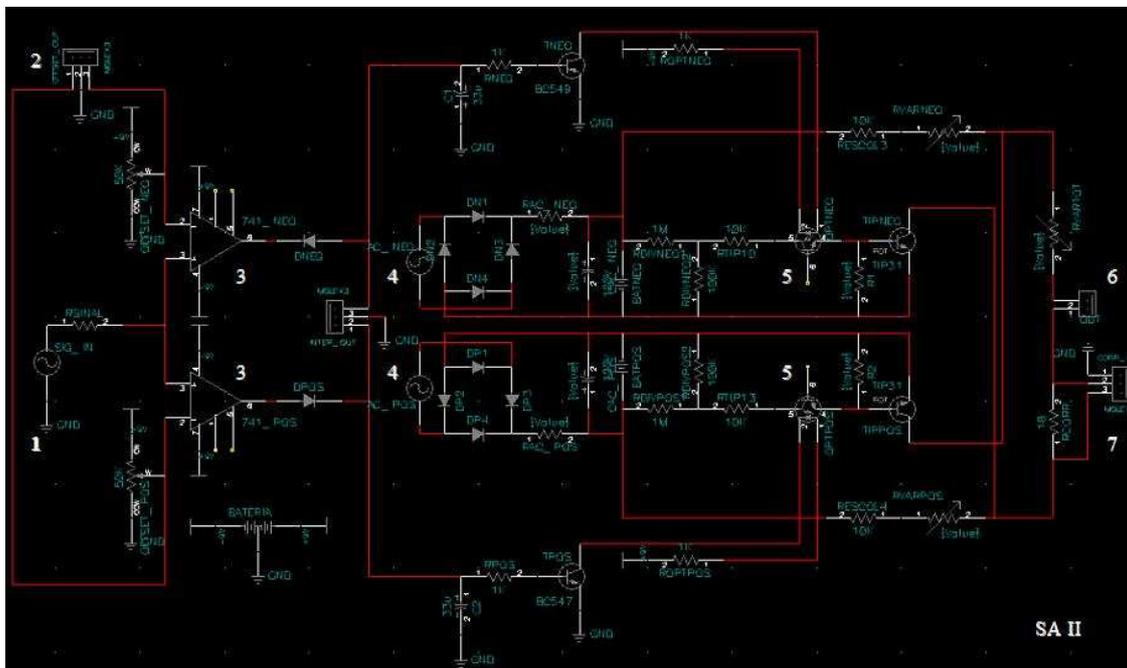


Figura 02: esquemático do estimulador usado nos experimentos. Os números indicam as partes principais do aparelho, sendo 1: MP3 player; 2: baterias de 9V; 3: amplificadores; 4: circuito retificador de corrente; 5: desacopladores ópticos; 6: Saída do sinal; 7: 4 baterias de 9V.

## **4 - Diferentes padrões temporais de estímulos elétricos em amígdala de ratos submetidos ao protocolo de PTZ**

### ***4.1 - Considerações iniciais***

O uso de eletroestimulação para modulação e supressão de crises epiléticas é usado rotineiramente em estudos e tratamentos clínicos, como já foi dito anteriormente. Porém, ainda há resultados conflitantes quando se tem como variável o parâmetro da frequência dos pulsos elétricos. Tende-se a um consenso em relação aos estímulos de alta frequência, superiores à frequência de oscilação basal da estrutura, indicando que estes têm um poder de supressão das crises por inativação da rede neural (GWINN, 2004). Porém, resultados conflitantes surgem a respeito de estímulos de baixa frequência. Velisek e cols (2002) usaram estímulo de 1-3Hz um segundo após indução de abramento elétrico na amígdala e verificaram que houve um aumento na latência para começo das crises espontâneas. Em contrapartida, Mirski e cols (1997), compararam estímulos de alta e de baixa frequência em estruturas talâmicas, e verificaram que estímulos de alta frequência, assim como esperado, são anti-convulsivantes e de baixa, pró-convulsivantes.

Em nosso estudo utilizamos estímulos de baixa frequência, que tendem, segundo a literatura, a ser pró-convulsivantes. A hipótese é de que mudanças na codificação temporal induziriam diferentes comportamentos na rede neural no momento da indução da crise, modificando a latência para o início desta no modelo de crise epilética de pentilenotetrazol.

O esperado foi que os estímulos periódicos entrassem em ressonância com a frequência normal de oscilação da rede, amplificando essa oscilação, facilitando a sincronização neural e adiantando o início das crises. Já os estímulos não periódicos teriam um efeito dessincronizante, pois impediriam a amplificação da oscilação da rede neural realizada pelo PTZ, tendo um efeito final de aumento da latência para o início da crise.

Os estímulos foram aplicados na amígdala direita dos animais. Essa estrutura foi escolhida por ser requisitada tanto em crises límbicas, quanto de crises de tronco (EELLS, 2004).

## **4.2 - Metodologia**

Setenta e quatro (74) ratos Wistar machos, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, pesando entre 250 a 300g, foram divididos em cinco grupos de acordo com os padrões de estímulo:

- Ausência de estímulo/Controle – n=26
- Periódico – n=19
- *Burst* – n=6
- Não-Periódico (NP) LH – n=9
- Não-Periódico (NP) IH – n=14

Para garantir a homogeneidade da amostra, foi avaliado o peso médio dos animais e não foi encontrado diferença significativa entre os grupos (controle:  $\pm 262,6$ ; periódico:  $\pm 253,2$ ; burst:  $\pm 244,5$ ; NP-LH:  $\pm 253,3$ ; NP-IH:  $\pm 269,2$ ).

Todos os animais foram submetidos à cirurgia de implante de eletrodos profundos na amígdala. O procedimento iniciou com a anestesia do animal utilizando-se de Ketamina e Xylasina (numa proporção de medida de 1 de ketamina para 0,7 de xylasina, sendo as concentrações da solução estoque de 10g/100ml e 2g/100ml respectivamente), numa dose de 0.10 mL/100 g de peso animal. Foi utilizado também pentabiótico Baytril® na dose 5,0 mg/kg, como medida profilática contra infecções. Após tricotomia da cabeça e as devidas medidas de assepsia, o animal foi posicionado em aparelho estereotático modelo Stoelting e foi injetado com Lidocaína subcutâneo na região intra-auricular. A lidocaína é anestésico local e vasoconstritor, que também serve de emulsificador do material subcutâneo. Foi realizada uma incisão elíptica com centro à altura da linha intra-auricular anterior e removeu-se a gordura subcutânea limpando-se o osso com salina estéril. Após o osso seco, colocou-se a torre do estereotático e nivelava-se bregma e lâmbda. O ponto de perfuração o crânio foi marcado para inserção do eletrodo em sua

respectiva coordenada: amígdala direita, AP - 2,8 mm, com referência ao bregma, LL 5,0 mm, com referência a linha média, DV -7,2 mm, tendo como referência a dura-máter, coordenadas segundo o Atlas de (Paxinos e Watson, 1986). O eletrodo foi feito de um par de fios de aço (modelo #791400, A-M Systems, CALIFÓRNIA, USA) revestidos com teflon torcidos entre si e fixado no crânio com cimento de zinco e soldado a um conector de telefone (modelo RJ-11 de 6 pinos). Perfurações foram feitas também para a colocação de 3 parafusos de fixação do capacete ao osso parietal. Cobriu-se a superfície óssea e a base do conector com acrílico odontológico.

Imediatamente um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a uma estimulação elétrica de baixa frequência (0,25 Hz) para detecção de um limiar de corrente para uso, arbitrado como a menor amplitude capaz de evocar um comportamento sutil de abalo.

No dia do experimento, o animal foi aquecido durante 5 minutos em uma câmara quente (~45 °C) feita de madeira, com uma lâmpada comum de 100W / 127V como aquecedor, para promover a vasodilatação e facilitar a canulação da veia da cauda. Com as veias caudais facilmente visualizáveis, foi feita a assepsia da cauda com álcool 70% e o cateter (24GA x 0,75” – BD Angiocath™ - Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas LTDA., Juiz de Fora) foi introduzido e fixado com esparadrapo. Foi usada heparina para evitar entupimento por coagulação do cateter. No momento de iniciar a infusão, o cateter foi conectado a uma seringa de 5 ml posicionado na bomba de infusão KDSscientific.

O padrão de estimulação elétrica, sendo os estímulos monofásicos positivos de cem (100) microssegundos de largura e amplitude previamente determinada, variando entre 100 a 300 µA, começou trinta segundos antes da infusão da droga. A infusão foi determinada para a uma velocidade de 1ml/min de PTZ na concentração de 10mg/ml.

O animal foi colocado em uma caixa de acrílico transparente para que fossem observados seus comportamentos. Foram analisadas as latências para começo da crise mínima, determinada como mioclonia dos membros anteriores (MP), e início da crise máxima, sendo essa, hiperextensão dos membros anteriores e posteriores com flexão da cabeça (CTCG). Como a infusão de PTZ se dá a uma taxa fixa de 10 mg/min, a latência medida para cada comportamento corresponde diretamente à dose de PTZ necessária para evocá-los. O efeito da droga depende, naturalmente, do peso corporal do animal. Portanto

a dose de PTZ foi devidamente normalizada pelo peso, o que se denominou limiar de PTZ para crise mínima e máxima.

O efeito pró ou anti-convulsante de cada tratamento foi verificado comparando-se os valores de limiar de PTZ entre os tratamentos utilizando-se ferramentas estatísticas apropriadas para tal.

Ao término do experimento, os animais foram sacrificados com o procedimento de perfusão transcardíaca, tendo sido antes anestesiados com uretana (140 mg/kg de peso, i. p.) e a posição dos eletrodos foi marcada pela lesão eletrolítica gerada pela passagem de uma corrente de 1 mA por 5 segundos. Os animais foram perfundidos transcardiacamente com salina 0,9% e a seguir com formol a 10%. O cérebro foi extraído e mantido em formol a 10% durante pelo menos 24 horas. Os animais que não sobreviveram, o cérebro foi retirado e mantido em formol a 10% durante no mínimo 48 horas. Posteriormente, as peças foram cortadas em vibrátomo (Modelo Vibratome), com espessura de 75  $\mu$ m e montadas em lâminas gelatinizadas. Após secagem, as lâminas foram coradas com vermelho neutro e observadas em microscópio óptico para determinação dos sítios de registro. O processo de coloração seguiu os seguintes passos: Solução de vermelho neutro (8-10 minutos); Água destilada (1 mergulho); Etanol 70% (45 segundos); Etanol 95% (45 segundos); Etanol 100% (45 segundos); Etanol 100% (45 segundos); Etanol/xilol 1/1 (45 segundos); Xilol (45 segundos). Lâminas montadas com Entellan®.

### **4.3 - Resultados**

Para todos os animais, as duas fases comportamentais, referentes a crises mínimas e máximas, puderam ser distinguidas claramente, ainda que a latência para o início de cada tenha variado bastante, como pode ser notado na tabela 01 que mostra a média da latência, em segundos, para o início das crises.

Tabela 01: Latência para começo dos comportamentos referentes à crise mínima e à crise máxima.

	Controle	Periódico	<i>Burst</i>	NP-LH	NP-IH
Latência(s) p/ Crise Mínima	35,92±6	24,10±7	34,17±7	36,67±13	61,80±4
Latência(s) p/ Crise Máxima	83,42±30	74,20±14	70,17±20	79,78±27	116,16±29

Os resultados obtidos para o limiar de PTZ referentes à crise mínima, tendo-se o início da mioclonia parcial como marcador, são mostrados na figura 03.

