

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DA POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO EM FATIAS DE HIPOCAMPO
DE RATOS COM PERÍODOS DISTINTOS DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL
INDUZIDA PELA PILOCARPINA**

THIRZÁ BAPTISTA FRISON

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

**Porto Alegre
2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DA POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO EM FATIAS DE
HIPOCAMPO DE RATOS COM PERÍODOS DISTINTOS DE EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL INDUZIDA PELA PILOCARPINA**

THIRZÁ BAPTISTA FRISON

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Neurociências

**Porto Alegre
2003**

“Idéias inteligentes podem levar a um beco sem saída; observações banais podem conduzir à resolução de um problema. Esse é o preço que pagamos pelo fato de a ciência ser um diálogo com a natureza, não um monólogo que possamos desenvolver arbitrariamente.”

Ilya Prigogine, 1996

(Prêmio Nobel de Química em 1977)

Aos meus pais, José e Cenira, pelo amor,
dedicação e confiança que sempre me transmitiram

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao orientador Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa pelo incentivo à pesquisa, pelo exemplo de pesquisador, pelos investimentos em nosso trabalho, pela confiança dispensada, pelos sábios questionamentos;

Ao Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco e sua equipe, em especial, Márcio Moraes Furtado, pelo acolhimento em seu laboratório de pesquisa na USP de Ribeirão Preto, pelos ensinamentos da técnica de neo-Timm, pelas trocas;

Ao Prof. Dr. Julio Velluti, pela recepção em seu laboratório de Neurofisiologia do Instituto Clemente Estable, em Montevideo, para discussão dos registros iniciais;

À colega Dra. Maria Elisa Calcagnotto pelos ensinamentos técnicos, e disponibilidade diante de solicitações emergenciais;

Aos colegas do laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUC-RS: Simone, Gianina, Nicole, Raquel, Andréia, Cristiane, Fabiana, Gisele, Daniela, Fernanda, Juliana, Flávia, Daniel, André, Ricardo, Fabrício, por me receberem como uma irmã, fazendo do laboratório uma extensão de minha residência, pela ajuda nos experimentos, principalmente em relação aos cuidados com os animais, por todos os dias de sol e de tempestade que passamos juntos;

Ao engenheiro eletrônico Paulizan Cardoso por atender emergencialmente todos os problemas que surgiam, pela colaboração;

Ao colega de mestrado e amigo Clauber Janisch por aventurar-se juntamente comigo no estudo da LTP, pelos revezamentos no setup, pela ajuda nas interpretações dos resultados;

Aos colegas Gabriel Arisi, e Dr. Vinícius da Silva Duval pelos ajustamentos finais da técnica histológica aplicada, pela colaboração no momento de interpretação dos dados, pelas longas conversas filosóficas;

Aos colegas do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUC-RS, em especial Nelcy, e aos da secretaria do serviço de Neurologia, Nurma e Iuri pela disponibilidade em me ajudar ;

Aos amigos do curso de pós-graduação em Neurociências da UFRGS, e a todos que de algum modo, estiverem presentes e colaboraram com o meu trabalho;

A CAPES, FAPERGS, e CNPq por todo o incentivo financeiro direto e indireto.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos meus pais, José e Glória Cenira pela inspiração, pelo amor, pelo incentivo, pela dedicação em todos os momentos da minha vida, inclusive naqueles em que estive ausente;

Às minhas irmãs Raquel e Verônica, por me fazerem companhia nas horas difíceis, pelos conselhos, por compartilharem com felicidade de meus desafios. Em extensão à querida Raíssa e Clodoaldo;

Aos meus amigos, por entenderem os meus muitos “não posso” a seus convites, pelos encontros, ensinamentos e apoio;

À profissional Regina Klarmann, por estar ao meu lado, por me ajudar em meu crescimento.

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1- Modelo proposto para a fase de indução da LTP.....	07
Fig. 2- Representação das camadas e células principais do hipocampo.....	11
Fig.3- Representação da circuitaria hipocampal.....	11
Fig. 4- Delineamento experimental do modelo da pilocarpina.....	23
Fig. 5- Demonstração de animal em SE agudo.....	24
Fig. 6- Delineamento experimental dos grupos controles.....	26
Fig. 7- Principais etapas da obtenção de fatias hipocampais.....	28
Fig.8-Sentido da abertura do crânio do rato.....	29
Fig. 9- Demonstração do encéfalo removido da caixa craniana para a realização da técnica das fatias cerebrais	29
Fig.10-Demonstração do isolamento dos hipocampos.....	29
Fig.11-Câmara de registro.....	31
Fig.12-Equipamento (“setup”) de eletrofisiologia.....	32
Fig.13- Organização dos equipamentos utilizados para a obtenção dos registros dos PEPSs de campo e indução da LTP em ordem de uso.....	33
Fig.14- Modelo de indução da LTP nas fatias analisadas.....	34
Fig.15- Demonstração da medida da amplitude do PEPS de campo.....	37
Fig.16- Demonstração da medida final do “slope” do PEPS de campo.....	39
Fig.17- Exemplo de indução da LTP em uma fatia hipocampal de animal do grupo controle (30 dias após a injeção de solução salina).....	43
Fig.18- Exemplo de indução da LTP em uma fatia hipocampal de animal epiléptico (30 dias após a injeção de pilocarpina).....	43
Fig.19- Demonstração de falha na indução da LTP em uma fatia hipocampal de animal epiléptico (30 dias após a injeção de pilocarpina).....	44
Fig.20- Número de vezes em que se obteve um aumento de 40% na amplitude do PEPS para o grupo de animais controles em comparação aos animais epilépticos após a estimulação tetânica.....	45
Fig. 21- Aumento percentual da amplitude do PEPS ao 1 ^o minuto da indução de LTP para os dois grupos (controles <i>versus</i> epilépticos).....	47
Fig.22- Aumento percentual na amplitude do PEPS aos 5 minutos da indução de LTP para os dois grupos (controles <i>versus</i> epilépticos).....	48

Fig.23- Aumento percentual na amplitude do PEPS aos 30 minutos da indução de LTP para os dois grupos (controles <i>versus</i> epiléticos).....	49
Fig.24- Aumento percentual na amplitude do PEPS aos 60 minutos da indução de LTP para os dois grupos (controles <i>versus</i> epiléticos).....	51
Fig.25-Fatia hipocampal de rato com 90 dias da injeção de pilocarpina demonstrando a presença de brotamento neuronal (“sprouting”).....	58
Fig.26 - Demonstração de falha na indução da LTP para o animal com 90 dias da injeção de pilocarpina da figura 25.....	58
Fig.27- Fatia hipocampal de rato com 90 dias da injeção de pilocarpina, demonstrando a presença de brotamento neuronal (“sprouting”), para o qual se obteve a LTP.....	59
Fig.28- Demonstração de indução da LTP para o animal epilético com 90 dias da injeção de pilocarpina da figura 27.....	59
Fig.29- Fatia hipocampal de rato com 90 dias após a injeção de solução salina, onde se evidencia a ausência de brotamento (“sprouting”).....	60
Fig.30- Demonstração de indução da LTP para animal controle com 90 dias após a injeção de solução salina da figura 29.....	60
Fig.31- Fatia hipocampal de rato com 90 dias após a injeção de solução salina, onde se evidencia a ausência de brotamento (“sprouting”).....	61
Fig.32- Demonstração de indução da LTP para o animal controle com 90 dias após a injeção de solução salina da figura 31.....	61
Fig.33- Fatia hipocampal de rato com 60 dias da injeção de pilocarpina, onde se evidencia a ausência de brotamento (“sprouting”).....	62
Fig.34- Demonstração de indução da LTP para o animal epilético com 60 dias da injeção de pilocarpina da figura 33.....	62
Fig.35- Demonstração de falha na indução da LTP para o animal com 60 dias da injeção de pilocarpina da figura 33.....	62
Fig.36- Fatia hipocampal de rato com 60 dias após a injeção de solução salina, onde se evidencia a ausência de brotamento (“sprouting”).....	63
Fig.37- Demonstração de indução da LTP para o animal controle com 60 dias após a injeção de solução salina da figura 36.....	63
Fig.38- Fatia hipocampal de rato com 30 dias da injeção de pilocarpina demonstrando a presença de brotamento neuronal (“sprouting”).....	64

Fig.39- Representação de brotamento neuronal (“sprouting”) em fatia diferente do mesmo animal da figura 38.....	64
Fig.40- Demonstração de falha na indução da LTP para o animal com 30 dias da injeção de pilocarpina das figuras 38 e 39.....	64
Fig.41- Fatia hipocampal de rato com 30 dias após a injeção de solução salina, onde se evidencia a ausência de brotamento (“sprouting”).....	65
Fig.42- Demonstração de indução da LTP para o animal controle com 30 dias após a injeção de solução salina da figura 41.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Constituição dos grupos estudados.....	22
Tabela 2- Escala de Racine.....	24
Tabela 3- Porcentagem de animais dos grupos controles e epiléticos em que se induziu ou não a LTP.....	42
Tabela 4- Comparação entre os grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) e epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) quanto à mudança percentual na amplitude do PEPS de campo no 1º minuto após a estimulação tetânica , em relação à amplitude basal.....	47
Tabela 5- Comparação entre os grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) e epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) quanto à mudança percentual na amplitude do PEPS de campo no 5º minuto após a estimulação tetânica , em relação à amplitude basal.....	48
Tabela 6- Comparação entre os grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) e epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) quanto à mudança percentual na amplitude do PEPS de campo no 30º minuto após a estimulação tetânica , em relação à amplitude basal.....	50
Tabela 7- Comparação entre os grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) e epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) quanto à mudança percentual na amplitude do PEPS de campo no 60º minuto após a estimulação tetânica , em relação à amplitude basal.....	51
Tabela 8- Comparação entre os grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) e epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) quanto à mudança percentual no “ <i>slope</i> ” do PEPS de campo no 1º minuto após a estimulação tetânica, em relação ao “ <i>slope</i> ” basal.....	53
Tabela 9- Comparação entre os grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) e epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) quanto à mudança percentual no “ <i>slope</i> ” do PEPS de campo no 5º minuto após a estimulação tetânica, em relação ao “ <i>slope</i> ” basal.....	54
Tabela 10- Comparação entre os grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) e epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) quanto à mudança percentual no “ <i>slope</i> ” do PEPS de campo no 30º minuto após a estimulação tetânica, em relação ao “ <i>slope</i> ” basal.....	55

Tabela 11- Comparação entre os grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) e epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) quanto à mudança percentual no “ <i>slope</i> ” do PEPS de campo no 60 ^o minuto após a estimulação tetânica, em relação ao “ <i>slope</i> ” basal.....	56
Tabela 12- Resumo das mudanças nos “ <i>slopes</i> ” dos PEPSs.....	57
Tabela 13- Descrição de presença ou ausência de brotamento neuronal no GD...	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ACPD= 1S,2R-aminociclopentano dicarboxilato

AL= stratum alveus

AMPA= alfa -amino-3-hidroxi-5 metil- 4 isoxazol propionato

AMPc= adenosina monofosfato cíclico

AP3= ácido 2-amino-3- fosfonopropionato

AP4= ácido 2- amino-4-fosfonobutanoato

AP5= ácido 2 amino-5-fosfonoaléxico

ATP= adenosina trifosfato

CA1= subcampo 1 do corno de Ammon, segundo Lorente de Nó

CA2= subcampo 2 do corno de Ammon, segundo Lorente de Nó

CA3= subcampo 3 do corno de Ammon, segundo Lorente de Nó

CA4= subcampo 4 do corno de Ammon, segundo Lorente de Nó

CaMKII= proteína dependente de cálcio-calmodulina II

CC= células em cesto

CE= córtex entorrinal

CER= crises espontâneas recorrentes

CG= células granulares

CO= monóxido de carbono

CO₂= dióxido de carbono

CREB= proteína ligante de elemento responsivo ao AMPc (do inglês “cyclic AMP response element binding protein”)

DAG= diacilglicerol

DZ= diazepam

EC= extracelular

EH= esclerose hipocampal

ELT= epilepsia do lobo temporal

EMT= esclerose mesial temporal

ES= entrada sensorial

FCS= fibras colaterais de Schaffer

FH= formação hipocampal

FI= fímbria

FM= fibras musgosas

GABA= ácido gama-aminobutírico
GD= giro denteado
GMPc= guanosina monofosfato cíclico
 I_M = corrente iônica de potássio do tipo M
IP3= inositol trifosfato
LCRa= líquido cefalorraquidiano artificial
LTD= depressão de longa duração (do inglês “long-term depression”)
LTP = potenciação de longa duração (do inglês “long-term potentiation”)
MGluRs= receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MK-801 =(+)- 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] ciclohepten-5,10-imina
MS= metil escopolamina
NMDA = N-metil-D-aspartato
NO= óxido nítrico
PAF= fator de ativação plaquetária (do inglês “platelet –activating factor”)
PE= população de espículas
PEPS= potencial excitatório pós-sináptico
PFA= paraformaldeído
PILO= pilocarpina
PKA=proteína cinase dependente de AMPc
PKC = proteína cinase C
PLC= fosfolipase C
PPH_I= pós-potencial hiperpolarizante intermédio
PPH_R = pós-potencial hiperpolarizante rápido
SAL= solução salina
SE= status epilepticus
SG= stratum granulosum
SUB= subiculum

RESUMO

FRISON, T B. **Estudo da potenciação de longa duração em fatias de hipocampo de ratos com períodos distintos de epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina.** 2003. 103 p. Dissertação Mestrado – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul , Porto Alegre.