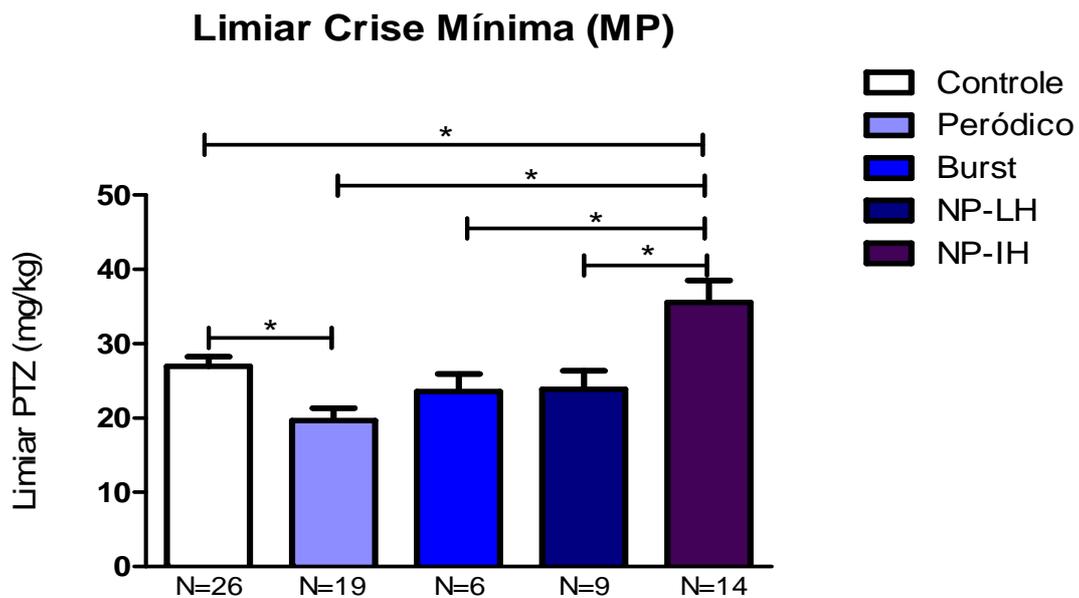


Figura 03: limiar de PTZ para início da crise mínima. Barras com asteriscos unem grupos com diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ . Teste *one way anova*.

Para a comparação das médias dos grupos, usou-se o teste *One Way ANOVA* e Bonferroni como pós-teste.

Para o grupo periódico, foi necessário significativamente menos droga para evocar o comportamento de mioclonia de membro anterior se comparado aos grupos

controle, NP-LH e NP-IH. Porém, não houve diferença significativa entre o grupo periódico e o grupo *burst*.

Já a quantidade de droga necessária para a crise mínima para o grupo NP-IH foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) se comparada aos grupos controle, periódico, *burst* e NP-LH. Não houve diferença significativa entre os grupos controle, *burst* e NP-LH.

Já a média dos limiares de PTZ para a crise máxima para cada grupo pode ser avaliada pela figura 04.

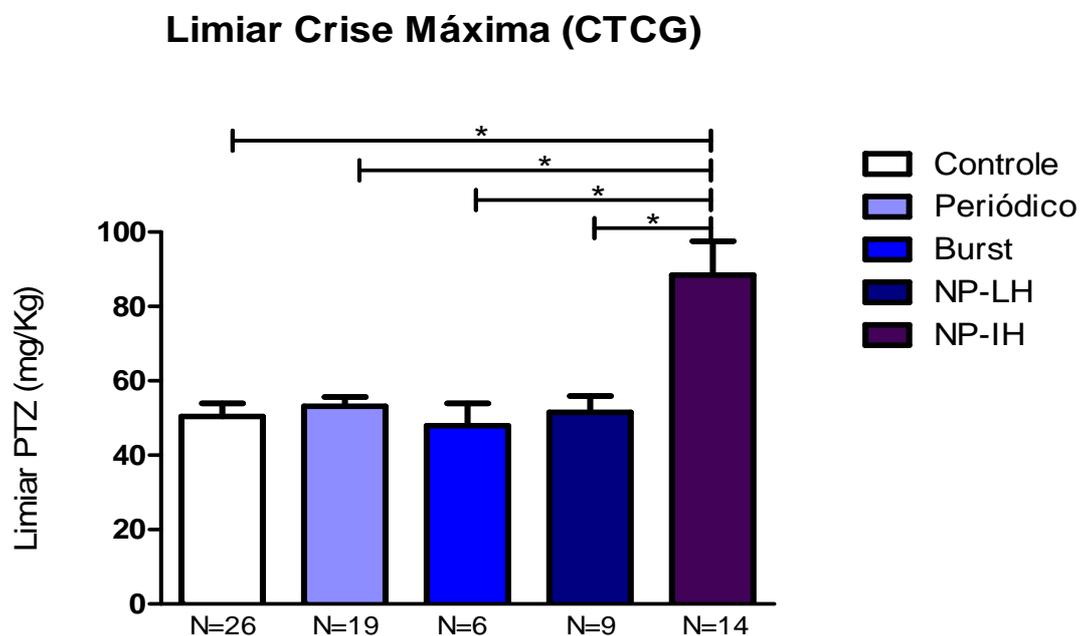


Figura 04: limiar de PTZ para início da crise máxima. Barras com asteriscos unem grupos com diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ .

Os dados foram comparados entre si utilizando-se também o teste *One Way ANOVA*, Bonferroni como pós-teste, e revelaram que foi necessária significativamente ( $p < 0,05$ ) mais droga para que o grupo NP-IH alcançasse o comportamento tônico-clônico generalizado se comparado aos grupos controle, periódico, *burst* e NP-LH. Não houve diferença significativa entre os grupos controle, periódico, *burst* e NP-LH.

Vale salientar que todos esses resultados foram publicados em 2009 na revista *Epilepsy and Behavior* cujo artigo se intitula: *Distinct patterns of electrical stimulation of*

*the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome.* Este artigo se encontra anexado nesta presente dissertação.

### **4.3 - Discussão Parcial**

Estudos matemáticos feitos por Tass e cols (2007) revelaram que estímulos elétricos entregues a uma rede neural na frequência de oscilação da mesma, aumentam a sincronia neuronal. Analisando-se o efeito do estímulo periódico sobre a crise mínima, pode-se chegar à conclusão que esse também foi capaz de aumentar a sincronia neuronal, o que levou a uma significativa redução na latência para começo desta em relação ao grupo controle. Como dito nas considerações iniciais, a estimulação a 4Hz é característica dos disparos epileptiformes com envolvimento do lobo-temporal.

Em contrapartida, o estímulo NP-IH foi capaz de aumentar significativamente a latência para o começo da crise mínima se comparado com o controle. E, provavelmente através das conexões entre amígdala e estruturas de tronco, houve também um retardo significativo para o começo da crise máxima na presença deste padrão de estímulo. Esse resultado difere de alguns encontrados na literatura como nos de Boex e cols (2007) e Mirsk (1997) nos quais estímulos de baixa frequência foram pró-convulsivantes. Porém, esses estudos utilizaram padrões de estímulos com intervalos temporais fixos entre os pulsos (periódicos). Como o padrão de estímulo NP-IH foi construído tomando-se por base a aleatoriedade temporal, este se mostrou anti-convulsivante, provavelmente por um efeito dessincronizante, que retardou o ganho de energia advindo do PTZ.

Para que não houvesse dúvida que seria o padrão temporal de estimulação a influenciar a rede neural e não uma possível inativação por repetidos estímulos em alta frequência (ou melhor, intervalos inter-estímulo muito curtos), um controle foi feito com estimulação em-salvas (i.e. *burst*). Este padrão de estímulo possui intervalo entre os pulsos de 20 ms, análogo a uma estimulação de 50Hz, com quatro pulsos consecutivos posicionados ao final de cada segundo. Não houve diferença entre o grupo estimulado com esse padrão e o grupo controle. Estes resultados corroboram para a hipótese dessincronizante do estímulo NP-IH como mecanismo do efeito anti-convulsivo, uma vez

que a possível inativação neural por salvas em alta frequência não teve efeito na manifestação das crises convulsivas por PTZ.

Apesar de também ser um estímulo não periódico, o padrão NP-LH não influenciou a rede neural o bastante para alterar a latência para começo das crises, ao contrário do padrão NP-IH, se comparado com o grupo controle. Pensamos que esse fato ocorreu por diferenças na distribuição dos intervalos entre pulsos de ambos os estímulos não periódicos. Fazendo-se um gráfico de porcentagem de ocorrência por intervalo entre pulsos (figura 05), vemos que o padrão NP-LH segue uma distribuição linear dos pulsos, enquanto o NP-IH uma exponencial. Isso nos mostra que o primeiro possui menos intervalos entre 20 a 100ms se comparado com o segundo padrão, como pode ser notado no gráfico abaixo.

De fato, é sensato supor que estímulos adjacentes devem ser apresentados com intervalos condizentes com uma resposta em regime permanente, i.e. sem que a rede neural tenha tempo de voltar ao estado inicial pré-estímulo, para que o conjunto de 4 estímulos module, em conjunto, substratos neurais distintos. Em outras palavras, uma “palavra” temporalmente codificada só é interpretada como uma “palavra” se a resposta a um estímulo for dependente do estímulo anterior; caso contrário, a rede neural tomará como nova a próxima estimulação. Um exemplo desta dependência temporal pode ser vista em EHUD (1997) onde padrões temporais das comunicações tálamo-corticais são mais evidentes em intervalos de aproximadamente 100ms. De fato, neurônios corticais podem ser ativados diferentemente por mudança na temporização de estímulos (IKEGAYA, 2004). Desta forma, a ativação inespecífica de várias redes neurais pelo estímulo NP-IH, não favorecendo um circuito específico, promoveu uma dessincronização das estruturas envolvidas na crise convulsiva o que não foi possível com o padrão NP-LH.

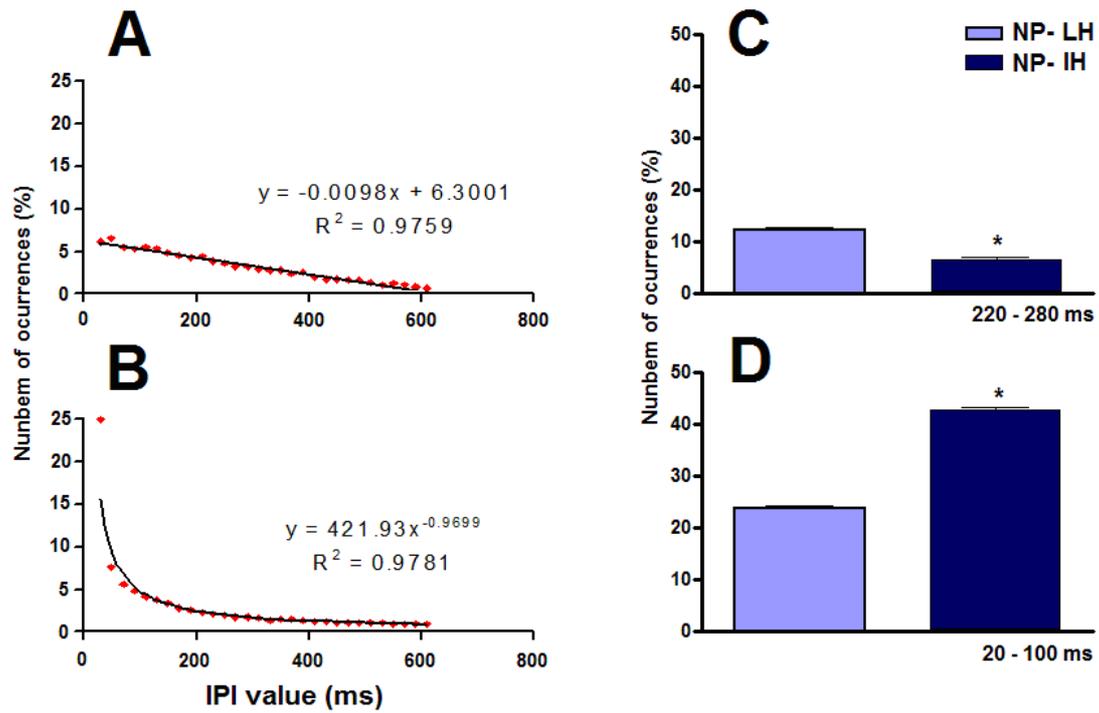


Figura 05: Gráfico A: porcentagem de ocorrência dos IPIs do grupo NP-LH. Gráfico B: porcentagem de ocorrência de IPIs do grupo NP-IH. Gráfico C, porcentagem de ocorrência de IPIs de 220 a 280ms do grupo NP-LH comparado com o grupo NP-IH. Gráfico D, porcentagem de ocorrência de IPIs de 20 a 110ms do grupo NP-LH comparado com o grupo NP-IH. Significância com  $p,0,05$  é indicado pela presença do asterisco.

## **5 - Ressonância magnética funcional para análise do recrutamento neural frente a diferentes padrões temporais de estímulos elétricos**

### **5.1 - Considerações iniciais**

Resultados do protocolo anterior indicaram que o estímulo periódico e o NP-IH tiveram efeito sobre estruturas límbicas, corticais e de tronco, tendo-se como base a latência para o começo dos tipos de crise e relacionando-os com os substratos neurais. Nossa hipótese é que o estímulo periódico entrou em ressonância com a frequência base da amígdala e substratos límbicos, fazendo com que esses ganhassem energia, aumentando a atividade neural. Enquanto o estímulo NP-IH, por seu padrão aleatório, fez com que os mesmos substratos não entrassem em ressonância com a frequência base, dessincronizando-os.

Para testar essa hipótese, desenhamos o protocolo seguinte no Brasil e o Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes o efetivou no *King's College London*, Inglaterra. Por esse protocolo, foi verificada a atividade neural de ratos wistar anestesiados utilizando aparelho de ressonância magnética mediante ação dos padrões temporais de estímulos na ausência e presença de infusão de PTZ. Foi pensado que com esse protocolo houvesse a confirmação da hipótese citada, pois, se o estímulo periódico realmente fornecesse energia ao sistema neural, a atividade neural aumentaria, e se o estímulo NP-IH fosse realmente dessincronizante, veríamos uma diminuição desta atividade, por não permitir que o sistema neural ganhasse energia.

### **5.2 - Metodologia**

#### **5.2.1 - Parâmetros de aquisição de imagens de RM**

Foram obtidas imagens seqüenciais sensíveis à T1 (TR=750ms; TE=11ms) através de seqüência de gradient-echo multi-echo, com aquisição seqüencial de volumes

completos (40 fatias, matriz=128x128 pixels, voxel=0,25x0,25x0,6 mm) de ratos wistar anestesiados com uretana (140g/kg). O experimento foi realizado em dois momentos. No primeiro, foram realizadas imagens em 20 ciclos de 1 minuto, sendo 40s de silêncio e 20 segundos de estímulo, sendo os estímulos (periódico e NP-IH) apresentados de forma randômica, como mostrado no desenho esquemático (figura 06). Posteriormente foram comparadas as imagens no período de estímulo com o período de silêncio.

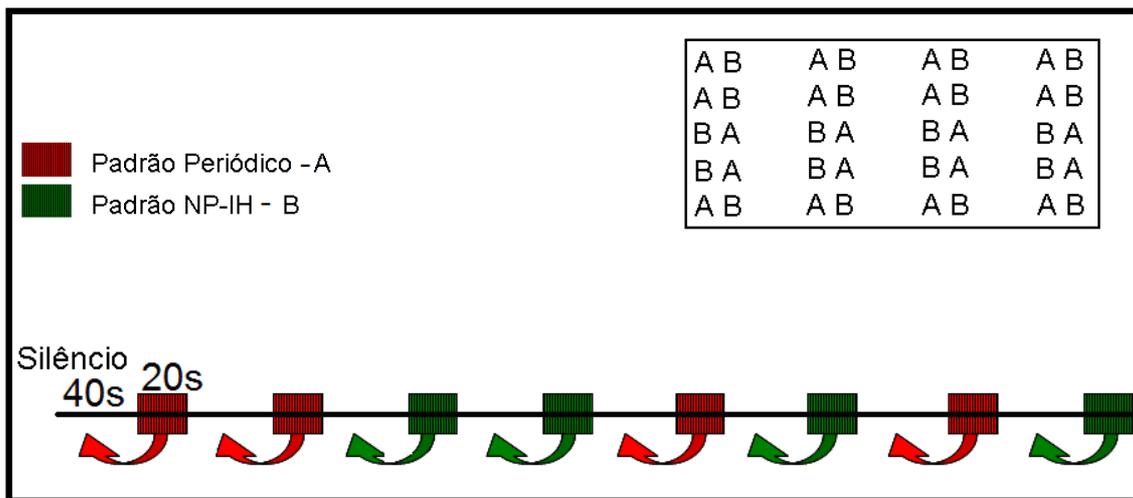


Figura 06: desenho esquemático dos 20 ciclos de silêncio – estímulo nos quais as imagens de RMf foram captadas de ratos wistar machos anestesiados com uretana (140g/kg).

No segundo momento, foram realizadas imagens dos animais durante 16 min, sendo o primeiro minuto de silêncio e os 15 restantes variando de acordo com o grupo experimental, sendo eles, somente infusão de PTZ (40mg/ml/0,1min), infusão de PTZ (40mg/ml/0,1min) concomitante a estímulo periódico e infusão de PTZ (40mg/ml/0,1min) concomitante a estímulo NP-IH. Posteriormente foram comparadas as imagens dos 15 min com o período de silêncio intragrupo, como mostrado no desenho esquemático (figura 07).

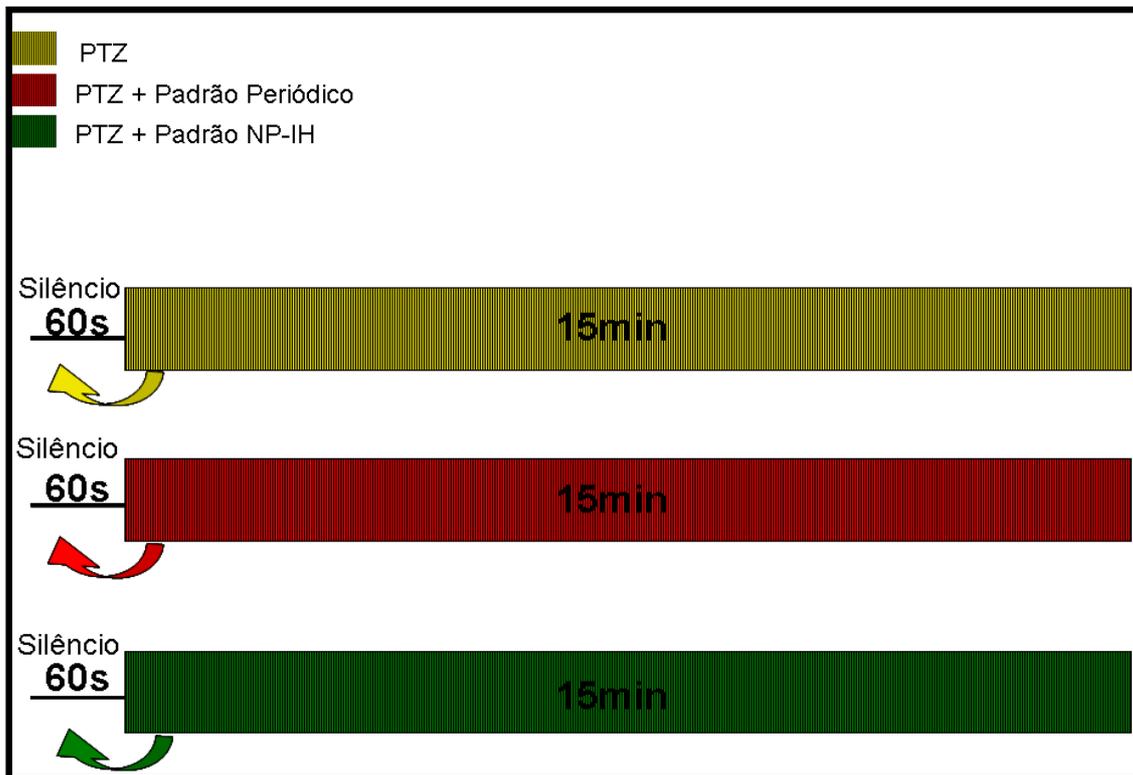


Figura 07: desenho esquemático dos períodos de silêncio e experimentais nas quais as imagens de RMf foram captadas.

Nossa expectativa foi de que o padrão periódico apresente maior recrutamento de áreas ipsilaterais e adjacentes ao eletrodo de estimulação; enquanto a estimulação não periódica NP-IH deve mostrar um menor grau de atividade metabólica ipsilateral ao estímulo. Estes resultados são um “proof of concept” do efeito do padrão temporal de estimulação elétrica sobre a excitabilidade neural.

### **5.2.2 - Análise de imagens 1,4g/kg**

Imagens de um mesmo animal foram inicialmente re-alinhadas, de forma a remover pequenos movimentos ocorridos durante o experimento. Em seguida, as imagens foram mascaradas, com pixels localizados fora do cérebro substituídos por zeros. Finalmente, todas as imagens de todos os animais foram espacialmente normalizadas, tomando como referência uma imagem padrão do encéfalo (criada através da média de todas as imagens), de forma a corrigir pequenas variações anatômicas entre os animais e permitir a comparação entre os mesmos. Após normalização, análise estatística foi realizada de forma a detectar diferenças entre os períodos sem estimulação elétrica e aqueles com diferentes padrões temporais de estimulação. Foram comparadas imagens dentro de um mesmo animal e depois feita a estatística com todo o grupo. Todo o pré-processamento e análise estatística foi realizada através do programa freeware SPM5 (*The Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, Institute of Neurology, University College London*) e rotinas de Matlab® desenvolvidas em nosso laboratório.

### **5.3 - Resultados**

Imagens realizadas na presença dos padrões temporais de estímulos sem infusão de PTZ em ratos anestesiados mostraram que houve um aumento na atividade da amígdala ipsilateral, evidenciada pela marcação vermelha da estrutura, aos estímulos periódico e NP-IH.

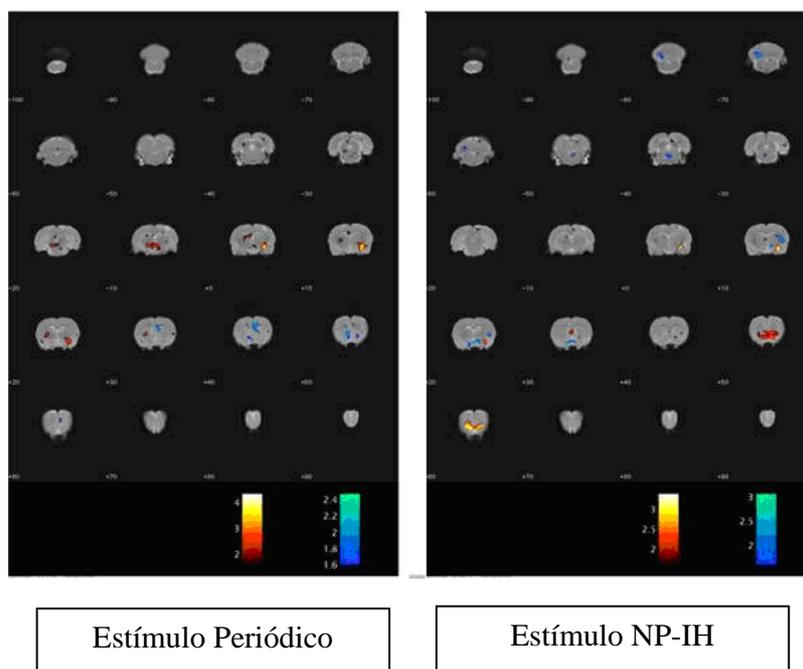


Figura 08: imagens referentes à atividade neural perante diferentes padrões temporais de estímulos elétricos. Maior atividade é mostrada com cores mais avermelhadas e menores, por cores azuis. Nota-se aumento da atividade da amígdala somente nos estímulos periódico e NP-IH.

Posteriormente foram analisadas as atividades neurais dos animais perante infusão de PTZ, PTZ e estimulação elétrica periódica e PTZ concomitante estimulação NP-IH.

Perante somente a infusão e PTZ, nota-se um aumento da atividade neural de todo o encéfalo, visíveis pelas extensas áreas marcadas de vermelho. Porém nota-se ainda uma maior área marcada com vermelho nos animais do grupo PTZ concomitante com estímulo periódico, principalmente ipsilateral ao eletrodo. Essa marcação abrangeu desde estruturas de tronco, parietais e temporais, incluindo estruturas límbicas.

Já perante infusão de PTZ e estímulo NP-IH, nota-se uma maior área de baixa atividade neural, marcada em azul, se comparada com PTZ e PTZ-periódico, principalmente estruturas mais posteriores, como na região do tronco. E mesmo em estruturas das áreas parietais, temporais e límbicas, nota-se uma menor atividade se comparadas aos grupos PTZ e PTZ-periódico, principalmente nas regiões ipsilaterais ao eletrodo.