A potenciação longa duração (do inglês: *long-term potentiation*, ou LTP) na região de CA1 do hipocampo é considerada como um dos exemplos de plasticidade cerebral mais estudados, e provável base celular do aprendizado e da memória. Mecanismos morfofisiológicos em comum, entretanto, parecem ser compartilhados pela LTP e pela epilepsia experimental. Estes referem-se, basicamente, à necessidade de uma estimulação de alta frequência, ao envolvimento de uma transmissão sináptica glutamatérgica, ao aumento do íon Ca^{2+} no meio intracelular, à expressão gênica, à síntese de proteínas, e à ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos. Desse modo, alguns autores sugerem que a LTP tem um importante papel no desenvolvimento das crises epiléticas, havendo uma continuidade entre os fenômenos plásticos e patologia.

O presente estudo buscou investigar, num modelo experimental de Epilepsia de Lobo Temporal (ELT) induzido pela pilocarpina (um agonista colinérgico muscarínico), em ratos, a existência de plasticidade neuronal em distintos tempos de epilepsia (30 dias, 60 dias e 90 dias), utilizando como medida a potenciação de longa duração (LTP) nas sinapses entre os axônios da via colateral de Schaffer e as células piramidais de CA1, em fatias hipocampais. Além disso, verificou-se a presença de brotamento neuronal (“sprouting”), um correlato de plasticidade cerebral estrutural concomitante à cronicidade da ELT, em um campo próximo de CA1, o giro denteado hipocampal.

A análise da amplitude dos potenciais pós-sinápticos excitatórios (PEPS) de campo mostrou que somente a presença de epilepsia, nesse modelo, interferiu negativamente com a indução da LTP, o que foi atribuído a efeitos de excitotoxicidade, à condição permanente de epileptogênese, à perda neuronal progressiva, a anormalidades dendríticas do corpo neuronal e de axônios decorrentes da injeção de pilocarpina. As chances de ocorrência da LTP para os animais controles foi de 4 a 10 vezes maior do que a dos animais epiléticos. A inclinação do PEPS, uma medida correspondente à eficiência sináptica, demonstrou sofrer influência do tempo de epilepsia. Um decaimento nessa medida ocorreu no grupo de animais que permaneceu durante mais tempo com o quadro de crises recorrentes, ou seja, com 90 dias de ELT. Além disso, observou-se também um comprometimento desta nos animais controle de 90 dias, após o período de 60 minutos da estimulação. Assim, animais saudáveis com mais idade também não mantiveram uma eficiência sináptica aumentada e estável por mais de 30 minutos após a estimulação. Mecanismos moleculares tais com excitabilidade neuronal e aumento na eficiência da transmissão sináptica encontram-se mais preservadas em animais saudáveis e de menos idade.

A presença de brotamento neuronal, por sua vez, foi identificada em quase 100% das amostras de tecido hipocampal de animais epiléticos, não sendo observado em nenhum animal controle, o que nos serviu como um indicador do comprometimento hipocampal associado a crises epiléticas recorrentes.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
1.INTRODUÇÃO	01
1.1 Potenciação de longa duração	01
1.2 Plasticidade cerebral	03
1.3 Sinaptologia do hipocampo.....	08
1.4 Epilepsia do lobo temporal (ELT).....	12
1.5 Modelo experimental de epilepsia do lobo temporal (ELT) induzida pela injeção sistêmica de pilocarpina	13
1.6 Uso de fatias de cérebro (“Brain Slices”) para o estudo da LTP.....	16
1.7 Neo-Timm	17
1.8 Hipóteses de trabalho	20
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Delineamento Experimental	22
3.3 Modelo de epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina	23
3.3.1 Mortalidade pela pilocarpina e constituição da amostra analisada.....	26
3.4 Equipamentos utilizados para a técnica de fatias cerebrais.....	27
3.5 Fatias cerebrais.....	27
3.6 Soluções de perfusão	30
3.7 Equipamentos utilizados para o registro eletrofisiológico e indução da LTP.....	30
3.7.1 Resumo do Procedimento de registro do PEPS de campo e de indução da LTP nas fatias hipocampais dos grupos estudados.....	33
3.8 Técnica de indução da LTP em CA1.....	34

3.9 Estudo histológico pela técnica de neo-Timm como confirmação do comprometimento hipocampal.....	35
3.10 Análise dos dados.....	36
3.10.1 Análise da indução da LTP em CA1.....	36
3.10.2 Análise da mudança percentual na inclinação (“ <i>slope</i> ”) do PEPS.....	38
3.10.3 Análise do brotamento neuronal evidenciado pela técnica de neo-Timm.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Indução da epilepsia do lobo temporal pela injeção sistêmica de pilocarpina.....	41
4.1.1 Mortalidade pela pilocarpina e constituição da amostra estudada.....	41
4.2 Potenciação de longa duração (LTP).....	42
4.2.1 Probabilidade de Indução da LTP.....	45
4.2.2 Análise da amplitude do PEPS.....	45
4.2.3 Análise do “ <i>slope</i> ” do PEPS.....	52
4.3 Análise do brotamento neuronal (“ <i>sprouting</i> ”)	58
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	87
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Potenciação de longa duração

O conhecimento da forma como o sistema nervoso adquire, armazena e utiliza a informação constitui-se, ainda hoje, em um dos grandes desafios para as Neurociências. Hipóteses a respeito da existência de uma modificação no tecido nervoso associada à experiência sem quaisquer evidências experimentais, e tampouco metodologia apropriada para demonstrá-lo, eram o mais comum em séculos passados (HARTLEY, 1749). Definições mais precisas, com bases científicas começaram a aparecer há algumas décadas.

Em 1949, através da notável obra “A Organização do Comportamento”, o psicólogo canadense Donald Hebb propôs que as memórias no encéfalo de mamíferos estariam armazenadas em conexões sinápticas eficientes entre neurônios ativadas durante o aprendizado. Essa idéia levou em consideração a hipótese de que a atividade coincidente de dois neurônios conectados entre si, determina um aumento na eficiência dessa conexão. Ou seja, quando um axônio pré-sináptico está ativo e, ao mesmo tempo, o neurônio pós-sináptico está fortemente ativado sob a influência de outras aferências, então a sinapse formada pelo axônio pré-sináptico é reforçada. Para que Hebb chegasse a esse raciocínio, lançava mão de conceitos mais antigos, como o da doutrina neuronal (RAMON y CAJAL, 1894) e a definição de sinapse (SHERRINGTON, 1897). Essa capacidade de modificação característica da sinapse, conhecida como plasticidade sináptica, explicaria ao menos em parte as mudanças adaptativas que ocorrem nos circuitos neuronais. A novidade trazida por Hebb (1949) referia-se aos mecanismos sinápticos propostos para a formação de memórias ao nível de conexões neuronais (MAREN & BAUDRY, 1995).

Em 1973, na Noruega, Timothy Bliss e Terje Lømo descreveram a primeira evidência experimental de que estimulações elétricas breves e repetidas de alta frequência em uma sinapse no sistema nervoso central de mamífero são capazes de produzir um aumento persistente na força da transmissão sináptica que

pode permanecer durante semanas. Tal fenômeno veio a ser denominado em inglês como “*Long-term potentiation*” ou LTP, e traduzido para o português como Potenciação de Longa Duração. Em seu experimento, os autores examinaram a consequência de uma estimulação elétrica repetitiva da via perforante (feixe de fibras que parte do córtex entorrinal para inervar ao hipocampo) no giro denteado do hipocampo. A importância dos resultados alcançados com este experimento residia principalmente no fato de haver uma duração prolongada do aumento no potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) após o estímulo, e o envolvimento de uma via identificável cortical (DOUGLAS, 1967; OLDS, 1972; BLISS & LØMO, 1973). A comprovação de que a LTP poderia desenvolver-se dentro do modelo proposto por Hebb (WIGSTRÖM et al, 1986) favoreceu significativamente a idéia de que este fenômeno seria a expressão celular da memória e do aprendizado (SQUIRE, 1992; TEYLER & DI SCENA, 1984). Além do mais, a via perforante, onde foram primeiramente encontrados os efeitos da LTP, é uma das principais vias extrínsecas da formação hipocampal, uma região do cérebro há muito relacionada com a memória e o aprendizado.

A epilepsia, considerada como um dos problemas neurológicos mais comuns, pois atinge cerca de 0,5 a 1% da população em geral nos países desenvolvidos, e 2% nos países em desenvolvimento (SANDER & HART, 1999), tem como diagnóstico anatomopatológico mais freqüente entre os casos que são refratários ao tratamento clínico (atingindo um índice de 63%), a esclerose mesial temporal (EMT) (SERAFINI & LEITE, 2000). Nesse caso ocorre o acometimento das estruturas hipocampais e, em consequência um comprometimento da memória e do aprendizado. O início das crises é dificilmente abortado, sendo que a freqüência e a severidade das crises freqüentemente aumentam com o tempo. A repetida excitação de um grupo de neurônios, como ocorre na epilepsia, resulta em mecanismos semelhantes aqueles envolvidos na LTP, tais como a necessidade de uma estimulação de alta freqüência, hiperexcitabilidade glutamatérgica, liberação do íon Ca^{2+} no meio intracelular, expressão gênica, síntese de proteínas, e ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (DINGLELINE & MC BAIN, 1999). Desse modo, além de ser um modelo típico de aprendizado e memória, a LTP também pode ter um importante papel no desenvolvimento das crises epiléticas, sugerindo-se que exista uma continuidade entre plasticidade e patologia. A propriedade de ativação de receptores NMDA ao mesmo tempo que é um passo importante para

mudanças plásticas, pode predispor determinadas áreas cerebrais à epileptogênese (HERRON et al., 1985).

Assim como a LTP hipocampal, uma outra forma de plasticidade bastante estudada é a Depressão de Longa Duração (do inglês "*Long-term depression*" ou LTD)(ITO, 1989). Descoberta após a LTP, a LTD foi Identificada por Masao Ito e colegas, na década de 80. Estes autores perceberam que a estimulação elétrica do cerebelo produzia um decaimento de longa duração na eficiência sináptica. Sabe-se que tal fenômeno também exhibe propriedades das sinapses hebbianas e pode ser correlacionado à memória e ao aprendizado no cerebelo (ITO, 1989).

1.2 Plasticidade cerebral

Entende-se por plasticidade cerebral a capacidade de reorganização estrutural e funcional diante de lesões do tecido nervoso, ou em consequência de sua estimulação (KOLB & WILSHAW, 1989; ZILLES, 1992). O fenômeno da potenciação de longa duração (do inglês "*long-term potentiation*" ou LTP), principalmente no que se refere à região hipocampal é, provavelmente, o exemplo de plasticidade cerebral mais estudado. A associação entre LTP e plasticidade cerebral dá-se, entre outros motivos, pelo fato de ocorrer um aumento na amplitude de resposta sináptica após a estimulação, que pode ser mantido por horas ou dias, por haver o envolvimento de mudanças estruturais específicas e a possibilidade de formação de novas sinapses (COTMAN et al, 1994). Após a estimulação tetânica para a indução da LTP, podem ser percebidas alterações na forma das espinhas dendríticas, e a existência de um número maior de sinapses em mesma região ou em áreas muito próximas (KANDEL et al, 2000).

Embora a LTP tenha sido primeiramente demonstrada em sinapses da via perforante, em neurônios do giro denteado, a maior parte dos estudos, hoje, são realizados nas sinapses hipocampais que ocorrem entre a via colateral de Schaffer e os neurônios piramidais de CA1 em preparações de finas fatias de cérebro (NICOLL & MALENKA, 1995; ZIGMOND et al, 1999; BEAR et al, 2002). Sua fase inicial, a de indução, refere-se aos eventos que acionam o processo de modificação

sináptica, a partir de um estímulo de alta frequência. Sabe-se do importante papel que os subtipos de receptores aminoacídrgicos exercem nessa fase, devido a uma ampla gama de estudos com seus antagonistas (IZQUIERDO & MEDINA, 1995).

O neurotransmissor glutamato, uma vez liberado na fenda sináptica, durante o estímulo, une-se principalmente a 2 subtipos de receptores ionotrópicos coexistentes na porção pós-sináptica: 1) AMPA (α -amino-3-hidroxi-5 metil- 4 isoxazol propionato), que é permeável a cátions monovalentes como o Na^+ e K^+ , e que promove a maior parte da entrada de corrente para geração de respostas sinápticas, possuindo baixíssima permeabilidade ao íon Ca^{2+} ; 2) NMDA (N-metil-D-aspartato), que exibe notável dependência de voltagem devido ao bloqueio de seu canal pelo Mg^{2+} extracelular. No momento da despolarização, o íon Mg^{2+} dissocia-se de seu local de ligação no receptor NMDA, permitindo a entrada de Na^+ , e de Ca^{2+} (Figura 1). Nessa fase inicial também ocorre a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs), localizados nas membranas pré e pós-sinápticas (ZIGMOND, 1999), de forma independente da ativação dos receptores NMDA (AGRANOFF et al, 1999). Os mGluRs promovem modificação na efetividade dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPSs) gerados (BEAR et al, 2002), modulando a transmissão sináptica, através da ativação de proteínas G (proteínas ligantes de guanosina trifosfato) presentes na membrana celular, e, conseqüentemente, a ação de uma cascata de segundos mensageiros.

Algumas enzimas são ativadas a partir do aumento persistente na transmissão sináptica ocasionado pelo influxo de Ca^{2+} , bem como liberação desse mesmo íon a partir dos estoques intracelulares. Uma grande importância é dada à proteína cinase C (PKC) (MALENKA et al., 1989; MALINOW et al., 1989; AGRANOFF et al, 1999), à proteína dependente de cálcio-calmodulina II (CaMKII), e à tirosina cinase (O'DELL et al, 1991). Quando inibidas estas cinases, ocorre o bloqueio da indução da LTP. A ativação das cinases resulta na regulação positiva, através do processo de fosforilação, dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA pós-sinápticos, o que determina uma mudança em suas propriedades (aumentando sua sensibilidade ao glutamato), ou na inserção de demais receptores AMPA funcionais (Figura 1). Essas mudanças contribuem para a manutenção da LTP.