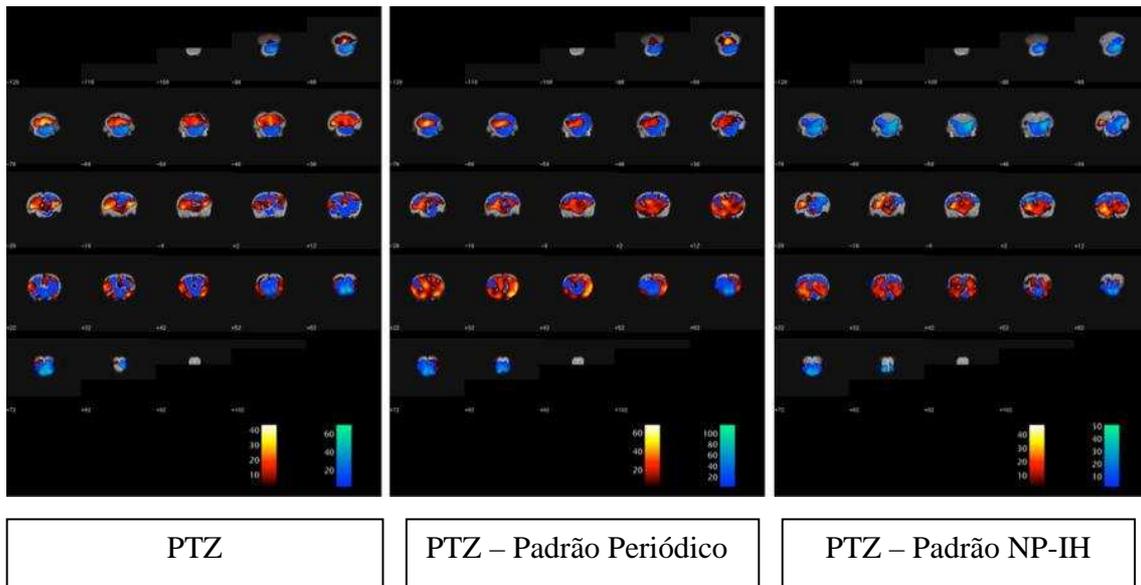


Figura 09: imagens referentes à atividade neural perante infusão de PTZ, PTZ e estímulo periódico, PTZ e estímulo NP-IH. Maior atividade é mostrada com cores mais avermelhadas e menores, por cores azuis. Nota-se aumento da atividade perante infusão de PTZ e PTZ-periódico e menos atividade no grupo PTZ-NP-IH

#### **5.4 - Discussão Parcial**

Em relação à primeira etapa do experimento, nota-se uma maior atividade amigdaliana quando há os estímulos periódico e NP-IH. Esse fato indica que os estímulos foram eficazes em aumentar a atividade de um considerável número de células no complexo amigdalóide, o que corrobora com o trabalho de eletroestimulação profundo analisado por ressonância magnética funcional como o estudo de Canal e cols (2008). O padrão NP-IH, apresentou uma maior marcação de estruturas anteriores, ventro-frontais que compreendem o Núcleo Accumbens. Em contrapartida, o estímulo periódico parece ter ativado diferencialmente estruturas hipotalâmicas peri-ventriculares. A resolução anatômica das imagens por RMf não permite delimitar precisamente os núcleos envolvidos, contudo, é interessante que exista atividade específica fora do locus de estimulação e, ainda, que as demais estruturas envolvidas dependam do padrão temporal de estimulação.

Na segunda etapa, um aumento da atividade quando há a infusão de PTZ já era esperada, pois essa é uma droga que diminui o tônus inibitório, logo, provocando uma excitação não específica por todo o encéfalo. Esse resultado corrobora os trabalhos que analisam a ação do PTZ por meio de MRf, como estudo de Vam Camp e cols (2002). Neste estudo, os autores notaram um maior contraste de *BOLD* em áreas em que há uma maior densidade de receptores GABA. Em nossos resultados, nota-se um contraste ainda maior (ipsilateral ao posicionamento do eletrodo), principalmente regiões temporais e parietais, quando PTZ foi infundido concomitantemente com estímulo periódico. Esse fato corrobora com a hipótese que padrão periódico de estímulo foi capaz de recrutar mais neurônios provavelmente pelo fato dos estímulos terem entrado em ressonância com a frequência base de oscilação das redes neurais subjacentes, amplificando-as e favorecendo a ampliação da atividade sincrônica.

Em contrapartida, uma diminuição da atividade neural, ipsilateral ao posicionamento do eletrodo, foi observada na região temporal quando PTZ foi fornecido aos animais concomitante com estímulo NP-IH. Essa diminuição também ocorreu em áreas posteriores, principalmente de tronco, assim como em regiões parietais e temporais, incluindo estruturas límbicas. Uma menor atividade da região temporal e estruturas límbicas corroboram o fato do padrão NP-IH de estímulo, resultados do protocolo anterior, ter aumentado a latência para o começo da crise mínima. Provavelmente, esse estímulo foi capaz de dessincronizar, tanto a estrutura alvo, bem como a rede neural ligada a ela, pois impediu um aumento da atividade neural nas estruturas citadas mesmo sob efeito da infusão de PTZ. Além disso, também uma menor atividade de tronco vai ao encontro do resultado de aumento da latência para crise máxima no protocolo anterior. Possivelmente pelas conexões entre amígdala e estruturas de tronco, o estímulo NP-IH também foi capaz de agir, dessincronizando essas estruturas mais posteriores.

## **6 - Diferentes padrões temporais de estímulos elétricos em núcleo anterior de tálamo de ratos submetidos ao protocolo de PTZ**

### **6.1 - Considerações iniciais**

O tálamo já vem sendo utilizado como alvo para estimulação elétrica desde 1979 com trabalhos de Cooper (1985). Este estudou crônica estimulação do núcleo anterior do tálamo (ANT) de 6 pacientes, conseguindo uma redução de 60% das crises em cinco deles. Posteriormente, Velasco escolheu outro núcleo talâmico, o centro medial, para seus estudos de eletroestimulação e obteve também ótimos resultados em epilepsias refratárias. Recentemente, a maioria dos trabalhos tem seguido a estrutura escolhida por Cooper, como Lim e cols (2008), Mirsk (2009), Zumsteg (2006) entre outros. Provavelmente pelo fato desse núcleo fazer conexões diretas com estruturas límbicas, e córtex, principalmente lobo temporal (ZUMSTEG, 2006; HALPERN, 2008) e como epilepsia de lobo temporal é um alvo do nosso estudo, o ANT foi também o núcleo escolhido no experimento que se segue.

Apesar de um dos objetivos ser verificar a eficácia dos nossos padrões de estímulos elétricos como anticonvulsivante, assim como os trabalhos anteriormente citados, nosso principal objetivo na verdade foi testar se outra estrutura conseguiria discernir a diferença entre os estímulos, assim como a amígdala no protocolo anterior. Como o tálamo é também uma estrutura límbica e, principalmente, é mais uma via de passagem do que uma estrutura integradora de informações, foi escolhido por esperarmos que não reconhecesse os padrões, gerando assim um resultado semelhante entre os estímulos.

Os padrões de estímulos usados foram apenas o periódico e o NP-IH, pois foram esses que diferiram do controle significativamente no protocolo anterior, não sendo assim usados os estímulos burst, nem NP-LH.

Mudanças em relação também a amplitude dos estímulos foram feitas, pois o ponto de corte arbitrado no protocolo anterior, que foi a presença de um abalo motor, não

foi usado devido ao fato da estreita ligação tálamo-cortical e logo, podendo apresentar qualquer alteração motora a baixíssimos valores de corrente. Portanto, fixamos a corrente em 300 microamperes para todos os animais.

## **6.2 - Metodologia**

Vinte e um (21) ratos Wistar machos, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, pesando entre 234 a 300g, foram divididos em três grupos de acordo com os padrões de estímulo:

- Ausência de estímulo/Controle – n=9
- Periódico – n=6
- Não-Periódico (NP) IH – n=6

Para garantir a homogeneidade da amostra, foi avaliado o peso médio dos animais e não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (controle:  $\pm 275,9$ g; periódico:  $\pm 272,3$ g; N-IH:  $\pm 266,0$ g).

Todos os animais foram submetidos à cirurgia de implante de eletrodos profundos no núcleo anterior do tálamo (NAT). O procedimento iniciou com a anestesia do animal utilizando-se de Ketamina e Xylasina (numa proporção de medida de 1 de ketamina para 0,7 de xylasina, sendo as concentrações da solução estoque de 10g/100ml e 2g/100ml respectivamente), numa dose de 0.10 mL/100 g de peso animal. A solução foi injetada intraperitoneal, repetida metade da dose inicial de 30 em 30 minutos até o término da cirurgia (FLECKNELL, 1996). Foi utilizado também pentabiótico Baytril® na dose 5,0 mg/kg, como medida profilática contra infecções. Após tricotomia e as devidas medidas de assepsia, o animal foi posicionado em aparelho estereotáxico modelo Stoelting e injetado com Lidocaína, anestésico local, vasoconstritor, que também serve de emulsificador do material subcutâneo. Foi realizada uma incisão elíptica com centro à altura da linha interauricular anterior e removeu-se a gordura subcutânea limpando-se o osso com salina estéril. Após o osso seco, colocou-se a torre do estereotáxico e nivelava-se bregma e lâmbda. O ponto de perfuração o crânio foi marcado para inserção do eletrodo em sua respectiva coordenada: amígdala direita, AP – 1,3 mm, com referência ao

bregma, LL<sup>-</sup> 1,6 mm, com referência a linha média, DV -5,5 mm, tendo como referência a dura-máter, coordenadas segundo o Atlas de (PAXINOS e WATSON, 1986). O eletrodo foi feito de um par de fios de aço (modelo #791400, A-M Systems, CALIFÓRNIA, USA) revestidos com teflon torcidos entre si e fixado no crânio com cimento de zinco e soldado a um conector de telefone (modelo RJ-11 de 6 pinos). Perfurações foram feitas também para a colocação de 3 parafusos de fixação do capacete ao osso parietal. Cobriu-se a superfície óssea e a base do conector com acrílico odontológico.

A localização dos eletrodos foi verificada pelo procedimento histológico que revelou o posicionamento correto dos eletrodos em sua grande maioria. Nos outros casos, os animais foram eliminados da análise estatística.

No dia do experimento, o animal foi aquecido durante 5 minutos em uma câmara quente (~45 °C) feita de madeira, com uma lâmpada comum de 100W / 127V como aquecedor, para promover a vasodilatação e facilitar a canulação da veia da calda. Com as veias caudais facilmente visualizáveis, foi feita a assepsia da cauda com álcool 70% e o cateter (24GA x 0,75” – BD Angiocath™ - Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas LTDA., Juiz de Fora) foi introduzido e fixado com esparadrapo. Foi usada heparina para evitar entupimento por coagulação do cateter. No momento de iniciar a infusão, o cateter foi conectado a uma seringa de 5 ml posicionado na bomba de infusão KDSscientific.

O padrão de estimulação elétrica, sendo os estímulos monofásicos positivos de cem (100) microssegundos de largura e trezentos (300) microamperes de amplitude para todos os animais, começou trinta segundos antes da infusão da droga. A infusão foi determinada para a uma velocidade de 1ml/min de PTZ na concentração de 10mg/ml.

O animal foi colocado dentro de uma caixa de acrílico transparente para que seus comportamentos fossem observados. Foram analisadas as latências para começo da crise mínima, determinada como mioclonia dos membros anteriores (MP), e para o início da crise máxima, sendo essa, hiperextensão dos membros anteriores e posteriores com flexão da cabeça (CTCG). Como a infusão de PTZ se dá a uma taxa fixa de 10 mg/min, a latência medida para cada comportamento corresponde diretamente à dose de PTZ necessária para evocá-los. O efeito da droga depende, naturalmente, do peso corporal do

animal. Portanto a dose de PTZ foi devidamente normalizada pelo peso, o que se denominou limiar de PTZ para crise mínima e máxima.

O efeito pró ou anti-convulsivante de cada tratamento foi verificado comparando-se os valores de limiar de PTZ entre os tratamentos utilizando-se ferramentas estatísticas apropriadas para tal.

Os procedimentos para fixação dos cérebros em formol, bem como os cortes histológicos e sua coloração, seguiram os mesmos passos do primeiro protocolo.

### **6.3 - Resultados**

Assim como no primeiro protocolo, os comportamentos característicos, tanto da crise mínima quanto da máxima, foram claramente observados. A tabela 04 mostra a latência em segundos para o começo de cada crise.

Tabela 02: Latência para começo dos comportamentos referentes à crise mínima e à crise máxima.

	Controle	Periódico	NP-IH
Latência(s) p/ Crise Mínima	43,89±14	46,00±18	47,17±14
Latência(s) p/ Crise Máxima	82,44±12	107,2±25	112,2±16

Os limiares para a crise mínima podem ser observados na figura 10.