A ativação de outros mGluRs, como por exemplo, os do Grupo II e III, por outro lado, resulta na inibição de adenilato ciclase, uma enzima ligada à membrana que converte a adenosina trifosfato (ATP), o produto do metabolismo

oxidativo na mitocôndria, em um composto denominado adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que é livre para se difundir no citoplasma, e é considerado ser um segundo mensageiro (DINGLE & MC BAIN, 1999). O AMPc, por sua vez, está associado à ativação de proteínas cinases como a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), a qual cataliza reações químicas de fosforilação de certos canais de membrana como canais de Ca^{2+} , por exemplo. Dessa forma, uma ampla variedade de canais iônicos dependentes de voltagem têm sua atividade modulada pela ação dos receptores mGluRs.

Eventos correspondentes à fase de expressão da LTP em CA1 são ainda um tanto controversos. Atribui-se em parte a: 1) modificações pré-sinápticas que resultam em um aumento na quantidade de neurotransmissor L-glutamato liberado; 2) modificações pós-sinápticas, tais como um aumento no número de receptores ou uma mudança em suas características funcionais; 3) uma mudança extra-sináptica, tal como uma redução na apreensão do glutamato pelas células gliais levando a um aumento na quantidade de neurotransmissor disponível; 4) modificações morfológicas (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO & MC GAUGH, 2000). Na verdade, é possível que ocorra uma combinação de todas essas mudanças, em diferentes tempos do processo. Uma das formas de ocorrer liberação aumentada do neurotransmissor glutamato é através da ação de segundos mensageiros, entre os quais o óxido nítrico (NO). Alguns autores trazem também o ácido araquidônico (ácido 5,8,11, 14- eicosatetraenóico), o monóxido de carbono (CO), e o fator de ativação plaquetária (PAF do inglês "*platelet –activating factor*") como possíveis mensageiros retrógrados, visto que antagonistas dessas substâncias bloqueiam a liberação do glutamato e, em consequência a indução da LTP (IZQUIERDO & MEDINA, 1995). Tais mensageiros também podem atuar na porção pós-sináptica aumentando a transmissão.

Para ocorrer a manutenção do estado de potenciação sináptica, e a fase tardia da LTP, são necessárias alterações na expressão gênica e a síntese de novas proteínas, desta forma as mudanças plásticas tornar-se-iam permanentes, assim como ocorre nas formas de memória de longo prazo (MALENKA & NICOLL, 1999). Alguns estudos, de forma antagônica, revelam que a manutenção da plasticidade de longo prazo envolve muitos estágios, e que nem todos dependem da síntese de proteínas (KANDEL et al, 2000). Sabe-se que na fase tardia da LTP, o Ca^{2+} presente no citosol, através da CaMKII, recruta a adenilato ciclase que, por sua

vez, irá ativar a proteína cinase dependente de AMPc, que pode ser traslocada para o núcleo. Uma vez no núcleo, esta proteína irá fosforilar a proteína ligante de elemento responsivo o AMPc (do inglês “*cyclic AMP response element binding protein*” ou CREB) . A CREB ativa pontos associados a mudanças estruturais. Camundongos mutantes em que se bloqueou a atividade de PKA ou de CREB houve redução ou eliminação da fase tardia da LTP (KANDEL et al, 2000).

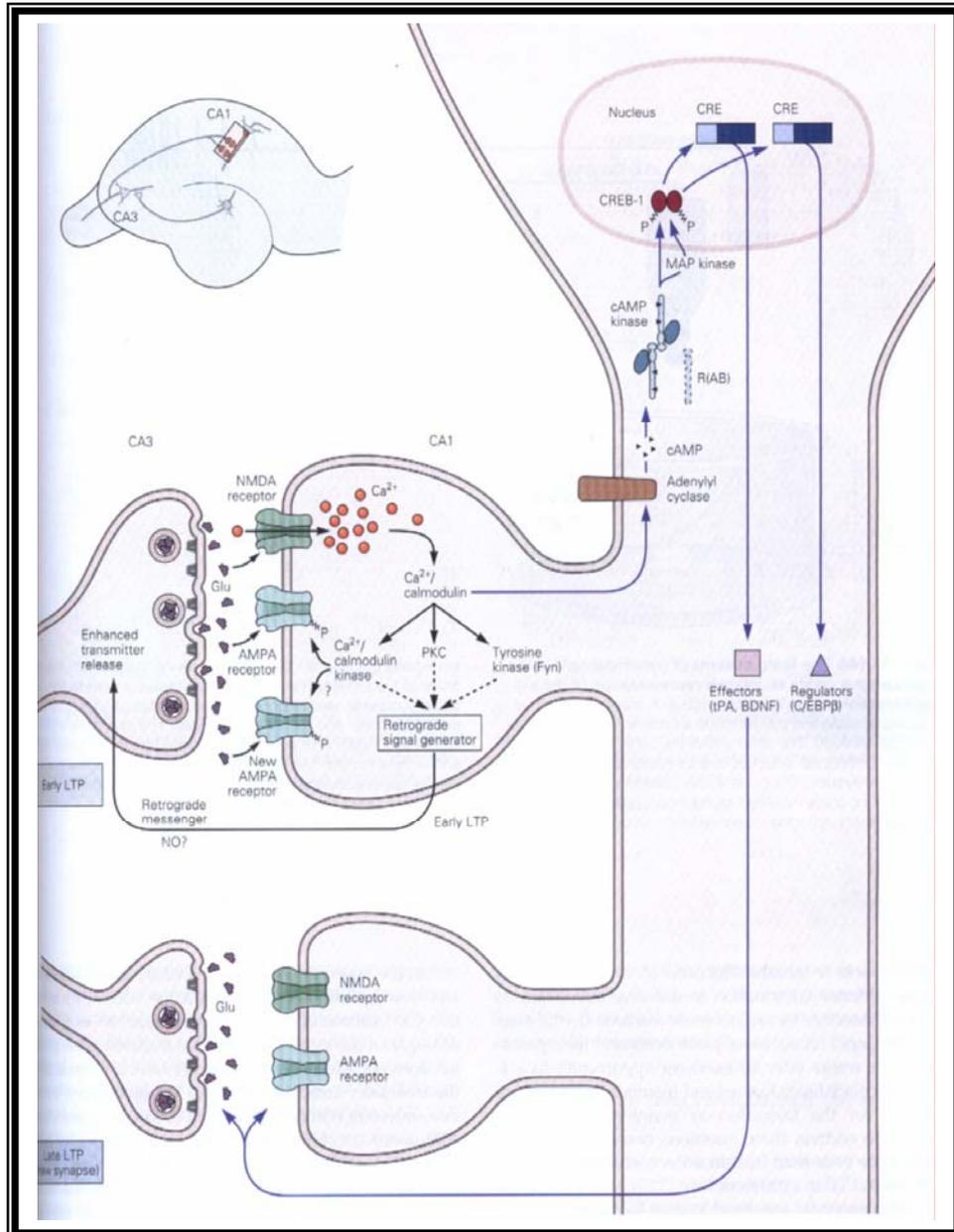


Figura 1: Modelo proposto para a fase de indução da LTP. De acordo com este modelo os receptores ionotrópicos NMDA e não-NMDA encontram-se localizados próximos uns dos outros nas espinhas dendríticas

- A) Durante uma transmissão sináptica normal, de baixa frequência, ocorre a liberação do glutamato (Glu) a partir do terminal pré-sináptico, agindo sobre receptores NMDA e não-NMDA (do tipo AMPA). Os íons Na^+ e K^+ fluem através dos canais AMPA, mas não através dos NMDA, permitindo que o bloqueio realizado pelo íons Mg^{2+} nestes canais deixem a membrana em seu potencial de repouso.
- B) Diante de uma estimulação tetânica de alta frequência que induz a LTP, no momento em que a membrana pós-sináptica sofre a despolarização, pela ação dos receptores AMPA, ocorre o desbloqueio dos canais NMDA pela remoção dos íons Mg^{2+} , permitindo que o Ca^{2+} flua através desses canais. O aumento resultante do íon Ca^{2+} nas espinhas dendríticas dispara as cinases CaMKII (proteína dependente de cálcio-calmodulina II), e PKC (proteína cinase C) e TC (tirosina cinase), que juntas induzem a LTP. A CaMKII age na fosforilação dos receptores canais AMPA, que favorecem a manutenção da LTP pela porção pós-sináptica. A presença de segundos mensageiros colabora para uma liberação aumentada do neurotransmissor glutamato (adaptado de Kandel et al., 2000) .

1.3 Sinaptologia do Hipocampo

O lobo temporal medial está anatomicamente relacionado à formação hipocampal, comunicando-se intimamente com a amígdala e com outras estruturas do sistema límbico. O sistema límbico tem como principais componentes os córtices límbicos associativos, a formação hipocampal, o complexo amigdalóide, os núcleos septais, o hipotálamo e o bulbo olfatório (BROWN & ZADOR, 1990). De acordo com esses autores, o hipocampo é uma estrutura cilíndrica cujo eixo longitudinal forma um semicírculo ao redor do tálamo. É importante salientar a existência de uma grande variabilidade entre as espécies no que se refere à posição do hipocampo em relação a outras estruturas cerebrais, e em algum grau, a sua organização interna.

As sub-regiões conhecidas como giro denteado (GD), ou fascia dentata, complexo subicular, córtex entorrinal, e o hipocampo constituem a formação hipocampal (FH) ou região hipocampal (BROWN & ZADOR, 1990; KNOWLES, 1993; AMARAL, 1999). Segundo Lorente de Nó (1934), o hipocampo é dividido em quatro sub-campos tradicionalmente designados como CA1, CA2, CA3 e CA4, onde CA abrevia o nome corno de Ammon (do latim cornu= corno, Ammonis= carneiro, devido a sua semelhança, no cérebro humano, ao chifre de carneiro presente na cabeça do deus egípcio Ammon) (figura 3).

Estes sub-campos podem ser divididos em sub-áreas a, b, c (ex.: CA1a, CA1b, CA1c). Uma outra forma de orientar a anatomia do hipocampo (RAMÓN y CAJAL, 1911) é dividi-lo em duas regiões: superior e posterior, de acordo com as diferenças na morfologia celular bem como suas conexões regionais. O mesmo padrão básico de organização celular pode ser encontrado para os sub-campos de CA1, CA2 e CA3, o que não ocorre para CA4, devido a sua natureza polimórfica.

A lâmina contínua de neurônios principais que origina o corno de Ammon e o giro denteado dobra-se sobre si mesma e separa-se ao longo do desenvolvimento, obliterando a fissura hipocampal e formando duas estruturas interdigitadas em forma de C, ambas constituindo um arqueocórtex em três camadas ou *stratum* (AFFIFI & BERGMAN, 1998).

Denomina-se neurônios principais as células que recebem ou realizam sinapses com neurônios externos ao núcleo ou região em que estão situados. Por

outro lado, os interneurônios são os neurônios que possuem apenas sinapses locais, não necessariamente inibitórias (SHEPHERD & KOCH, 1997). Entre estes últimos, encontramos as células em cesto (“basket cells”), as quais agem na inibição das células piramidais de CA1 através de sinapses axo-somáticas, formando circuitos inibitórios do tipo “Renshaw”, ao mesmo tempo que recebem aferências excitatórias, inclusive das mesmas células de CA1. Tem-se também as células em candelabro (“chandelier cells”), que atuam na inibição das células piramidais no segmento inicial do axônio (KNOWLES, 1992). Além desses, existem uma série de interneurônios presentes nas camadas a seguir descritas, os quais recebem os nomes de suas respectivas localidades, sendo que os interneurônios mais importantes do corno de Ammon são os interneurônios O/A, situados no limite do *stratum oriens* com o *alveus*, um conjunto de fibras axonais, e os interneurônios L/M, situados no *stratum lacunosum-moleculare*.

Os tipos de córtex laminar que compõem os sub-campos de CA e o giro denteado são: a camada polimórfica, onde está o (1) *stratum oriens*, uma camada entre o *alveus* e a camada piramidal, que contém dendritos basais das células piramidais principais e de algumas células em cesto (KNOWLES & SCHWARTZKROIN, 1981), a (2) camada piramidal ou *stratum pyramidale*, onde as células principais são os neurônios piramidais, as quais são consideradas fazer parte da mais numerosa classe de neurônios hipocâmpais, contém o soma das células piramidais do hipocampo, e (3) a camada molecular, que contém o *stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*, formados por terminais nervosos, os dendritos apicais das células piramidais, e fibras axonais originadas em CA2, CA3, e CA4 (LORENTE DE NÓ, 1934) (Figura 2). Os neurônios piramidais de CA3 projetam seus axônios (constituindo a via colateral de Schaffer) para a área de CA1 onde formam sinapses excitatórias (ANDERSEN et al., 1980).

Resumidamente, os dendritos apicais dos neurônios piramidais do CA constituem o *stratum radiatum* e seus dendritos basais, o *stratum oriens*. O *alveus* contém algumas aferências ao hipocampo e é formado principalmente por axônios das células piramidais hipocâmpais (ANDERSEN et al, 1964).

O giro denteado (GD) também é constituído por corpos celulares de neurônios principais, as células granulares, as quais formam *stratum granulosum* (SG). De uma forma mais ampla, o GD consiste de uma (1) camada polimórfica (também conhecida como região hilar, ou somente *hilus*), onde estão misturados os

dendritos basais dos neurônios granulares com interneurônios, (2) a camada granular (*stratum granulosum*), e (3) a camada molecular (*stratum moleculare*), a qual é formada pelos dendritos apicais dos neurônios granulares do GD. A camada molecular do GD tem continuidade com o hipocampo.

Pelo menos 21 diferentes tipos de interneurônios foram identificados na região hilar do giro denteado (AMARAL, 1978). Metade da população de neurônios hilares é composta pelo interneurônio musgoso, de natureza excitatória (RATZLIFF et al, 2002).

A via excitatória mais importante da formação hipocampal constitui a via tri-sináptica lamelar (BROWN & ZADOR, 1990; KNOWLES, 1992) (Figura 3). Nesta via, em condições normais, as células granulares do giro denteado recebem sinais excitatórios, geralmente glutamatérgicos, oriundos do córtex entorrinal (camada II), através da via perforante. As células entorrinais da camada II e III projetam também parte de seus axônios às áreas CA2 e CA3 (BROWN & ZADOR, 1990). Das células granulares (CG) do GD partem fibras axonais que formam a via das fibras musgosas (FM) que fazem conexão com CA3 e CA2. Os neurônios piramidais de CA3, por sua vez, inervam a área de CA1, através das vias das fibras colaterais de Schaffer (FCS), que formam sinapses excitatórias (BROWN & ZADOR, 1990; GUTIERREZ, 1999). Um esquema resumido das principais conexões é demonstrado na figura 3. Os axônios piramidais de CA1 estão organizados no *alveus* ou em fibras comissurais que se projetam lateralmente. A informação neural é transmitida em CA1 ao subiculum, assim como a outras áreas, constituindo uma via de informação pré-processada no hipocampo.

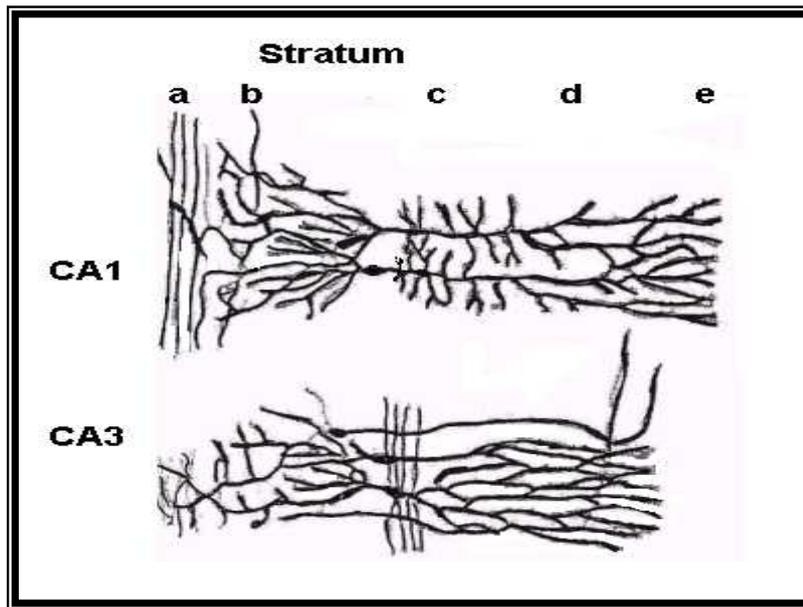


Figura 2. Representação das camadas e células principais do hipocampo. Exemplo de células das áreas de CA1 e CA3 do hipocampo mostrando camadas: a- *stratum alveus*; b- *stratum oriens*; c- *stratum pyramidale*; d- *stratum radiatum*; e- *stratum moleculare* (adaptado de Ramón y Cajal, 1911).

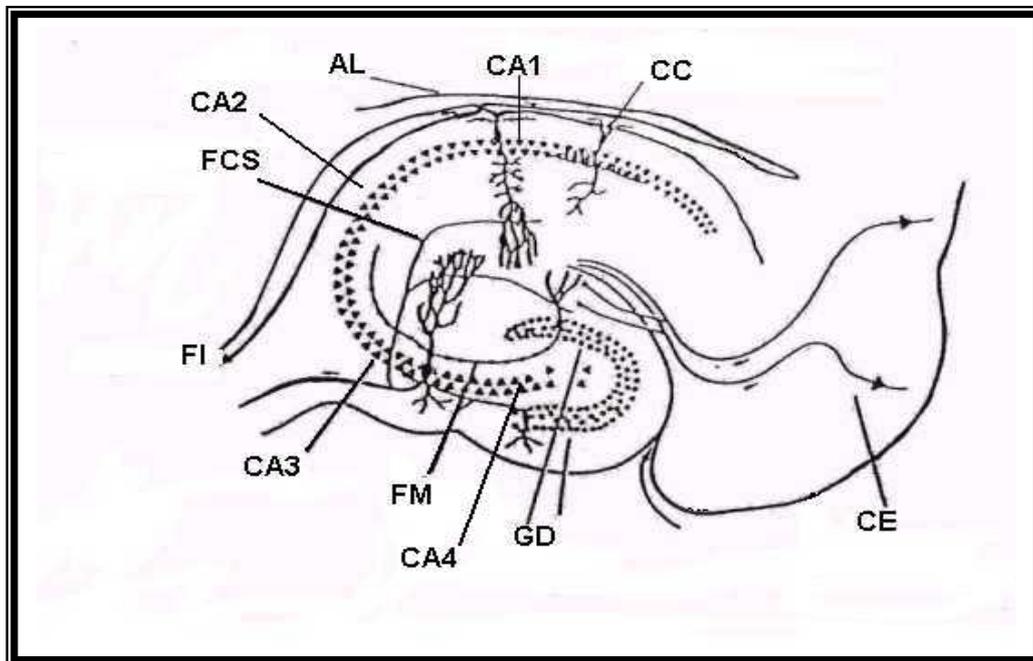


Figura 3. Representação da circuitaria hipocampal. Principais componentes do circuito hipocampal: AL- alveus. CC- células em cesto. CE- córtex entorhinal; FCS- fibra colateral de Schaffer; FI- fímbria; GD- Giro denteado; FM- fibras musgosas; CA- corno de Ammon (extraído de SHEPPERD, 1990).

1.4 Epilepsia do lobo temporal (ELT)

A epilepsia é uma condição crônica, ou um grupo de doenças que tem em comum crises epiléticas (MELDRUM et al, 1999) que irão recorrer na ausência de doença tóxico-metabólica ou febril (GUERREIRO, 1993). O termo crise epilética refere-se a uma alteração subjetiva ou comportamental, decorrente de uma atividade elétrica anormal, de início súbito, que acomete uma ou várias áreas do córtex cerebral, com tendência a se repetir ao longo da vida (PALMINI & DA COSTA, 1998).

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia parcial em adultos, constituindo-se em 40% de todos os casos (SANABRIA et al, 1997; CENDES & KOBAYASHI, 2000). Estima-se que sua etiologia, em 60 a 65% dos casos, seja a esclerose mesial temporal (EMT), também conhecida como esclerose hipocampal (EH) (GUERREIRO, 1993; MÜLLER et al, 1993; QUIGG et al, 1997). A relação de causa ou efeito entre as alterações morfológicas e a ELT ainda é obscura. Alguns pesquisadores referem a EH como fator inicial da ELT, embora outros pensem que esta patologia hipocampal se constitua no resultado passivo das crises convulsivas (COUTINHO et al., 1999). As crises freqüentemente iniciam-se na última metade dos 10 primeiros anos de vida, quando respondem apropriadamente às drogas antiepiléticas, mas recorrem durante a adolescência, ou mais tarde, quando em geral, passam a não mais responder adequadamente ao tratamento medicamentoso (ENGEL, 1996).

Histopatologicamente, o hipocampo destes pacientes revela uma perda neuronal segmentar (GUERREIRO, 1993, MÜLLER, 1993a 1993b; ENGEL, 1996a; QUIGG et al, 1997; BLUNCKE et al, 1999; COUTINHO et al, 1999), havendo uma intensidade gradual de perda neuronal nos vários sub-campos atingindo em ordem decrescente: CA1, setor de Sommer (pró-subículo); hilo do GD e CA3; células granulares do GD e CA2 (BLUNCKE et al, 1999; COUTINHO, 1999). A perda neuronal aparece em outras áreas mesiais temporais como na camada III do córtex entorrinal (DU et al, 1993) e no núcleo lateral da amígdala (PITCKAMEN et al, 1998). Estes achados caracterizam a EH e são evidenciados em pacientes epiléticos. O papel de tais alterações morfológicas, entretanto, ainda é desconhecido.

Vários mecanismos de epileptogênese têm sido descrito ao longo dos anos em modelos animais. Alguns estudos farmacológicos demonstram a

importância dos receptores gabaérgicos e glutamatérgicos na gênese da atividade epileptiforme na ELT, e relacionam-se, principalmente a uma hiperativação dos receptores glutamatérgicos dos tipos AMPA e NMDA, a um defeito nos mecanismos inibitórios dependentes de GABA, e a presença de circuitos recorrentes polissinápticos excitatórios. Entre eles, temos as hipóteses das células em cesto dormentes, descrita por Sloviter (1991) e a da reorganização das fibras musgosas (LEITE & CAVALHEIRO, 1998).

1.5. Modelo experimental de epilepsia do lobo temporal (ELT) induzida pela injeção sistêmica de pilocarpina

O modelo experimental de epilepsia do lobo temporal através da injeção sistêmica de pilocarpina (PILO), um agonista colinérgico muscarínico, foi primeiramente descrito por Turski et al (1983). Estes autores constataram que a injeção sistêmica dessa droga produzia um estado de crises recorrentes e espontâneas após um período de latência (também conhecido como *silencioso*), que estava associado a lesões cerebrais. Uma vez injetada a droga, podem ser observados três estágios de desenvolvimento do modelo: 1) fase aguda, que ocorre logo após a injeção sistêmica da PILO, onde o animal fica em *status epilepticus* (SE) duradouro, isto é, a persistência de crises contínuas durante, no mínimo, 30 minutos (MELLO et al, 1993), o que vem a ser abortado com o uso de anticonvulsivantes 2) fase silenciosa, um período livre de crises comportamentais ou eletrográficas, de duração variável (em média 14 dias) e 3) fase crônica, que é caracterizada por crises recorrentes e espontâneas, de origem límbica com ou sem generalização, e que aparece após o período silencioso, caracterizando o animal como epiléptico crônico.

Oriunda das plantas sul-americanas *Pilocarpus jaborandi*, e *Pilocarpus microphyllus*, a PILO induz um estado comportamental crônico que se assemelha à epilepsia do lobo temporal humana, e que parece depender da facilitação de descargas em salva em neurônios hipocâmpais por meio do bloqueio de correntes iônicas de potássio, que é dependente da ativação muscarínica (I_M) (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000). Existe mais de um tipo de corrente de K^+ no hipocampo. A corrente de K^+ do tipo M (I_M), entretanto, é uma condutância de K^+ sublimiar e com cinética de não inativação (HALLIWELL & ADAMS, 1982) que participa na gênese

do pós-potencial hiperpolarizante rápido (PPH_R) e intermédio (PPH_I) (STORM, 1988; STORM, 1989; SANABRIA, 1999) e também contribui para a acomodação neuronal após descarga de potenciais de ação durante longa despolarização (MADISON & NICOLL, 1984). A I_M pode ser bloqueada por agentes colinérgicos muscarínicos. A ativação dos receptores muscarínicos de acetilcolina, do subtipo m1 nos neurônios da camada II do córtex entorrinal é ampliada pelo influxo de íons de cálcio, causando uma despolarização amplificada da membrana e o disparo repetitivo dos neurônios quando acompanhada de atividade da célula pós-sináptica (KLINK & ALONSO, 1997), introduzindo-se aí um mecanismo hebbiano.

Uma hiperexcitação dos neurônios da formação hipocampal pode ser ocasionada, desse modo, pela ativação dos neurônios da camada II do córtex entorrinal, células de origem da via perforante. Uma inibição dos interneurônios hipocampais por neurônios GABAérgicos septo-hipocampais que são sensíveis à agonistas muscarínicos também podem resultar na hiperatividade dos neurônios hipocampais (WU et al, 2000). A partir da ativação de muitos neurônios durante o SE induzido pela pilocarpina, ocorre, em geral, uma ativação secundária do sistema glutamatérgico e, em consequência, uma excitotoxicidade no hipocampo e em demais estruturas. O dano neuronal excitotóxico agudo associado a outras alterações moleculares levam a diferentes tipos de morte neuronal, ativação de mecanismos de reorganização sináptica, sinaptogênese e neurogênese no giro denteado, bem como mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais e em circuitos inibitórios (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000). Alterações decorrentes na circuitaria hipocampal compõem um quadro permanente de epileptogênese. Análises histológicas do hipocampo de animais submetidos ao modelo da pilocarpina revelam um mesmo padrão de perda celular da EH humana.

Um aspecto negativo do modelo da PILO é o alto índice de mortalidade durante a indução do SE e nos dias seguintes. Por este motivo, algumas medidas devem ser tomadas afim de que o animal tenha maiores chances de sobrevivência. Tais medidas envolvem a precaução da bronco-aspiração pelo excesso de secreções traqueais, esofágicas, gástricas e orais durante a convulsão (o que é feito através de aspiração), e o abortamento de crises comportamentais que possam complicar o quadro do animal diante de um SE prolongado (quando normalmente é utilizado o diazepam). Em uma média de trinta minutos antes da injeção de PILO os animais devem receber drogas que visam minimizar os efeitos colinérgicos

periféricos da pilocarpina. Um fármaco muito utilizado é a metil escopolamina (1mg/Kg, sc) (CAVALHEIRO et al, 1991).