### Limiar Crise Mínima (MP)

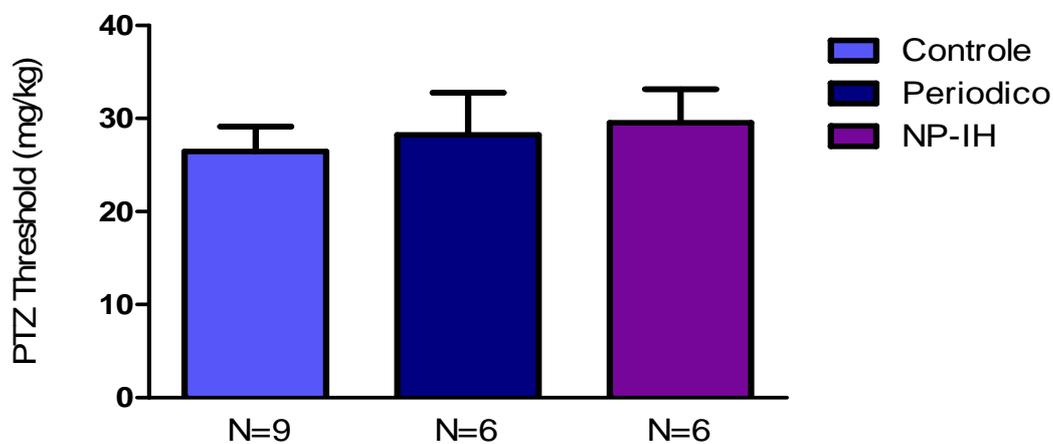


Figura 10: limiar de PTZ para início da crise mínima.

Para comparar as médias das latências de cada grupo foi usado o teste estatístico *One way ANOVA* e Bonferroni como pós-teste. Verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos controle, periódico e NP-IH, como pode ser notado no gráfico 03.

Já a média dos limiares de PTZ para a crise máxima para cada grupo pode ser observada na figura 11.

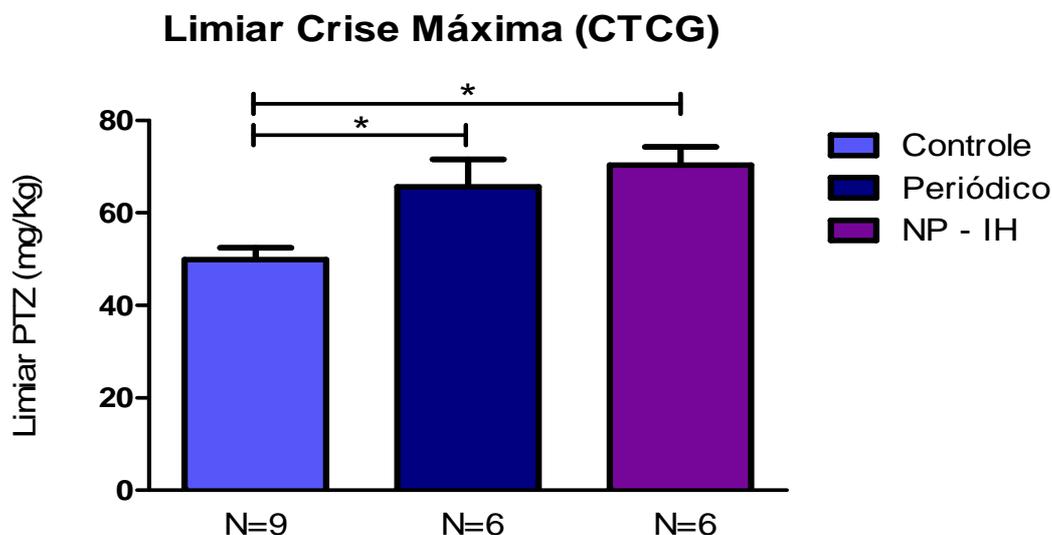


Figura 11: limiar de PTZ para início da crise máxima. Barras com asteriscos unem grupos com diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ .

Os dados foram comparados entre si utilizando-se o teste *One Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni. Verificou-se que ambos os grupos, periódico e NP-IH, foram estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ), evidenciando que os animais desses grupos necessitaram de mais droga para evocar o comportamento de tonia generalizada do que os que não receberam estímulo elétrico profundo na região talâmica. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos periódico e NP-IH. Ambos foram capazes de atrasar o início da crise máxima.

#### **6.4 – Discussão Parcial**

Lim e cols (2007) realizaram estudos crônicos de implante de eletrodos e estímulos no NAT e verificaram uma redução significativa na frequência das crises. Porém, não foram capazes de diferenciar os efeitos da simples inserção do eletrodo daqueles de implante e estímulos elétricos. Ou seja, tanto os pacientes que receberam somente o eletrodo, sem estimulação, quanto àqueles que foram estimulados tiveram redução do número de crises. No modelo animal de PTZ, nossos resultados, a simples inserção do eletrodo não produziu alteração na latência para a crise. Vale lembrar que

todos os animais, mesmo os do grupo controle, passaram pela cirurgia de implante de eletrodos, cujas posições foram posteriormente confirmadas com os cortes histológicos. A aparente contradição com os resultados clínicos pode ser parcialmente explicada por estarmos usando um modelo agudo de epilepsia.

Em nosso estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos com relação à crise mínima (figura 08). Dados contrastantes são encontrados na literatura sobre estímulos a baixa frequência no NAT em relação a essa crise. Mirski e cols (1997) compararam estímulos de alta (100Hz) e baixa (8Hz) frequência em NAT de ratos mediante infusão de PTZ pela veia da calda. Os autores verificaram que estímulos de baixa frequência (8Hz) são capazes de diminuir a latência para começo dessa crise. Já Hamani e cols (2008) compararam estímulos de 20 e 130Hz (ambos nas intensidades de 200, 500 e 1000  $\mu$ A) induzidas por injeções intraperitoneal de pilocarpina e encontraram um aumento significativo na latência em ambas as frequências, nos animais que receberam estímulos na amplitude de 500  $\mu$ A. Apesar da divergência desses resultados, nota-se que tanto Mirski quanto Hamani encontraram diferenças significativas quando estimularam o NAT a baixas frequências, diferindo do nosso resultado para crise mínima. Uma possível explicação é que ambos os trabalhos citados utilizaram estímulos de intensidade superiores a 300  $\mu$ A e, provavelmente, a estimulação no NAT necessite de estímulos numa intensidade superior a esta para que haja uma modulação satisfatória sobre o sistema límbico. Um estudo que corrobora com essa hipótese da pouca influência sobre sistema límbico mediante estimulação no NAT foi feito por Takebayashi e cols (2007). Nesse trabalho foram aplicados estímulos no NAT de ratos concomitantes à indução de crise por ácido caínico. Verificaram, por meio de análise do consumo de glicose, que mediante os estímulos elétricos, há uma diminuição de atividade em córtex (sensório-motor, cíngulo e parietal) e tronco (Gríscea periarquedutal, tegmento do mesencéfalo) em relação ao grupo controle que somente foi induzida a crise. Porém não houve diferença em estruturas límbicas, como amígdala, hipocampo (CA1), giro denteado e córtex entorrinal. Logo, nossos estímulos, periódico e NP-IH, realmente necessitariam de maior amplitude para modificar a sincronidade de disparos neurais em estruturas límbicas, devido à menor modulação do NAT sobre essas estruturas. Porém, a amplitude foi suficiente para que os estímulos aumentassem significativamente a latência

para começo da crise máxima (figura 09), provavelmente pela maior modulação do NAT sobre córtex e tronco, como evidenciado no trabalho citado.

Em contrapartida, como dito na introdução desse protocolo, nosso objetivo maior nesse experimento foi verificar se outra estrutura conseguiria discernir entre os padrões temporais dos estímulos periódicos e NP-IH. E, como esperado, o tálamo não foi capaz de realizar tal tarefa, pois ambos os estímulos foram capazes de aumentar a latência da crise máxima. O tálamo não diferenciou os padrões muito, provavelmente porque é mais uma estrutura passagem do que integradora de informação como a amígdala. Logo, somente redistribuiu as informações passadas pelos estímulos para as áreas com as quais faz conexão e, nessas sim, ambos os estímulos foram capazes de diminuir o sincronismo. Outra possibilidade do não reconhecimento dos padrões temporais de estímulos pode decorrer do fato do tálamo, no modelo de crise convulsiva por PTZ, não ser considerado uma estrutura principal para o desencadeamento da crise, como a amígdala (HANDFORTH, 1995). Logo, se esses mesmos estímulos fossem testados em um modelo no qual o tálamo é uma estrutura central e determinante no processo desencadeador da crise, como modelo de ausência (FOJTIKOVA, 2006; ROBERTX AND ROBSON, 2008; LABATE, 2005) talvez houvesse diferença nos resultados entre os padrões de estímulos, pois esses teriam maior poder de modulatório sobre o sincronismo das redes neurais requeridas em tal modelo. Vale ressaltar que o estímulo NP-IH com o eletrodo posicionado no complexo amigdalóide não só teve efeito anti-convulsivo para a crise mínima quanto a resposta para crise máxima foi quase 2 vezes a do tempo controle. Ou seja, este resultado corrobora com a hipótese de que a dessincronização mais eficaz quando efetuada em estruturas mais intimamente relacionadas à epileptogênese.

## **7 - Diferentes padrões temporais de estímulos elétricos em modelo de pilocarpina**

### **7.1 - Considerações iniciais**

A crise de lobo temporal é um evento gerado predominantemente por estruturas mesiais límbicas que geralmente envolve sintomas dessa área como vômitos, mudanças emocionais (mais comumente medo) e alucinações. É uma crise parcial que pode ou não haver perda de consciência. Se ocorrer, se torna uma crise complexa com automatismos faciais e mioclonia de cabeça e membros (ENGEL JR, 1996).

A principal diferença da epilepsia de lobo temporal das epilepsias cujo foco é o neocórtex é sua freqüente refratariedade aos tratamentos medicamentosos. E sua importância advém do fato de ser uma das mais comuns dentre as epilepsias humanas (ENGEL JR, 1996).

Devido a essa alta refratariedade, novas formas de tratamento, como a eletroestimulação, são de suma importância para prover uma possível alternativa às pessoas que são acometidas dessa síndrome.

Como já foi dito anteriormente, o modelo animal de pilocarpina é particularmente interessante para o estudo das TLE por mimetizar crises espontâneas recorrentes, além de apresentar lesões em determinadas estruturas, assim como na clínica. Logo, verificando a eficácia dos padrões temporais de estímulos que temos, está se testando esses estímulos em uma rede neural naturalmente epiléptica e passível de se, no futuro, transpor para testes clínicos.

Estudos de eletroestimulação utilizando o modelo de pilocarpina já vêm sendo usado, como trabalho de Hamani (2008). Porém, a maioria o faz analisando somente na fase aguda de instalação do modelo, o *status epilepticus* (SE), que na verdade é um estudo de crise epiléptica e não da síndrome em si com presença de crises recorrentes espontâneas.

Em nosso estudo, estímulos elétricos foram aplicados na amígdala direita de ratos que estavam na fase crônica do modelo de pilocarpina, ou seja, mais de 15 dias depois do SE, fase na qual ocorrem as CRE.

Amígdala foi escolhida como estrutura alvo dos estímulos elétricos por ser uma das estruturas do foco das crises límbicas das epilepsias do lobo temporal, assim como hipocampo e córtex entorrinal (CURIA, 2008). Além disso, é sabida sua ampla conexão com diversas estruturas, tanto que disparos ictais advindos da amígdala alcançam diversas áreas, como córtex, substância negra reticulada, hipocampo, núcleo subtalâmico (SHI, 2007). E, principalmente, a amígdala foi uma estrutura capaz de reconhecer os padrões temporais que são usados no nosso estudo, como evidenciado nos resultados anteriores.

Apesar de sabermos que há uma degeneração amigdalar no protocolo de pilocarpina, o que poderia comprometer o experimento, pois os estímulos não alcançariam um número considerável de neurônios, estudos, como o de Kempainen (2004) mostram que as conexões amígdala-hipocampal permanecem ativas, principalmente as de neurônios excitatórios. Logo, pensamos que essa estrutura seria capaz de, além de reconhecer a diferença dos padrões temporais, de transmitir a informação, sincronizante ou dessincronizante às demais estruturas, principalmente hipocampo.

Nosso objetivo com esse protocolo foi verificar, em uma rede neural propensa a desenvolver hipersincronismo, se padrões temporais, periódico e não periódico, de estímulos elétricos poderiam influenciar nas CRE, seja por diminuição ou aumento do número das crises, ou do tempo e até da gravidade das mesmas.

Porém, esse protocolo difere dos demais já feitos nesse trabalho, pois foi um estudo crônico e não agudo como nos anteriores. E em experimentos de estímulos elétricos profundos crônicos, um dos padrões que primeiramente precisa ser configurado é o tempo de estímulo (chamado de tempo *on*) e o tempo de ausência do mesmo (tempo *off*). Diversos padrões já foram testados, como 50, 30 ou 20% de tempo *on* e o restante *off*, e até mesmo 100% *on* (MONTGOMERY, 2008). Nosso objetivo foi escolher um padrão *on* longo o suficiente para dessincronizar a rede e um padrão *off* curto o bastante para que a rede não sincronizasse *per si* e ainda sim não gerasse dano ao tecido por lesão

eletrolítica. Porém, as sincronizações neurais em crises epiléticas podem ocorrer em espaço de tempo muito curto. Tendo em mente que assim que os estímulos dessincronizantes fossem cessados, a rede neural estaria apta a sincronizar-se, e que essa sincronia poderia ocorrer rapidamente, optamos por realizar os estímulos elétricos no padrão 100% *on*.