Neste modelo experimental as alterações comportamentais apresentadas em ratos adultos são dose-dependentes (FERREIRA, 1995). Já em ratos em desenvolvimento, iremos observar uma relação dose- idade-dependente. Segundo Ferreira (1995), nas induções de PILO em ratos adultos, onde a relação se dá basicamente de forma dose-dependente, foram evidenciados, nos animais injetados com 100 a 200 mg/Kg, hipoatividade (chegando a fazer paralisações), ato de coçar, e direcionamento das orelhas para trás. Logo após, em uma 2ª fase (10 a 15 min após a injeção), foram observadas movimentos automáticos, olfatórios e gustativos (movimento da língua, mastigação, bater de dentes, salivação, piscamento, movimentação de vibrissas e bocejo). O mesmo ocorre no período entre 5 e 10 min após a injeção em animais que receberam 400mg/Kg de PILO. Tais movimentos duram de 60 a 90 minutos em animais com 100mg/Kg de PILO, e por mais de 2 horas após injeções de 200 mg/Kg. No caso da dosagem alta de 400 mg/Kg, estes movimentos foram observados de 18 a 45 minutos após a injeção, sendo que estes animais produziram crises límbicas com intensa salivação, respostas de orientação, "rearing", "wet dog shakes", clônus e queda. Estas crises motoras límbicas tiveram seu início de 20 a 40 minutos após a injeção, com recorrência a cada 5 a 15 minutos, evoluindo dessa maneira para o SE.

Sabe-se que variações na duração do SE podem ocasionar diferenças eletrofisiológicas da ELT crônica (SANABRIA, 1999). Isto possivelmente está relacionado ao fato de que a ativação de um grande número de neurônios hipocâmpais durante o SE leva, em geral, a uma ativação secundária do sistema glutamatérgico e a uma excitotoxicidade no hipocampo e outras estruturas. Eletrograficamente, as crises desencadeadas pela PILO caracterizam-se por descargas epileptiformes hiper-síncronas, de alta amplitude e em surtos de espículas (5-12 Hz), originadas normalmente no hipocampo, com propagação para o córtex. Tais caracteres eletroencefalográficos denotam a origem límbica das crises, provavelmente surgidas no hipocampo. Em análise eletrofisiológica de fatias cerebrais (estudos *in vitro*) são evidenciadas nesse modelo da PILO descargas interictais evocadas e espontâneas, geradas no hipocampo. (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000)

Sabe-se também que, na fase crônica do modelo da PILO, os animais respondem satisfatoriamente ao tratamento antiepiléptico (fenobarbital, carbamazepina, etc.) utilizado em humanos. Todos estes fatos reforçam as ligações entre a ELT humana e as alterações provocadas pelo uso de pilocarpina sistêmica.

1.6 Uso de fatias de cérebro (“Brain Slices”) para o estudo da LTP

A maior parte das pesquisas que objetivam estudar o fenômeno da LTP o fazem através da análise fisiológica da sinapse em finas fatias de cérebro. As preparações de fatias cerebrais foram primeiramente descritas por Mc Ilwain e colaboradores, nos anos 50, com o objetivo de estudar a bioquímica do sistema nervoso central (TEYLER, 1980). Fatias cerebrais possuindo em média 70 a 400 μM de espessura são preparadas através da rápida remoção cerebral e sua imersão em uma solução salina, sendo que o seccionamento do tecido é feito por um tipo de micrótomo. A partir desse momento, a fatia é colocada em uma câmara de registro onde irá circular uma solução salina oxigenada (KANDEL et al, 2000).

A técnica das fatias cerebrais (“*brain slices*”) é particularmente útil para a análise da atividade eletrofisiológica hipocampal devido a manutenção do circuito neuronal intrínseco ao tecido, que permanece intacto na fatia transversa (ZIGMOND et al 1999). A LTP e a atividade epileptiforme podem ser induzidas *in vitro* em fatias cerebrais. Nesta técnica é possível a visualização do local de estimulação bem como dos registros extra e/ou intracelulares. Outra possibilidade apresentada por esta técnica é de manipulação do meio externo através da modificação da concentração iônica (HENDERSON, 1993). Os modelos de epilepsia *in vitro* mais freqüentemente utilizados envolvem a estimulação elétrica repetitiva, ou a manipulação da composição iônica do meio de perfusão tais como modificações na concentração do Ca^{2+} , K^{+} e Mg^{2+} ou a aplicação de quimioconvulsivantes (DA COSTA et al, 1998).

Registros a partir de fatias cerebrais têm sido usados para investigar aspectos variados da função neuronal em mamíferos, incluindo a resposta neuronal aos diferentes neurotransmissores e neuromoduladores, bem como as propriedades de canais isoladamente. A informação obtida a partir de registros feitos em fatias cerebrais tem possibilitado achados importantes em alguns assuntos como a

plasticidade sináptica , os mecanismos da epilepsia e a ação de drogas no cérebro (KANDEL et al, 2000).

Entre as principais vantagens da técnica de fatias cerebrais para o registro da atividade neural, podendo se estender ao estudo da ELT temos: 1) a possibilidade de registros eletrofisiológicos mais estáveis os quais abrangem até mesmo finos processos neuronais, como os dendritos, o que pode ser devido à inexistência de mecanismos pulsáteis resultantes da respiração ou do bombeamento sanguíneo; 2) a visualização direta de neurônios individualizadamente (possibilitada por microscópios suficientemente equipados) o que permite sua identificação de acordo com a sua morfologia ou com suas projeções eferentes (SANABRIA et al, 1997). Para outros autores, a técnica de fatiamento tem suas desvantagens, entre elas, o fato de o tecido estar completamente isolado do influxo neural e hormonal, entre outros eventos que somente ocorreriam em estudos *in vivo* (KNOWLES et al, 1992).

1.7 Neo-Timm

Aproximadamente 2/3 dos indivíduos que sofrem de epilepsia do lobo temporal apresenta lesões em um ou em ambos os hipocampos (MELDRUM & BRUTON, 1992). Embora a natureza da lesão hipocampal decorrente de crises epiléticas possa variar de indivíduo para indivíduo, a degeneração das células piramidais de CA1 e células polimórficas do giro de denteado (região hilar), esclerose e proliferação glial são mais comumente observadas em técnicas histológicas específicas. Este quadro também pode ser observado em outras doenças e síndromes neurológicas, tais como a isquemia global, a esclerose amiotrófica lateral e a doença de Alzheimer (SANABRIA et al, 1997).

No caso da EH, nas regiões do corno de Amon a distribuição da perda neuronal é irregular, com morte significativa de neurônios em CA1, razoável em CA3, e relativa preservação dos neurônios piramidais em CA2, conforme descrito anteriormente. Os neurônios granulares do giro denteado não têm redução expressiva em seu número, assim como os neurônios dos córtices subicular e entorrinal (BABB et al, 1984; OKAZAKI et al, 1995). Quanto aos receptores de membrana, sabe-se que a EH atinge principalmente alguns receptores dos tipos AMPA e caínico, que normalmente são permeáveis apenas a cátions monovalentes.

Ao tornar-se permeáveis também ao cálcio, os mesmos passam a ser denominados canais Ca^{2+} -A/C (WEISS & SENSI, 2000). Os canais Ca^{2+} -A/C são permeáveis também a zinco, e sob condições de grande liberação sináptica desse íon, como ocorre na epilepsia e na isquemia, o Zn^{2+} pode translocar-se através da sinapse, acumulando-se no neurônio pós-sináptico (FREDERICKSON et al, 1989). O aumento da concentração citoplasmática de Zn^{2+} e também de Ca^{2+} leva a uma despolarização mitocondrial e a uma produção intensa de espécies reativas de oxigênio que causam a morte neuronal (SENSI et al, 1999).

A EH, além de estar associada a uma perda neuronal maior nos sub-campos CA1 e CA3 hipocâmpais, está relacionada ao surgimento de terminais ricos em zinco, revelado por autometalografia de neo-Timm, no *stratum moleculare* interno do giro denteado, o que tem aparecido em estudos com tecido epiléptico humano (BABB et al, 1991), bem como em vários modelos animais de epilepsia (MELLO et al., 1993). Esses terminais aberrantes resultariam do brotamento das colaterais das fibras musgosas normalmente lançadas no *stratum moleculare* interno pelos neurônios granulares do GD (TAUCK & NADLER, 1985; BABB et al, 1988 e SUTULA et al, 1989). Desde a sua descrição (FROTSCHER & ZIMMER, 1983), em um tecido não epiléptico, as evidências acumuladas sugerem um papel para o brotamento das fibras musgosas na excitabilidade e nas crises em humanos e em modelos animais de ELT (BABB et al, 1991; COULTER et al, 1996; LEMOS & CAVALHEIRO, 1995).

Todo o sistema límbico possui muitos neurônios glutamatérgicos com terminais ricos em zinco, especialmente a formação hipocâmpal e o complexo amigdalóide. Assim como os neurotransmissores, os íons de zinco livres no citoplasma são acumulados no interior de vesículas sinápticas pela atividade de um transportador vesicular específico e liberados na fenda sináptica em conjunto com o glutamato. A ação neuromodulatória do zinco ainda é pouco compreendida, envolvendo receptores NMDA e GABA (TAKEDA, 2000).

O brotamento das fibras musgosas é observado também no *stratum moleculare* interno no eixo transversal e septo-temporal (BUCKMASTER & DUDEK, 1999) do giro denteado de roedores que sofreram abrasamento (SUTULA et al., 1988), após a injeção de ácido cáinico (WENZEL et al., 2000) ou de pilocarpina (CAVALHEIRO et al, 1996). Um brotamento dendrítico também ocorre nos neurônios granulares na epilepsia. Os dendritos basais ocorrem em dez por cento dos

neurônios granulares de primatas, mas são muito raros em roedores (SERESS & FROTSCHER, 1990).

Em animais experimentais e pacientes epiléticos, os dendritos basais são encontrados em 5% e 30% respectivamente, dos neurônios granulares do GD (RIBAK et al, 2000). Este dados levam à hipótese de que o brotamento axonal e dendrítico e a resultante reorganização sináptica em vias do sistema límbico podem contribuir para o desenvolvimento e a recorrência de crises, onde determinadas vias hipocampais poderiam tornar-se suscetíveis a eventos epileptogênicos.

1.8 Hipóteses de trabalho

Na epilepsia do lobo temporal acompanhada de esclerose das estruturas mesiais, notoriamente do hipocampo, existem evidências de patologia progressiva acompanhada de eventuais descargas epilépticas contralaterais ao foco epiléptico. A identificação de mecanismos morfofisiológicos em comum entre epilepsia e LTP, conforme descrito anteriormente, levou-nos a três hipóteses para o presente estudo:

1) a de que recorrência de descargas epilépticas excitatórias na ELT poderia favorecer a indução da LTP hipocampal, o que já fora demonstrado em alguns modelos experimentais de epilepsia *in vivo* como, por exemplo, o do ácido caínico (BERNARD & WHEAL, 1995; MANGAN & BERTRAM, 1998) e o do abrasamento (ou “kindling”) (SLATER et al, 1985; RACINE et al, 1991), mas não com o da PILO, que é considerado o modelo que mais se assemelha à ELT humana (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000);

2) a de que obtenção da LTP poderia estar prejudicada na ELT induzida pela pilocarpina, visto as evidências sugestivas de que o hipocampo está ativo na consolidação da memória, da relação entre memória e LTP (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; MALENKA & NICOLL, 1999), e das alterações na integridade hipocampal que ocorrem nesse modelo de ELT (MELLO et al, 1993; CAVAZOS & SUTULA, 1990). Sabe-se que ratos submetidos à injeção de pilocarpina apresentam déficits na memória espacial e de trabalho (WU et al, 2001);

3) a de que o tempo de epilepsia poderia interferir tanto na hipótese n.1 como na hipótese n.2.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar no modelo experimental de Epilepsia de Lobo Temporal (ELT) induzido pela pilocarpina, em ratos, se existe alteração na potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo, e se tais alterações sofrem influência do tempo de epilepsia.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Quantificar a amplitude e a inclinação (“*slope*”) do potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) na região de CA1 em fatias de hipocampo de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina, antes e após a estimulação tetânica;
- 2) Induzir e quantificar a potenciação de longa duração em fatias de hipocampo de ratos com diferentes tempos de epilepsia (30, 60 e 90 dias) induzida pela pilocarpina;
- 3) Comparar a potenciação de longa duração obtida em animais controles e animais com epilepsia induzida pela pilocarpina;
- 4) Comparar a potenciação de longa duração obtida entre os animais epiléticos, de acordo com tempos distintos de epilepsia (30, 60 e 90 dias);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o presente estudo foram utilizados, ao todo, 62 ratos machos, da linhagem Wistar, que pesavam entre 90 e 120 gr, com 30 dias de vida. Todos os animais foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, receberam ração e água *ad libitum*, e foram mantidos em ambiente com temperatura aproximada de 25° C e ciclo claro-escuro de 12 horas, no Biotério do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, durante a realização dos experimentos. Os animais foram filmados em sistema VHS em suas próprias gaiolas durante 6 horas de cada ciclo. Os animais analisados não apresentavam nenhuma propensão genética para crises convulsivas espontâneas.

3.2 Delineamento Experimental

Para o presente estudo, foram estabelecidos 6 grupos:

Grupos	Definição	Período após injeção de Pilocarpina ou Sol. Salina (idade do animal)
Grupos Controles		
Grupo I	Não-epilépticos (n=6)	30 dias SALINA (60 dias de vida)
Grupo II	Não epilépticos (n=6)	60 dias SALINA (90 dias de vida)
Grupo III	Não epilépticos (n=9)	90 dias SALINA (120 dias de vida)
Grupos Experimentais		
Grupo IV	Epilepsia de curta duração (n= 8)	30 dias PILO (60 dias de vida)
Grupo V	Epilepsia de média duração (n= 5)	60 dias PILO (90 dias de vida)
Grupo VI	Epilepsia de longa duração (n=6)	90 dias PILO (120 dias de vida)

Tabela 1: Constituição dos grupos estudados a partir do tempo após a injeção de pilocarpina (PILO) ou após a injeção de solução salina (SALINA). Obs.: o número de animais (n) refere-se à amostra final estudada.

3.3 Modelo de epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina

Visando a obtenção de *status epilepticus* (SE), injetou-se nos grupos experimentais, via intraperitoneal, cloridrato de pilocarpina (PILO, Sigma, 380 mg/Kg) entre o 30º e o 35º dia de vida. Tal procedimento seguiu o protocolo de indução de epilepsia de lobo temporal (ELT) por pilocarpina desenvolvido por Cavalheiro (CAVALHEIRO, 1991).