Outra mudança feita para esse protocolo foi o uso de estímulos bifásicos, pois estímulos monofásicos por longo tempo podem promover eletrodeposição, o que lesaria o tecido neural.

## **7.2 - Metodologia**

Utilizamos 10 ratos Wistar machos provenientes do CeBIO/ICB-UFMG, pesando entre 220 a 280g.

Todos os animais foram submetidos à indução do modelo de epilepsia por pilocarpina. Esse modelo iniciou-se injetando o inibidor colinérgico periférico, via IP, (não atravessa a barreira hemato-encefálica) butilescopolamina (Buscopan®) na dose de 1 mg/kg para a proteção contra efeitos periféricos da pilocarpina. Trinta minutos após, injetou-se pilocarpina, também via IP, na dose de 320 mg/kg para a indução de status epilepticus (SE). Noventa minutos após o começo do SE, injetou-se Diazepam, via IP, (20 mg/kg) para interrupção de SE. Ratos que não desenvolveram SE 30 minutos após injeção de pilocarpina receberam mais 40% da dose. Animais que não entraram em SE após dose adicional foram rejeitados do grupo. Foi necessário um cuidado intenso (até 48 horas depois) para sobrevivência do grupo experimental, principalmente através de re-hidratação cuidadosa dos animais que passaram a sofrer de afagia e adipsia severas. Administraram-se 0,5 ml Pedyalite com leite condensado a cada duas horas via oral e 2 ml de salina via i.p. logo após modelo, antes do fim do expediente e logo após início do expediente do dia seguinte.

Após quarenta e cinco (45) dias do SE, todos os animais foram submetidos à cirurgia de implante de eletrodos profundos na amígdala. O procedimento iniciou com a anestesia do animal utilizando-se de Ketamina e Xylasina (numa proporção de medida de

1 de ketamina para 0,7 de xylasina, sendo as concentrações da solução estoque de 10g/100ml e 2g/100ml respectivamente), numa dose de 0.10 mL/100 g de peso animal. A solução foi injetada via intraperitoneal, repetida metade da dose inicial de 30 em 30 minutos até o término da cirurgia (FLECKNELL, 1996). Foi utilizado também pentabiótico Baytril® na dose 5,0 mg/kg, como medida profilática contra infecções. Após tricotomia e as devidas medidas de assepsia, o animal foi posicionado em aparelho estereotáxico modelo Stoelting e injetado com Lidocaína, anestésico local, vasoconstritor, que também serve de emulsificador do material subcutâneo. Foi realizada uma incisão elíptica com centro à altura da linha interauricular anterior e removeu-se a gordura subcutânea limpando-se o osso com salina estéril. Após o osso seco, colocou-se a torre do estereotáxico e nivelava-se bregma e lâmbda. O ponto de perfuração o crânio foi marcado para inserção do eletrodo em sua respectiva coordenada: amígdala direita, AP - 2,8 mm, com referência ao bregma, LL 5,0 mm, com referência a linha média, DV -7,2 mm, tendo como referência a dura-máter, coordenadas segundo o Atlas de (PAXINOS e WATSON, 1986). O eletrodo foi feito de um par de fios de aço (modelo #791400, A-M Systems, CALIFÓRNIA, USA) revestidos com teflon torcidos entre si e fixado no crânio com cimento de zinco e soldado a um conector de telefone (modelo RJ-11 de 6 pinos). Perfurações foram feitas também para a colocação de 3 parafusos de fixação do capacete ao osso parietal. Cobriu-se a superfície óssea e a base do conector com acrílico odontológico.

Após cinco dias de recuperação do procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em caixas de acrílico transparente de dimensões 30x30cm com água e comida *ad libitum* e seus comportamentos foram gravados em vídeo por seis horas diárias, nos períodos de dez horas da manhã às quatro horas da tarde, por quatro dias consecutivos. Posteriormente aos 4 dias, os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o padrão de estímulo elétrico:

- Periódico – n=4
- NP-IH – n=6

Os padrões de estímulo foram determinados como bifásicos, de duzentos microssegundos de largura por fase e seiscentos microamperes de amplitude pico a pico.

Novamente o comportamento dos animais foi gravado em vídeo por seis horas, no mesmo período que anteriormente, por quatro dias consecutivos. O padrão de estímulo, de acordo com o grupo, foi fornecido ao animal durante todo o tempo de filmagem, continuamente.

Sendo cada animal controle dele mesmo, foi comparado o número que crises que ocorreram durante o período de filmagem sem o estímulo elétrico profundo com o período no qual o estímulo esteve presente. As crises computadas foram aquelas que alcançaram, no mínimo, o índice de gravidade 3, segundo escala modificada de Racine (1972). Nesta escala, o índice varia de 1 a 5 dependendo do comportamento do animal durante o período de crise epiléptica:

- Índice 1: comportamento de imobilidade, fechamento dos olhos, abalos musculares da orelha e/ou das vibrícias, clonia facial.
- Índice 2: movimentos de flexão e extensão do pescoço associado com severa clonia facial.
- Índice 3: clonia de um membro anterior.
- Índice 3,5: clonia de ambos os membros anteriores sem a presença do movimento de *rearing*.
- Índice 4: clonia de ambos os membros anteriores com presença de *rearing*.
- Índice 4,5: crise clônica generalizada acompanhada de queda para o lado sem presença de *rearing*.
- Índice 5: crise clônica generalizada acompanhada de movimento de *rearing* seguida de queda de costas.

Usando-se essa escala, foi comparado também o índice de gravidade das crises ocorridas nos períodos de estímulo elétrico profundo com seus respectivos controle, no qual os estímulos não estavam presentes, assim como o tempo de duração das crises também em ambos os períodos.

Após todo o período de filmagem, os animais foram sacrificados para a verificação histológica da posição dos eletrodos. Animais cujos eletrodos não alcançaram a estrutura alvo foram retirados das análises estatísticas.

### 7.3 - Resultados

A mediana do número de crises espontâneas ocorridas em 6 animais, com índice de gravidade maior ou igual a 3, nos períodos sem estímulo (grupo controle) e no período com estímulo não periódico (grupo NP-IH) pode ser observada na figura 12.

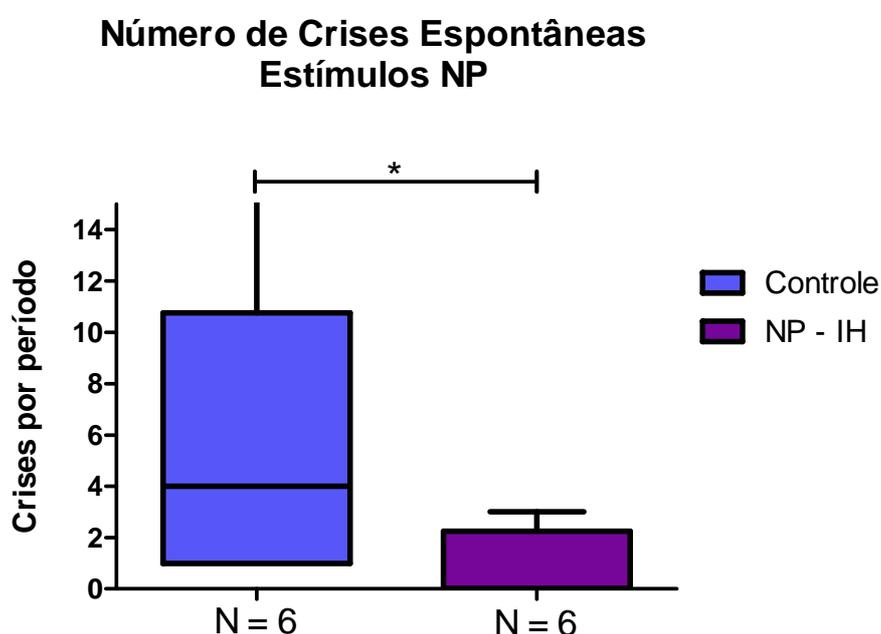


Figura 12: Número de crises ocorridas no período de ausência (controle) e presença de estímulo não periódico (NP-IH) analisadas em 6 animais. Barras com asterisco unem os grupos com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Teste Mann Whitnet.

Esses dados foram analisados utilizando-se o *Wilcoxon Signed Rank* como teste estatístico, e revelou que o número de crises espontâneas, durante o período no qual o estímulo não periódico (NP-IH) estava presente, foi estatisticamente menor que no período sem esse estímulo.

Posteriormente, foi analisado tanto o índice de gravidade das crises quanto o tempo de duração das mesmas. Utilizando-se o teste estatístico *Mann Whitney*, verificou-se que não houve diferença significativa no índice de gravidade das crises espontâneas ocorridas nesses dois períodos, como pode ser notado na figura 13.

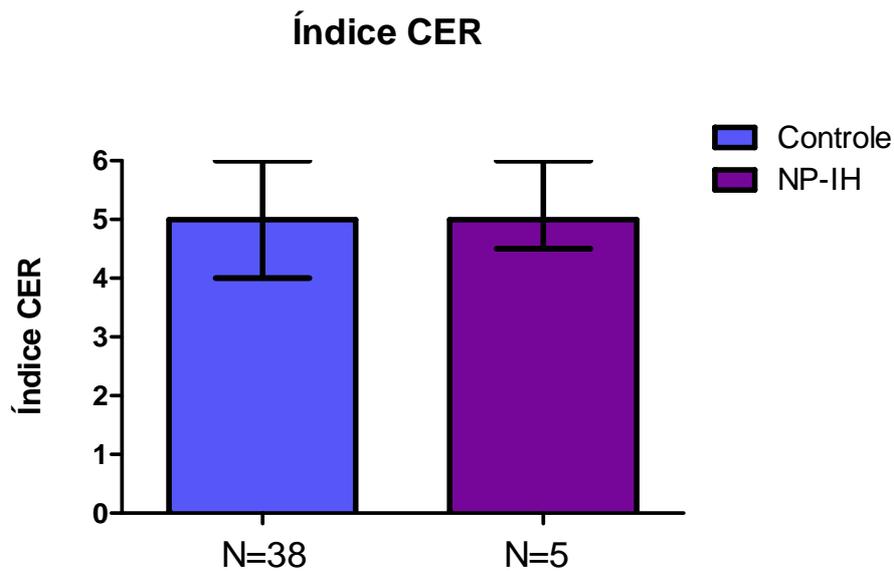


Figura 13: Índice de gravidade das crises ocorridas nos períodos de ausência e presença de estímulo não periódico. Teste estatístico: Mann Whitney.

Porém, analisando-se o tempo das crises ocorridas nos períodos de ausência e presença dos estímulos, tendo como marcador o momento de início da mioclonia de membros anteriores até o término comportamental, verificou-se que o tempo médio das crises no período sem estímulo foi significativamente maior que no período que o estímulo NP-IH estava presente, como pode ser notado na figura 14.

### Tempo Médio das Crises

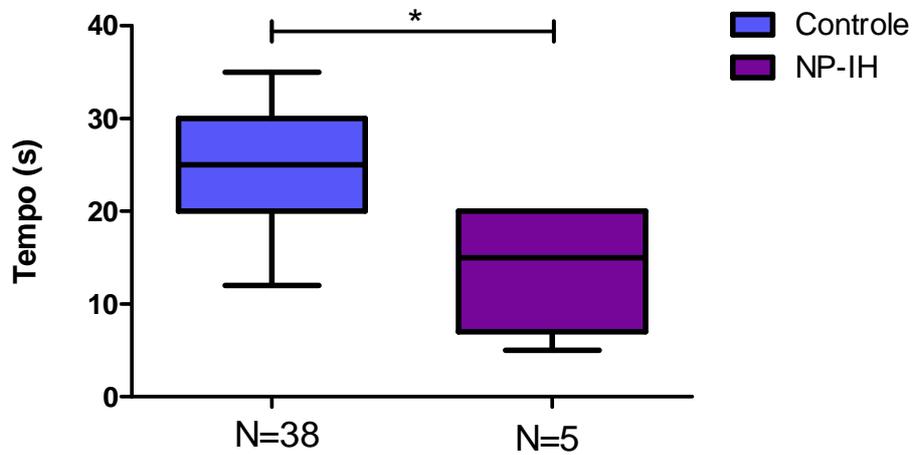


Gráfico 14: Tempo médio de todas as crises no período de ausência (controle) e presença (NP-IH) de estímulo. Barras com asterisco unem grupos com diferença estatística,  $p < 0,05$ . Teste usado: Mann Whitney.