Previamente à administração de pilocarpina (30 minutos antes), os animais receberam uma injeção (sc) de metil-escopolamina (MS, 1mg/Kg). A MS, um antagonista colinérgico que não ultrapassa a barreira hematoencefálica, foi utilizada com o objetivo de minimizar os efeitos colinérgicos periféricos da PILO.

Em seguida da injeção de PILO, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico, onde tiveram seu comportamento filmado ou analisado por pelo menos 3 observadores treinados durante sessenta minutos. As alterações comportamentais ocasionadas pela PILO foram classificadas de acordo com a escala de Racine (RACINE,1972) (Tabela 2).



Figura 4: Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina

MS- Metil Escopolamina

DZ- Diazepam

Pilo- Pilocarpina

CER- Crises Espontâneas Recorrentes

ESCALA DE RACINE (1972)

Grau	Alteração Comportamental
0	Imobilidade
1	Automatismos faciais
2	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonias de patas anteriores
4	Clonias de patas posteriores
5	Elevação e queda

Tabela 2 : Escala de Racine (Racine, 1972) contendo os graus de respostas dos animais à injeção de PILO.

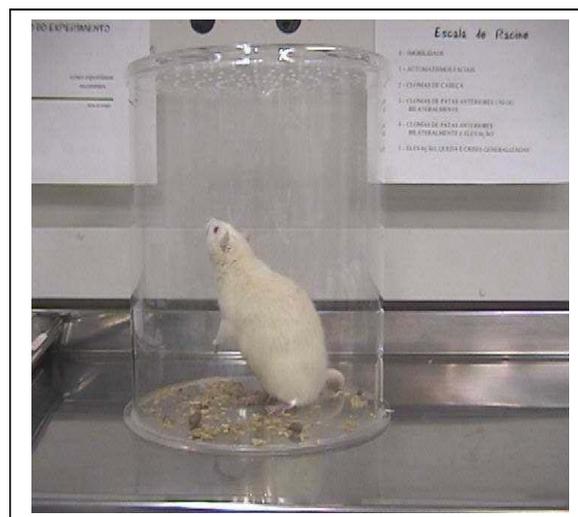


Figura 5: Demonstração de animal em SE agudo atingindo o grau 5 na escala de Racine (1972).

Observamos como manifestações de crise uma acinesia, a qual podia ser seguida de ereção dos pelos, automatismos orofaciais e de extremidades, tremores, clonias de cabeça e pescoço, clonias de patas posteriores e anteriores (o que podia aparecer de forma isolada), elevação e queda (Figura 5). Foram também observados salivação e falha no controle esfinteriano. Considerou-se como critério para SE, a persistência de crises contínuas por no mínimo 30 minutos (CAVALHEIRO, 1991, MELLO et al, 1993).

Injetou-se intraperitonealmente Diazepam, na dose de 4mg/Kg, 1 hora após a administração da pilocarpina, com o objetivo de abortar as crises convulsivas evitando possíveis complicações decorrentes de um SE prolongado, e limitando o tempo de SE à 60 minutos (padronização do grupo experimental) (SANABRIA, 1999).

Após a injeção de Diazepam, os animais eram transferidos da caixa de acrílico para suas gaiolas, onde passavam a receber auxílio em sua limpeza, na reposição hídrica (através do oferecimento de água via oral e injeção sub-cutânea de solução salina), e tinham sua alimentação acrescida de banana como um repositor de potássio. Tais cuidados eram realizados durante um período de 5 dias, sendo também oferecido calor às gaiolas durante os dois primeiros dias após tal procedimento.

À fase aguda do modelo seguiu-se de um período de ausência de crises comportamentais (período silencioso), que variou entre 10 e 15 dias. Passado esse período, os animais iniciaram as crises espontâneas e recorrentes (em uma média de 3 a 5 crises por semana). A partir desse momento o animal era considerado epilético crônico (Figura 4) (SANABRIA, 1999).

Os animais foram previamente marcados em diferentes locais do corpo com tinta preta à base de ervas naturais, não alérgica e foram alojados no biotério do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, em gaiolas de frente transparente para que pudessem ter suas crises filmadas sem a necessidade de remoção do seu ambiente. Suas crises eram filmadas por um período de 12 horas (6 horas do ciclo claro: 14:00 às 20:00; e 6 horas do ciclo escuro: 24:00 às 6:00).

Passados os períodos de 30, 60 ou 90 dias da indução de ELT, os animais foram sacrificados, e tiveram seus hipocampos removidos e fatiados para o registro eletrofisiológico e indução da LTP. Para os animais que constituíram os grupos controles, o mesmo procedimento foi realizado, substituindo-se a injeção intraperitoneal de pilocarpina pela injeção de solução salina (soro fisiológico 0,9%) (Figura 6). Ambos os grupos (experimentais e controles) foram alojados no mesmo ambiente e sob mesmas condições de instalação.

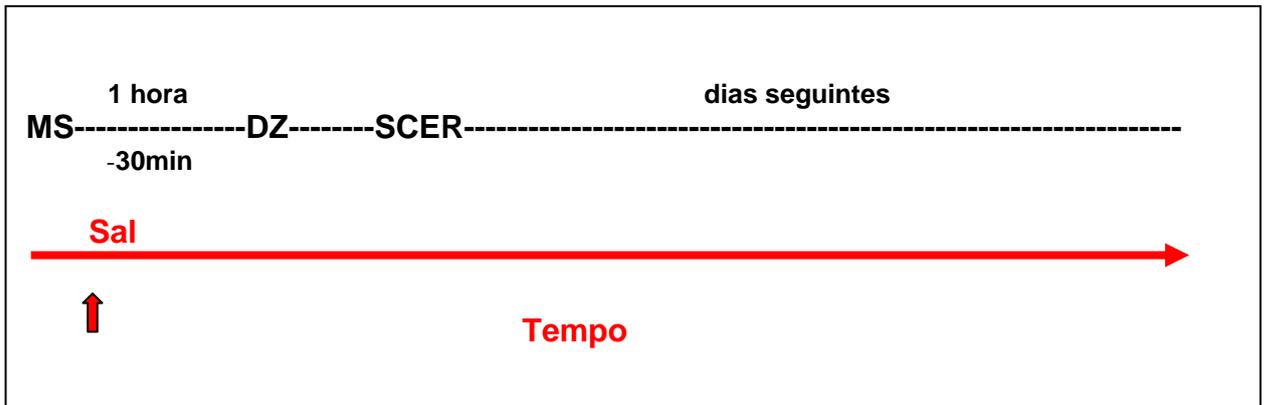


Figura 6. Delineamento Experimental dos grupos controles

MS- Metil Escopolamina

Sal- Solução salina

DZ- Diazepam

SCER- Sem crises Espontâneas Recorrentes

3.3.1. Mortalidade pela pilocarpina e constituição da amostra analisada

Mesmo tomando os cuidados acima descritos, alguns animais evoluíram para o óbito nos primeiros minutos da injeção de pilocarpina ou nos dias subsequentes. Os animais sobreviventes que receberam pilocarpina, mas que não atingiram uma pontuação mínima de 3 na escala da Racine (n= 10) foram excluídos deste estudo. Assim, somente os animais que atingiram os graus 3, 4 e 5 nesta escala constituíram os grupos experimentais. O número de animais que chegava ao grau máximo dessa escala era variável, de acordo com o grupo injetado.

Dados da literatura associam uma mortalidade aproximada de 8% ao modelo da injeção sistêmica de pilocarpina. Por este motivo buscou-se inicialmente um número maior de animais para constituição do grupo experimental em relação ao grupo controle.

3. 4 Equipamentos utilizados para a técnica de fatias cerebrais

- Guilhotina (Insight Equipamentos).
- Vibrátomo- “Vibroslice” (Campden Instruments, EUA- modelo Vibroslice 752 M).
- Microscópio Estereoscópio (Jena, Alemanha).

3.5 Fatias cerebrais

Decorridos os períodos de 30, 60 e 90 dias após a injeção de pilocarpina ou solução salina, com um intervalo variável de 5 dias para mais ou para menos, os animais foram sacrificados, tendo seus encéfalos removidos e fatiados. Após o isolamento do hipocampo, as fatias hipocampais foram levadas para a câmara de registro para indução da potenciação de longo prazo na região de CA1.

Para o sacrifício, todos os animais foram pesados, receberam anestesia com Tiopental (40mg/Kg) e foram decapitados mediante o uso de uma guilhotina. Após a decapitação, era feita a abertura do crânio, realizando-se os cortes demonstrados na figura 8, com o auxílio de uma pequena tesoura. Através de uma espátula, o encéfalo era removido da caixa craniana (Figura 9).

Em seguida, o encéfalo era submerso em líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa) do tipo dissecação (Ringer de dissecação) em baixa temperatura (entre 0 e 4° C) com regular oxigenação, sendo rapidamente fixado na plataforma do vibrátomo (Vibroslice modelo 752 M -Campden Instruments, EUA). Para a fixação do tecido à plataforma, este foi primeiramente colado em uma lamínula (na porção inferior), e encostado em um colchão de ágar (na porção posterior). Tal procedimento evitava que o tecido fosse deslocado pela lâmina do vibrátomo durante o fatiamento. Uma mistura gasosa (95% de O₂/ e de 5% CO₂) era fornecida na cuba do vibrátomo durante a obtenção das fatias axiais de 400 µm do hipocampo. Estas eram colocadas em repouso em um recipiente com LCRa normal (Ringer

Normal) de perfusão em temperatura ambiente (aproximadamente 21° – 24° C) para dissecação manual do hipocampo em meio iluminado, sob microscópio estereoscópio (Jena, Alemanha) (Figura 10). Uma vez separadas as fatias hipocampais, estas ficavam em repouso em um recipiente contendo LCRa normal sob oxigenação constante para posteriormente serem levadas à câmara de registro, especial para os registros eletrofisiológicos mantendo-se a perfusão contínua de LCRa normal sob oxigenação com mistura de 95% de O₂/ e de 5% CO₂. A temperatura da câmara era mantida em 34° C por meio de uma termoregulador acoplado à mesma. Tais procedimentos são resumidos abaixo na figura 7.

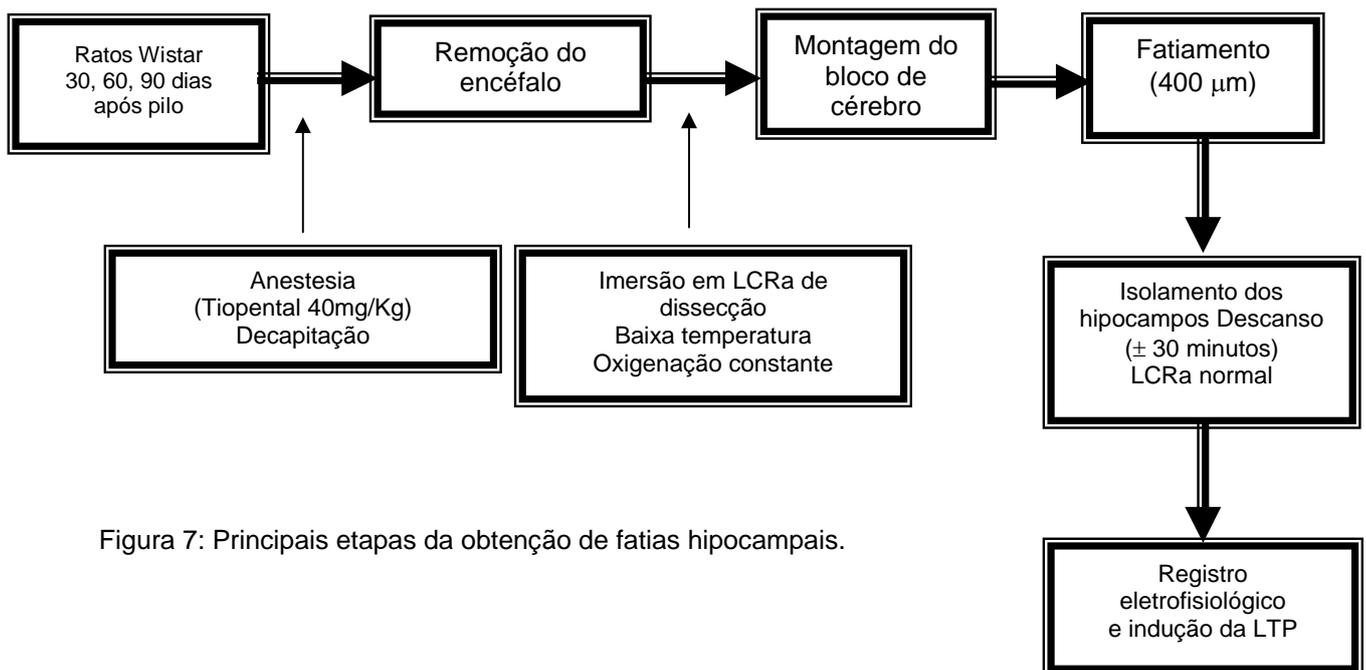


Figura 7: Principais etapas da obtenção de fatias hipocampais.

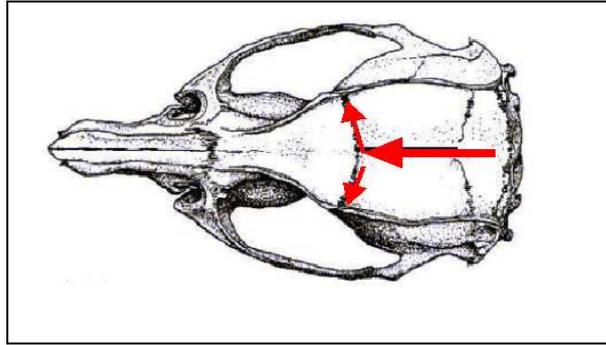


Figura 8: Sentido da abertura do crânio do rato.