Não houve diferença no número de crises espontâneas ocorridas na presença do estímulo periódico se comparado com o período de ausência do mesmo, como pode ser visto na figura 15.

### Número de Crises Espontâneas Estímulo Periódico

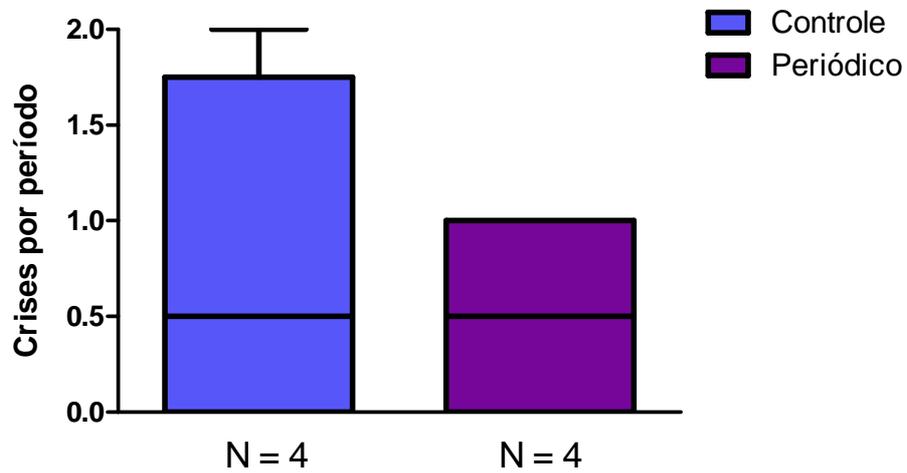


Gráfico 15: Número de crises ocorridas no período de ausência (controle) e presença de estímulo periódico.  
Teste usado: Mann Whitney

Não foi possível analisar o índice das crises espontâneas, nem seu tempo de duração durante o período de teste do estímulo periódico devido a pequena ocorrência, apenas 4 no total, sendo duas crises por grupo.

## **7.4 - Discussão parcial**

Classicamente, a ictogênese tem sido associada ao aumento de excitabilidade neural por muitos autores. Mudanças na rede neural ou no próprio neurônio levam a essa hiperexcitabilidade. Magan (1995) e Lothman (1995) mostraram que, após a indução de um modelo crônico de ELT por kindling elétrico em região hipocampal, os neurônios de CA1 tornam-se hiperexcitáveis. Bertram (1998), seguindo o mesmo modelo de indução de ELT, mostrou que não só neurônios hipocampais, mas também de estruturas como amígdala, córtex entorrinal e piriforme se mostram hiperexcitáveis. Nadler (1980) e Sloviter (1991) mostraram que rearranjos plásticos na rede neural após um insulto levam a mudanças na rede neural hipocampal que aumenta o tônus excitatório em modelo de ELT induzido por ácido caínico. O protocolo de indução de crise recorrente por pilocarpina também há um aumento da excitabilidade. Mello (1996) demonstrou que crises espontâneas geram perda neuronal, principalmente de neurônios inibitórios. Era de se esperar, portanto, que estímulos elétricos, que tem por função excitar as células neuronais, aumentassem ainda mais a excitabilidade neuronal elevando a probabilidade de crises epiléticas. Porém, nossos resultados mostram que o estímulo NP-IH foi capaz de diminuir tanto número quanto a duração de crises espontâneas no modelo crônico de epilepsia (modelo de pilocarpina). Esse padrão de estimulação provavelmente afetou a capacidade de sincronização das redes neurais sem grandes alterações na excitabilidade. Porém, a partir do momento que houve crise convulsiva, mesmo na presença do estímulo NP-IH, provavelmente os mesmos circuitos foram recrutados, pois não foi verificada mudança significativa no índice das crises ocorridas na presença em comparação ao período de ausência do estímulo NP-IH.

Não houve diferença significativa entre ao número de crises ocorridas no período de ausência comparado com o de presença do estímulo periódico. Este resultado pode estar comprometido pelo baixo número de animais analisados (n=4). De fato, esse baixo número da amostra não nos permitiu comparar nem o índice, nem o tempo das crises. Deixa-nos a tarefa de continuar esse estudo para analisarmos se esse estímulo poderia

aumentar a sincronia ao ponto de, além de aumentar o número das crises, também aumentar o tempo de duração das mesmas.

## 8 - Conclusão e Perspectivas

Nossos resultados mostram que mudanças na codificação temporal de estímulos elétricos com mesma energia (i.e. mesmo número de pulsos por segundo) podem influenciar o processo de ictogênese, dependendo da estrutura alvo, de forma anti (estímulo NP-IH) ou pró-convulsivante (estimulação periódica). A explicação para os efeitos antagônicos dos estímulos periódicos e NP-IH está relacionada à característica sincronizante e dessincronizante, respectivamente, dos estímulos utilizados.

Os resultados de RMf corroboraram para os resultados comportamentais relacionados ao aumento de latência no aparecimento de marcadores comportamentais das crises convulsivas. As diferenças entre os padrões de atividade nas imagens por RMf, para diferentes padrões temporais de estimulação elétrica, poderiam ser melhor descritos por técnicas de imunofluorescência utilizando marcadores de alterações plásticas conjugadas com marcadores de atividade metabólica. Este é um dos objetivos do meu projeto no doutorado.

O procedimento de estimulação NP-IH como padrão dessincronizante deveria ser ainda mais eficaz se conjugado a uma estimulação aleatório multi-sítio. Tass (2003) realizou estudo, em simulações matemáticas, no qual eram posicionados 4 eletrodos em diferentes áreas da rede neural artificial sendo que, ativados aleatoriamente, conseguiu uma dessincronização da rede neural. Espera-se, portanto, que a união da técnica multi-sítio com o estímulo NP-IH amplificaria o poder dessincronizante deste padrão de estímulo.

Logo eficácia da estimulação elétrica profunda como medida de controle de crises é também dependente do padrão temporal usado, de tal forma que um estímulo NP-IH, anti-convulsivo, deve ser considerado para uso na prática médica. Porém, seria interessante fornecer esse padrão de estímulo somente em momentos antes da crise convulsiva, para que o tempo de exposição do tecido neural aos estímulos elétricos fosse minimizado. Para isso, tem-se que associar uma metodologia de predição de crise à de abolição. Trabalhos com esse intuito estão sendo realizados, como estudos de Good (2009), cuja estimulação abortiva é fornecida somente instante antes da crise, predita por técnicas não-lineares de avaliação de EEG. O ponto negativo de técnicas de predição por

análise não lineares da dinâmica do EEG é o falso alarme, denominado como predição sem que ocorra a crise em si (ANDRZEJAK, 2009).

Uma metodologia para predição de crise que possivelmente minimizaria o falso alarme, seria aquela que utilizaria a própria amplificação da oscilação da rede neural, que culmina na geração de crise, para predizê-la. Para que ocorra a predição por essa hipótese, pulsos elétricos de baixa frequência (0,5Hz) seriam fornecidos a uma estrutura cerebral como amígdala, concomitante ao registro eletroencefálico de uma área que não possui conexão direta (mono-sináptica) com essa estrutura, como córtex parietal. A partir do momento que a crise se desencadearia, oscilações do sistema seriam amplificadas e os pulsos gerados pelos estímulos elétricos aumentariam seu alcance, passando a ser captado em regiões distantes. Assim, momentos antes da crise, sinais dos pulsos elétricos de 0,5Hz na amígdala que antes não eram captados no EEG córtex parietal, com a amplificação da oscilação da rede, passam a ser, o que seria um ótimo sinal da iminência de instalação de uma crise convulsiva. Assim que os pulsos de 0,5 Hz fossem captados, seriam fornecidos os pulsos anti-convulsivantes (NP-IH), abolindo a crise e minimizando a exposição do tecido aos pulsos elétricos.

De fato, um protocolo piloto seguindo essa metodologia já foi feito. Neste, o animal foi anestesiado com Uretana (140mg/ml na dose de 1ml/100g), teve a veia da calda canulada para infusão de PTZ (40mg/ml/min) e registro de eletroencefalograma foram realizados nos córtex parietais concomitantemente a estímulo de 0,5Hz (monofásicos, 300uA, 100us de largura) na amígdala. Percebe-se pela figura 16 que no início do registro, não há presença do estímulo de 0,5Hz, mas com a contínua infusão de PTZ, este surge cerca de 2 minutos antes de registros encefalográficos de crise. Este protocolo necessita de maiores investigações, que serão realizadas no decorrer do doutorado, mas indicam uma técnica de predição de crise promissora que poderá ser associada ao estímulo NP-IH para aborção das crises.

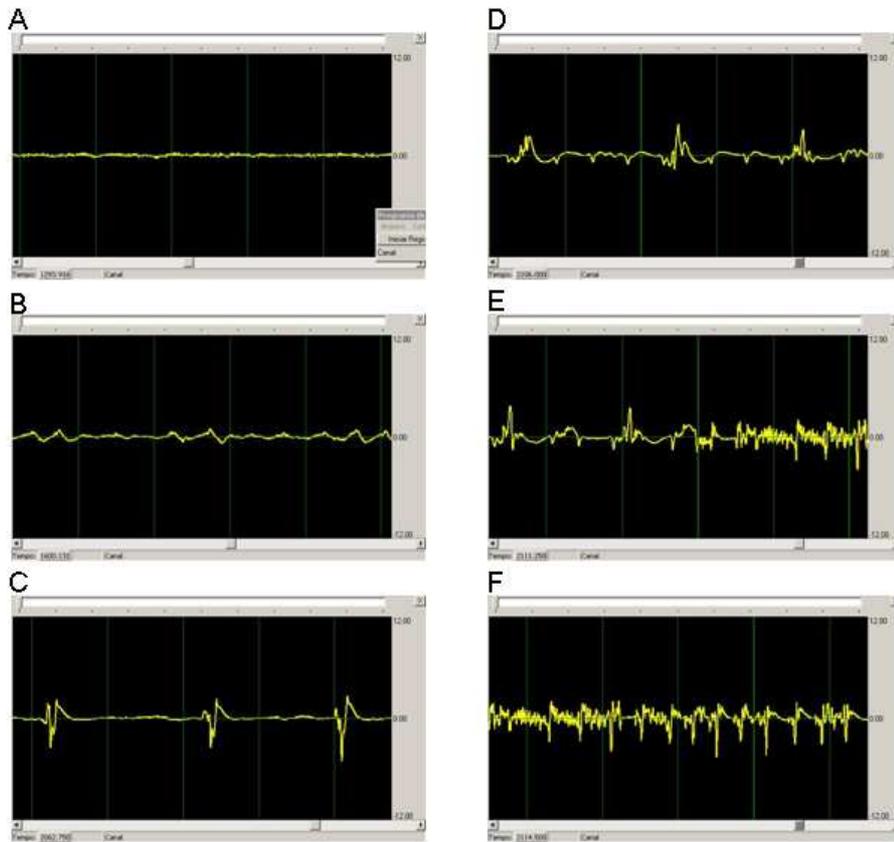


Figura 16: janelas mostram seqüência de EEG de região parietal de rato wistar. A: início da infusão de PTZ (1s). B: 400s do início; C: 800s, nota-se o potencial evocado de 0,5Hz; D: 900s; E: 910 ; F: 920 do início. Nota-se o registro encefalográfico da crise convulsiva.

## 9 - Bibliografia

Beggs, J. M., Plenz, D., 2003. "Neuronal Avalanches in Neocortical Circuits", *The Journal of Neuroscience*. vol 23, 11167–11177.

Ben Menachem, E. 2002, "Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy", *The Lancet Neurology*. vol. 1, 477-482.

Binnie, C. D. 2000, "Vagus nerve stimulation for epilepsy: a review", *Seizure*, vol. 9, 161-169.

Busaki, G., 2002 "Theta Oscillations in the Hippocampus", *Neuron*, vol. 33, 325–340.

Cavalehiro, E.A. 1994. "The pilocarpine model of epilepsy". *Ital. J. Neurol. Sci.* vol. 16, 33-37.

Costa, J. C. d. 2004, "Carbamazepina. O desenvolvimento a partir dos psicotrópicos," in *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, pp. 89-96.

Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S. G., Avoli, M., 2008. "The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy", *Journal of Neuroscience Methods* vol.172, 143–157.