Figura 9. Demonstração do encéfalo removido da caixa craniana para a realização da técnica das fatias cerebrais



Figura 10: Demonstração do isolamento dos hipocampus

3.6 Soluções de perfusão

A solução salina de Ringer também é referida na literatura como líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa) (HENDERSON, 1984). Duas espécies de LCRa foram utilizadas neste estudo: o LCRa normal, a 34° C, que era usado para o descanso das fatias no momento pré-registro, e o de dissecação, a 4° C, no qual o encéfalo era submerso somente logo após a decapitação e remoção do encéfalo da caixa craniana, sofrendo uma espécie de choque térmico para posterior fatiamento.

A composição para o LCRa de dissecação era, em mM: NaCl- 124; KCl- 2; KH₂PO₄ - 1.25; MgSO₄ -5; CaCl₂- 0.2; NaHCO₃- 26; D-Glicose- 10, em pH de 7.4 (AVOLI et al, 1989). Em comparação ao LCRa normal, este possuía baixo cálcio e alto magnésio, para evitar o estresse celular. Para o LCRa normal, de descanso, a composição era, em mM: NaCl- 124; KCl- 2; KH₂PO₄ - 1.25; MgSO₄ -2; CaCl₂- 2; NaHCO₃- 26; D-Glicose- 10, em pH de 7.4.

3.7 Equipamentos utilizados para o registro eletrofisiológico e indução da LTP

Os equipamentos de registro e estimulação eram compostos de: 1 câmara de perfusão e registro de interface de fabricação própria, um gerador de pulso programável Master 8 (A.M.P.I), um pré- amplificador diferencial Headstage (Axon Instruments) com ganho unitário, um fixador de corrente AxoClamp 2B (Axon Instruments), um condicionador de sinais CyberAmp 320 (Axon Instruments), um conversor do sistema analógico em digital Digidata 1322A (Axon Instruments), um microcomputador (Dell), onde se utilizou como software de registro e mensuração da amplitude do PEPS e do slope o AxoScope9 (Axon Instruments) e para construção dos gráficos, o Origin 5.0 (Microcal™ Software, Inc.) . Micromanipuladores do tipo manual e motorizado MP285 (Sutter Instrument Company) foram usados para o adequado posicionamento dos eletrodos de registro e de estímulo, respectivamente. Além disso, para uma adequada visualização da fatia hipocampal e suas regiões utilizou-se sobre a cuba um microscópio de mesa (MU m 19. D.F.Vasconcellos) (Figuras 11 e 12).

Com o objetivo de impedir a trepidação dos eletrodos durante atividade de base e indução da LTP os registros foram feitos numa mesa com sistema livre de vibração com circulação interna de gás nitrogênio (TMC- Technical Manufacturing Corporation). Sobre a mesa e ao redor da cuba e dos eletrodos foi posicionada uma gaiola de Faraday (TMC) para proteção de ruídos eletromagnéticos de 60 Hz produzidos pelos equipamentos eletroeletrônicos do ambiente (Figura 12).

As micropipetas de registro (capilares de boro-silicato com diâmetro externo de 1.5 mm e diâmetro interno de 1.12 mm) foram fabricadas com o auxílio de um estirador de micropipetas MP-87 (Sutter Instrument Company).

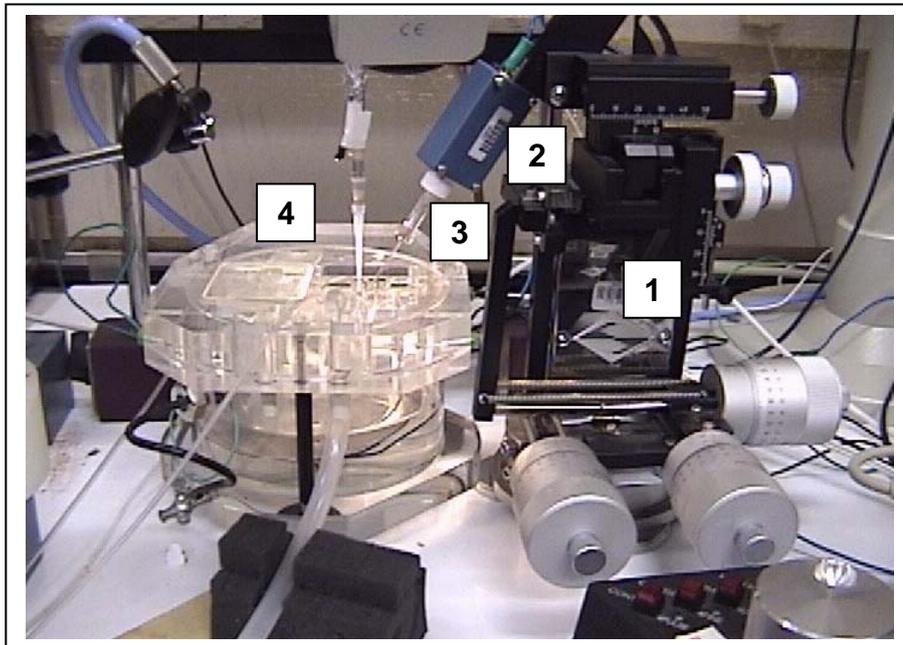


Figura 11: Câmara de registro com: (1) micromanipuladores, (2) circuito microamplificador "Headstage", eletrodos de (3) registro e de (4) estímulo.

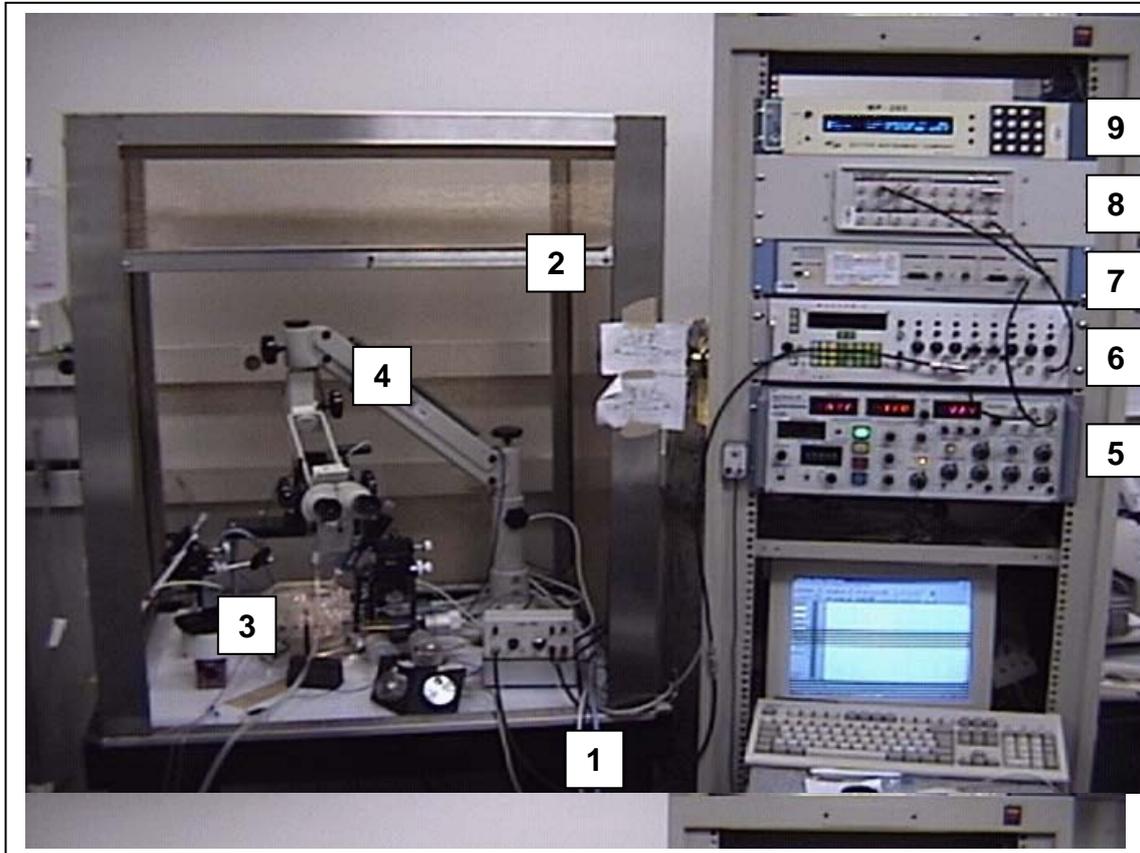


Figura 12: Equipamento (“SETUP”) de eletrofisiologia com: (1) mesa antivibracional, (2) gaiola de Faraday, (3) câmara de registro, (4) microscópio de mesa, (5) amplificador AXOCLAMP-2B, (6) Master-8, (7) CyberAmp 320 (8) Digidata 1322A (9) MP285 .

3.7.1 Resumo do procedimento de registro dos PEPSs de campo e de indução da LTP nas fatias hipocampais dos grupos estudados

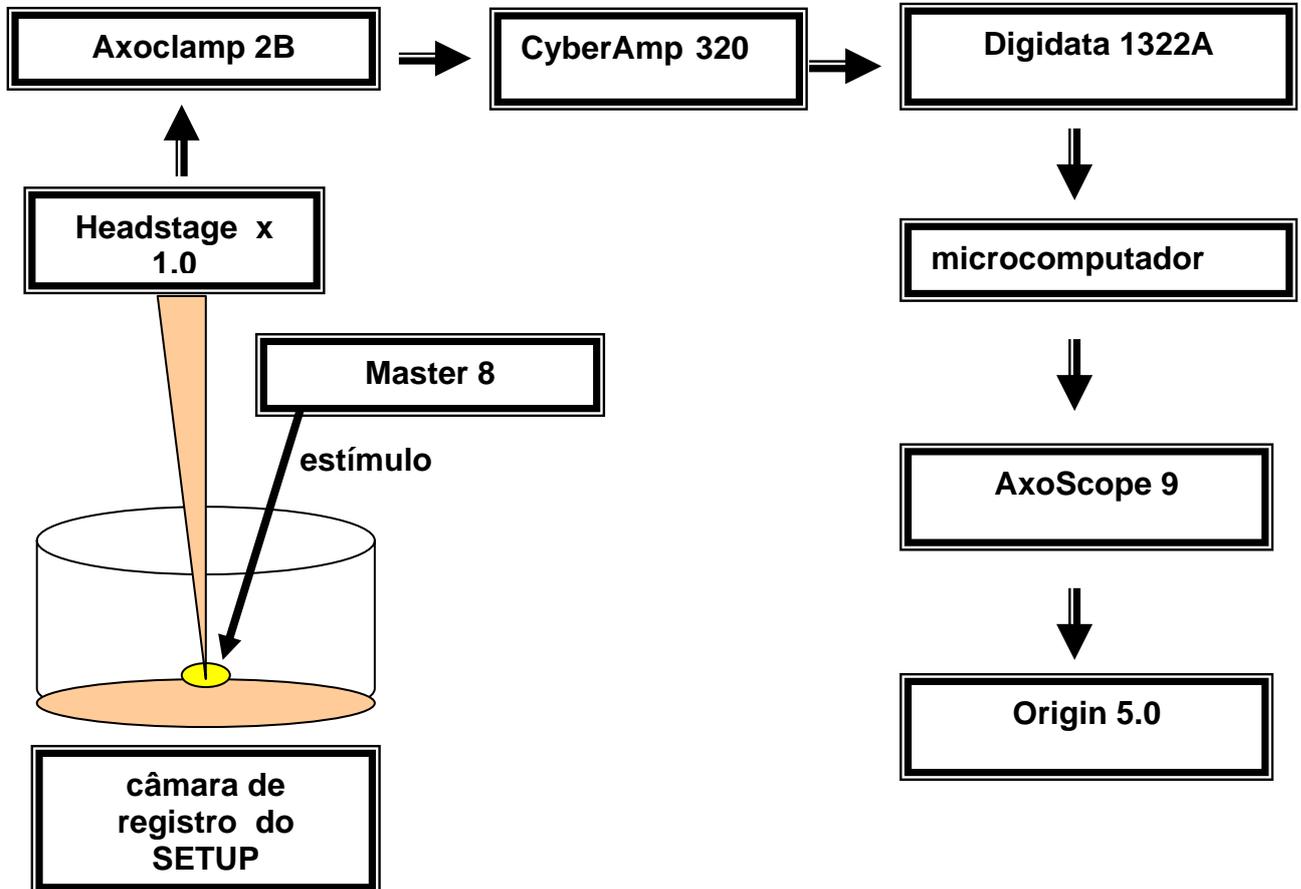


Figura 13: Organização dos equipamentos utilizados para a obtenção dos registros dos PEPSs de campo e indução da LTP em ordem de uso. Sobre a fatia hipocampal, são dados estímulos elétricos a partir de um gerador de pulso programável, o Master 8. O sinal obtido pela micropipeta, na câmara de registro, é amplificado pelo pré-amplificador diferencial Headstage, com um ganho unitário, sendo a corrente fixada pelo Axoclamp 2B. Através do CyberAmp 320, os sinais são condicionados para serem convertidos do sistema analógico para o sistema digital pelo Digidata 1322A. A partir daí, eles são identificados pela tela do microcomputador, onde se utiliza como software de registro e mensuração do PEPS o Axoscope 9. Para a construção de gráficos relativos a todo o experimento, os dados são transportados deste software para um outro, o Origin 5.0.