Eells J. B, Clough R. W, Browning R. A and Jope P. C., 2004. "Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylentetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats" *Neuroscience*, Vol 123, 279-292.

Engel, J. J., 1996. "Introduction to temporal lobe epilepsy", *Epilepsy Research*. vol 26, 41 – 150.

Engel, J., 1995. "Concepts of epilepsy". *Epilepsia.*, vol. 36, 23-29.

Ehud A, Sebastian H, Miriam Z., 1997. "Decoding temporally encoded sensory input by cortical oscillations and thalamic phase comparators". *Proc Natl Acad Sci USA* vol. 94, 11633–11638.

Fojtikova D., Brazdil M., Horky J., 2006. "Magnetic resonance spectroscopy of the thalamus in patients with typical absence epilepsy". *Seizure* vol.15, 533–40.

Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Pilato, F., Saturno, E., Dileone, M., Meglio, M., Colicchio, G., Barba, C., Papacci, F., & Tonali, P. A. 2004, "Effects of vagus nerve stimulation on cortical excitability in epileptic patients", *Neurology*, Vol. 62, 2310-2312.

Fisher R.S., Boas W.v.E., Blume W., Elger C., Genton P., Lee P., and Engel J., 2005. "Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)". *Epilepsia*. Vol 46, 470-472.

Flecknell, P. 1996, "Laboratory Animal Anesthesia"; Academic Press, New York.

Kinoshita, M., Ikeda, A., Matsumoto, R., Begum, T., Usui, K., Yamamoto, J., Matsuhashi, M., Takayama, M., Mikuni, N., Takahashi, J., Miyamoto, S., & Shibasaki, H. 2004, "Electric Stimulation on Human Cortex Suppresses Fast Cortical Activity and Epileptic Spikes", *Epilepsia*, Vol. 45, 787-791.

McNamara, J. O. 1994, "Cellular and Molecular Basis of Epilepsy", *The Journal of Neuroscience*, vol14, 3413-3425.

Garzon, E., Jorge, L. C., & Liberalesso, P. B. N. 2004, "Fenitoína. Explorando a estrutura molecular dos barbitúricos," in *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, 77-87.

Guerreiro C.A.M., Guerreiro M.M., Cendes F. Lopescendes I., 2000 Ed, *Epilepsia* Lemos Editorial, São Paulo.

Guerreiro, C. A. M. & Mello, L. E. d. M. 2004, "Fenobarbital. A descoberta a partir do efeito hipnótico," in *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, pp. 71-76.

Guzman, P., D'antuono M. and Avoli M., 2004. "Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal and perirhinal cortices in vitro" *Neuroscience*, Vol. 123, 875-886.

Gwinn, R. P., Spencer, D. D., 2004. "Fighting fire with fire: brain stimulation for the treatment of epilepsy" *Clinical Neuroscience Research*, vol 4, 95-105

Hamani, C., Hodaie, M., Chiang, J., Campo, M., Andrade, D. M., Sherman, D., Mirski M., Mello, L. E., Lozano. A. M., 2008. "Deep brain stimulation of the anterior nucleus of the thalamus: Effects of electrical stimulation on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus", *Epilepsy Research*. vol 78, 117-123

Hammond E. J., Uthman B. M., Reid S. A., Wilder B. J., 1992. "Electrophysiological studies of cervical vagus nerve stimulation in humans: I. EEG effects", *Epilepsia*, vol. 33, 1013-1020.

Halpern, C.H., Samadani, U., Litt, B., Jaggi, J. L., Baltuch, G. H., 2008. "Deep Brain Stimulation for Epilepsy", *Neurotherapeutics*, vol. 5

Handforth, A., Ackermann, R. F., 1995. "Mapping of limbic seizure progressions utilizing the electrogenic status epilepticus model and the 14C-2-deoxyglucose method", *Brain Research Reviews* vol.20,1-23

Hsu, D., Chen, W., Hsu, M., Beggs, J. M., 2008. "An open hypothesis: Is epilepsy learned, and can it be unlearned?", *Epilepsy & Behavior* vol 13, 511–522

Imamura, S. I., Tanaka, S., Akaike, K., Tojo, H., Takigawa, M., & Kuratsu, J. i. 2001, "Hippocampal transection attenuates kainic acid-induced amygdalar seizures in rats", *Brain Research*, vol. 897, 93-103.

Labate, A., Briellmann, R. S., 2005. "Abbott DF, et al. Typical childhood absence seizures are associated with thalamic activation." *Epileptic Disord* vol. 7,373–7.

Leite J. P.; Bortolotto, Z. A.; Cavalheiro E. A. 1990. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosc. Biobehav. Vol. 14*: 511-517,

Lemos T.; Cavalheiro E.A. 1995 Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res.*, vol 102: 423-8.

Lim, S., Lee, S., Tsai, Y., Chen, I., Tu, P., Chen, J., Chang, H., Su, Y., Wu, W., 2008. "Long-term Anterior Thalamus Stimulation for Intractable Epilepsy", *Chang Gung Med J* vol. 31, 287-296

Lothman, E. W., Rempe, D. A., & Mangan, P. S. 1995, "Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy", *Journal of Neurophysiology*, vol. 74, no. 2, 841-848.

Lumer, D. E., Gerald, M., Edelman, T., Giulio, T., 1997, "Neural Dynamics in a Model of the Thalamocortical System. II. The Role of Neural Synchrony Tested through Perturbations of Spike Timing", *Cerebral Cortex*, 228–236.

Kempainen, S., Pitkanen, A., 2004. "Damage to the amygdalo-hippocampal projection in temporal lobe epilepsy: a tract-tracing study in chronic epileptic rats", *Neuroscience* vol. 126, 485–501.

Kudela, P., Franaszczuk, P. J., Bergey, G. K., 2003. "Changing excitation and inhibition in simulated neural networks: effects on induced bursting behavior", *Biological Cybernetics*, vol.88, 276–285.

Mangan, P. S., Rempe, D. A., & Lothman, E. W. 1995, "Changes in inhibitory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy", *Journal of Neurophysiology*, vol. 74, no. 2, 829-840.

Marino Jr, R. 1993, "O Tratamento Cirúrgico das Epilepsias" in *Epilepsia*, 1 edn, C. A. M. Guerreiro & M. M. Guerreiro, eds., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, 183-190.

Mello, L. E, Covolan, L. 1996. "Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpinemodelof chronic spontaneous seizures." *EpilepsyResearch* vol.26,123–9

Miller, E. K., Wilson, M. A., 2008. "All My Circuits: Using Multiple Electrodes to Understand functioning Neural Networks" *Neuron*, vol 60, 483-488.

Mirski, M. A., Rossell, L. A., Terry, J. B., & Fisher, R. S. 1997, "Anticonvulsant effect of anterior thalamic high frequency electrical stimulation in the rat", *Epilepsy Research*, vol. 28, no. 2, pp. 89-100.

Moraes, M. F. D., Mishra, P. K., Jobe, P. C., & Garcia-Cairasco, N. 2005, "An electrographic analysis of the synchronous discharge patterns of GEPR-9s generalized seizures", *Brain Research*, vol. 1046, 1-9.

Montgomery Jr. E. B., Gale, J. T., 2008. "Mechanisms of action of deep brain stimulation (DBS)", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Vol.32, 388–407.

Nadler, J. V., Perry, B. W., Cotman, C. W. 1980, "Selective reinnervation of hippocampal -area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid." *Brain Research*, vol. 182, 1-9.

Pape, C. T., Narayanan, R. T., Smid, J., Stork, O., Seidenbecher, T., 2005. "Theta Activity in Neurons and Networks of the Amygdala Related to Long-Term Fear Memory", *Hippocampus* vol.15, 874–880

Racine, R. 1972, "Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. Afterdischarge threshold", *Electroencephalogr and Clin Neurophysiol*. vol.3, no.32, 269-279.

Roberts, J. A., Robinson, P.A., 2008. "Modeling absence seizure dynamics: implications for basic mechanisms and measurement of thalamocortical and corticothalamic latencies." *J Theor Biol* vol253,189–201.

Ryder P. Gwinn and Dennis D. Spencer, 2004. "Fighting fire with fire: brain stimulation for the treatment of epilepsy" *Clinical Neuroscience Research*. vol.4, 95-105.

Shi, L-H., Luo, F., Woodward, D. J., McIntyre, D. C., Chang, J-Y., 2007. "Temporal sequence of ictal discharges propagation in the corticolimbic basal ganglia system during amygdala kindled seizures in freely moving rats", *Epilepsy Research* . vol.73, 85-97.

Sloviter, R. S., 1991 "Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo." *Hippocampus*. vol.1. 31-40.

Takebayashi, S., Hashizume, K., Tanaka, T., Hodozuka, A., 2007. "Anti-convulsant effect of electrical stimulation and lesioning of the anterior thalamic nucleus on kainic acid-induced focal limbic seizure in rats", *Epilepsy Research*. vol.74, 163-170

Tass, P. T., 2003. "A model of desynchronizing deep brain stimulation with a demand-controlled coordinated reset of neural subpopulations". *Biol. Cybern.* Vol.89, 81–88.

Tass, P. T., Hauptmann, C., 2007. "Therapeutic modulation of synaptic connectivity with desynchronizing brain stimulation", *International Journal of Psychophysiology* vol.64, 53–61.

Taylor, C. P., Dudek, E., 1984. "Excitation of hippocampal pyramidal cells by an electrical field effect". *Journal of neurophysiology*, vol.52, 126-142.

Traynelis, S. F., Dingledine, R., 1988. "Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice." *Journal of Neurophysiol*, vol. 59, 259-276.

Turski, W.A.; Cavalheiro, E.A.; Bortolotto Z.A.; Mello L.M.; Schwarz M.; Turski L., 1984. "Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis". *Brain Research.*, vol.321, 237-253

Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983 "Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study". *Behavioral Brain Research.*, vol 9,315-335.

Upton A. R., Cooper I.S., Springman M., Amin I., 1985. "Suppression of seizures and psychosis of limbic system origin by chronic stimulation of a anterior nucleus of the thalamus". *International Journal Neurological* vol.19–20, 223–230.

Valencia, I., Holder, D. L., Helmers, S. L., Madsen, J. R., & Riviello, J. 2001, "Vagus nerve stimulation in pediatric epilepsy: a review", *Pediatric Neurology*, vol. 25, 368-376.

Velisek L, Kubova, H., Pohl, M., Stankova, L., Mares, P., & Schikerova, R. 1992. "Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, vol. 346, 588-591.

Vonck, K., Van Laere, K., Dedeurwaerdere, S., Caemaert, J., De Reuck, J., & Boon, P. 2001, "The Mechanism of Action of Vagus Nerve Stimulation for Refractory Epilepsy: The Current Status. [Review]", *Journal of Clinical Neurophysiology*, vol. 18, 394-401.

Wasterlain, C. G., Shirasaka, Y., 1994. "Seizures, brain damage and brain development." *Brain & Development*, vol.16, 279-95

Weinstein S., 2001, "The anticonvulsant effect of electrical fields", *Currente Neurological Neuroscience Rep*, vol.1, 155-161.

Woodbury J. W., Woodbury D. M., 1991. "Vagal stimulation reduces the severity of maximal electroshock seizures in intact rats: use of a cuff electrode for stimulating and recording", *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 14, 94-107.

Yacubian, E. M. T. 2005, "Valproato. O amplo espectro de um solvente", *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, 97-113.

Ikegaya, Y., Aaron, G., Cossart, R., Aronov, D., Lampl, I., Ferster, D., Yuste, R., 2004. "Synfire Chains and Cortical Songs: Temporal Modules of Cortical Activity" *Science* vol. 304, 559-564

Zumsteg, D., Lozano, A. M., Wieser, H, G., Wennberg, R, A., 2006. "Cortical activation with deep brain stimulation of the anterior thalamus for epilepsy", *Clinical Neurophysiology* vol.117, 192–207



## Anexo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- CETEA -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 150/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Redes neurais hiperexcitáveis e hypersincrônicas em modelos animais de epilepsia: aspectos da dinâmica temporal de recrutamento neural na epileptogênese**", que tem como responsável **Márcio Flávio Dutra Moraes**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 02/2007**.

Este certificado expira-se em **28/ 02 / 2012**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 150/2006**, related to the project entitled "**Hyperexcitable and hypersynchronous neural networks in animal models of epilepsy: temporal dynamics aspects of neuronal recruitment in epileptogenesis**", under the supervision of **Márcio Flávio Dutra Moraes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 28, 2007**.

This certificate expires in **February 28, 2012**.

Belo Horizonte, 28 de Fevereiro de 2007.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Presidente do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@proq.ufmg.br](mailto:cetea@proq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)

# 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](#)