3. 8 Técnica de indução da LTP em CA1

Aproximadamente trinta minutos após a obtenção das fatias hipocampais, iniciava-se o estudo eletrofisiológico. Para isto, os tecidos hipocampais eram levados à câmara de registro isoladamente (Figura 13). Nos casos em que não se havia utilizado um dos hemisférios para a técnica histológica do neo-Timm, buscava-se o registro em fatias de ambos os hemisférios no estudo de cada animal. Para a indução de LTP era posicionado na via colateral/ comissural de Schaffer da região de CA3, um microeletrodo bipolar de arame fino de platina-irídio com diâmetro interno de 75 μm e externo de 140 μm , isolado externamente com teflon, exceto em suas pontas. Para o registro extracelular do estímulo dado, posicionava-se na região do *stratum radiatum* de CA1 um micropipeta (capilar) de boro-silicato com resistência máxima de 0,1 a 10 MOhms, preenchida com LCRa normal. Os estímulos foram inicialmente aplicados a uma frequência de 0.05 Hz e a uma corrente de 60 μA , com polaridade positiva. Durante trinta minutos buscou-se por uma estabilidade na amplitude da resposta do PEPS, o que foi denominado de atividade de base. Através da amplitude média das respostas iniciais é que se poderia reconhecer o aumento percentual na resposta no período pós- estimulação tetânica. Esta era dada por meio de 4 trens de 100Hz em mesma amperagem e em intervalos de 20 segundos cada, seguindo-se o protocolo de indução da LTP de Bliss & Lømo (1973) (Figura 14).

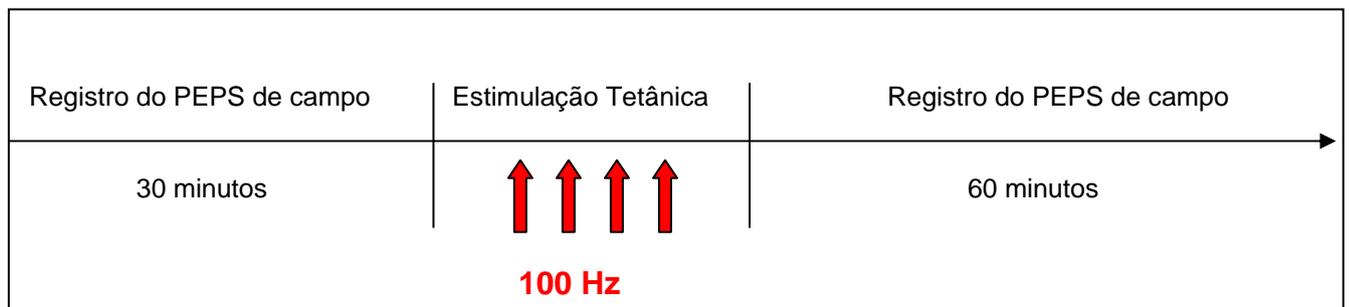


Figura 14. Modelo de indução da LTP nas fatias analisadas

3.9 Estudo histológico pela técnica de neo-Timm como confirmação do comprometimento hipocampal

Visando identificar uma alteração na integridade hipocampal decorrente do quadro de ELT induzida pela pilocarpina, realizou-se a técnica histológica de neo-Timm. O brotamento nos terminais axonais (“sprouting”) de células hipocampais do giro denteado, observado através dessa técnica, serviu-nos como um marcador de modificação estrutural, indicando que os tecidos de animais dos grupos com epilepsia haviam sofrido SE e crises epilépticas recorrentes. A obtenção dos hipocampus para esta análise, caracterizou-se pelas etapas a seguir descritas.

Logo após a etapa de decapitação dos animais e remoção do encéfalo para fatiamento, ainda na formação do bloco, realizou-se a separação dos hemisférios cerebrais, onde um hemisfério era reservado para registro eletrofisiológico, e o outro era submerso em uma solução de sulfeto de sódio (Na_2S) 0,1% não hidratado, diluído em solução tampão Millonigs 0,1M por um período mínimo de 48 horas. A intenção de deixar o cérebro submerso por um tempo relativamente longo devia-se ao fato que esses animais levados para análise histológica não poderiam passar pelo processo de perfusão geralmente aplicado, pois isto impediria o procedimento eletrofisiológico. Passado este período, o tecido era submerso em solução de paraformaldeído (PFA) a 4% em solução tampão de fosfato (PBS) 0,1M por 48 horas. A etapa seguinte, de crioproteção, era feita em solução de sacarose 20% em PBS 0,1M. O hemisfério era então congelado em isopentano líquido a uma temperatura de aproximadamente -30°C . Ao remover o tecido congelado, este era armazenado em um freezer a -70°C . Fatias de $30\ \mu\text{m}$ foram cortadas em criostato a uma temperatura de -20°C . Uma vez que as fatias eram aderidas às lâminas histológicas, estas eram armazenadas em um congelador a -20°C .

A revelação das fatias foi realizada em uma sala escura, e constituiu-se de uma etapa de submersão das lâminas histológicas em uma cuba contendo goma arábica, solução A (ácido cítrico- 10,25 g/ citrato de sódio- 9,45g diluídos em 22 ml de água destilada), solução B (hidroquinona- 3,73 em 90 ml de água destilada) e 1,5 ml de solução de nitrato e prata a 17% , por um período de 90 minutos. Todas as soluções foram misturadas e preparadas, com exceção da goma arábica, no momento da revelação, sendo adicionadas na cuba na mesma seqüência acima

descrita. Finalizado o tempo para a coloração, retirou-se o suporte de lâminas da cuba, mergulhando-o em uma caixa com água corrente a 21° C para a sua limpeza. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em cubas contendo etanol 70%, etanol 95% e etanol 100% por um tempo de 5 minutos, e finalmente no xilol, onde somente eram removidas para a colagem da lamínula com o auxílio de bálsamo do Canadá.*

3.10 Análise dos dados

A análise dos resultados obtidos foi realizada com o auxílio dos seguintes programas: Excel (Microsoft ® Excel97), AxoScope 9, Origin 5.0 (Microcal ™ Software, Inc., EUA) e SPSS. O presente estudo inclui um trabalho eletrofisiológico e outro histológico. Os achados de cada técnica são analisados de forma diferente, conforme abaixo descrito. Para a parte eletrofisiológica buscou-se comparar os dois grupos entre si (controles X epiléticos) e o tempo de epilepsia (30, 60 e 90 dias após injeção de pilocarpina X solução salina).

3.10.1 Análise da indução da LTP em CA1

Como critérios para a análise da LTP na região de CA1 hipocampal foram consideradas duas medidas referentes ao potencial pós-sináptico excitatório (PEPS) de campo : 1) a mudança percentual na amplitude no PEPS após estimulação tetânica; 2) a mudança percentual na inclinação ("slope") dessa mesma resposta. Para os casos em que se realizou dois experimentos por rato foi feita uma média das respostas obtidas para cada um dos minutos analisados, em ambos os experimentos (SANDERS et al, 2000; ANDERSON & COLLINGRIDGE, 2001; SARIHI et al, 2002) .

Define-se como amplitude do PEPS a distância vertical, em milivolts (mV), existente entre a linha de base da resposta previamente ao estímulo e o pico mais

negativo após o estímulo (Figura 15). Esta distância foi medida com o auxílio do software AxoScope 9.

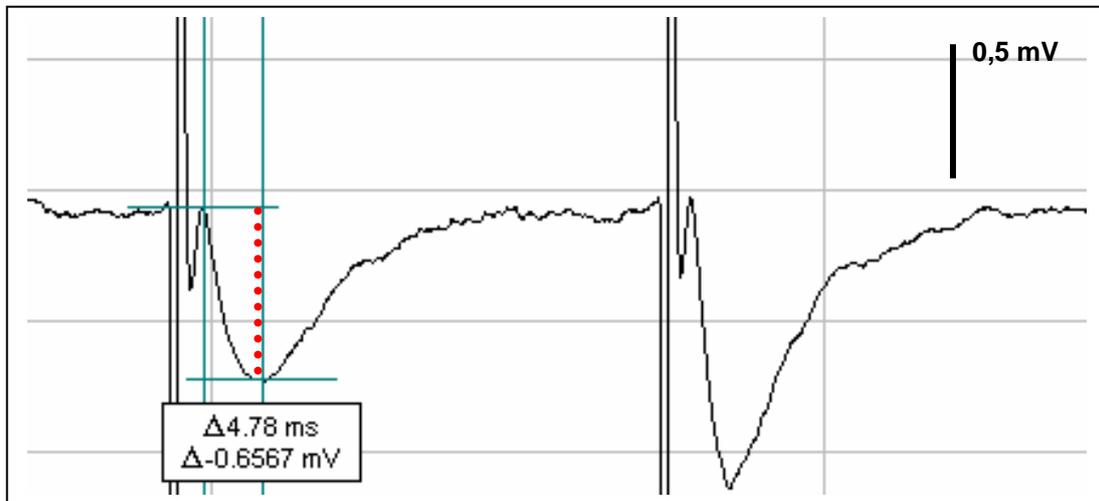


Figura 15: Demonstração da medida da amplitude do PEPS de campo (traçado vermelho; 0,6 mV) no software (AxoScope 9) utilizado para o registro eletrofisiológico.

Para o presente estudo, considerou-se ter havido a indução de LTP se a resposta permanecesse estável e aumentada em no mínimo 40% (ponto de corte) da resposta inicial por um período mínimo de 30 minutos e máximo de 50 a 60 minutos após a estimulação tetânica. O índice de 40% surgiu de uma adaptação das respostas obtidas após estimulação tetânica por Bliss & Lømo (1973). Alguns minutos desse período pós-tétano foram tomados como marcos para verificação do estado de excitabilidade e de estabilidade da resposta (SANDERS et al, 2000). Estes minutos foram : 1°, 5°, 30° e 60° após o tétano. Realizou-se uma média dos 10 registros correspondentes ao período aproximado que compreendia cada um desses minutos. Cada minuto incluía 3 PEPS, visto que os intervalos entre estímulos pré- e pós-tetânico eram de 20 segundos. As médias incluem também os valores próximos dos minutos estabelecidos. No caso dos experimentos que foram concluídos antes do minuto 60°, fez-se um cálculo dos dez últimos registros.

Para se estimar a mudança percentual na amplitude do PEPS, após estimulação tetânica, calculou-se a diferença percentual entre as amplitudes finais estabelecidas para cada minuto (1°, 5°, 30°, 60°) e a média obtida durante atividade de base (pré-tétano).

Para identificar diferenças entre os grupos controles e epiléticos, quanto às mudanças percentuais na amplitude do PEPS, foi realizada análise da variância de

(ANOVA) de duas vias, com modelo fatorial entre os tempos de epilepsia (30, 60 e 90 dias após a injeção de pilocarpina) e entre os seis grupos formados pela interação grupo (epiléptico ou controle) e tempo.

Para a amplitude do PEPS foi criada uma variável categórica do tipo “induziu LTP” ou “não induziu LTP”, onde atribuiu-se à ocorrência de indução aos experimentos em que houve um aumento percentual igual ou maior a 40% comparado ao percentual inicial (média pré-indução LTP). Para a análise foi feita uma regressão logística com variável resposta do tipo sim (valor 1) ou não (0) e dois fatores: tempo de epilepsia (30, 60 e 90 dias após a injeção de pilocarpina ou solução salina, no caso dos grupos controles) e grupo (epiléptico ou controle). O termo de interação foi eliminado do modelo por apresentar resultado não significativo. Para a análise da amplitude foram utilizados os 40 animais que compunham todos os 6 grupos.

3.10.2 Análise da mudança percentual na inclinação (“*slope*”) do PEPS

O “*slope*”, ou inclinação, do PEPS foi definido como a inclinação máxima entre a linha de base e o pico mais negativo da resposta (SARIHI et al, 2002). Para a obtenção dos “*slopes*” aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{Y2-Y1}{X2- X1}$$

Considerou-se como Y2 – Y1 como a variação entre as amplitudes (inicial e final) de um mesmo PEPS, em milivolts (mV), e X2 – X1 o curso de tempo, em milissegundos (ms), entre o início e o final da inclinação máxima do PEPS. Para que a medida do “*slope*” fosse o mais precisa possível também contou-se com o auxílio do software AxoScope 9.

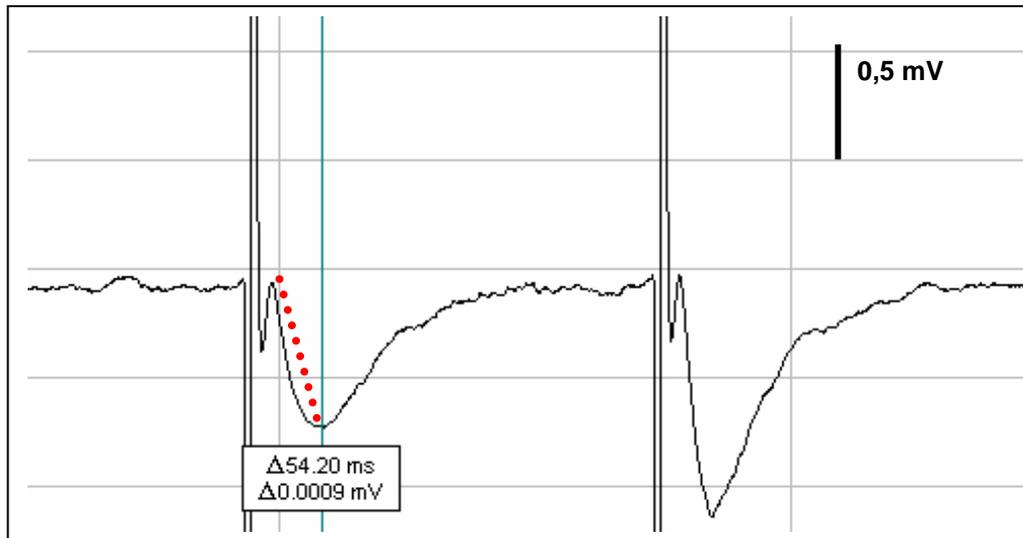


Figura 16: Demonstração da medida final do “slope” do PEPS de campo (traçado vermelho) no software (AxoScope 9) onde foi obtido o registro eletrofisiológico. O resultado final desta medida é dado pela aplicação da fórmula acima descrita.

Assim como no cálculo da amplitude do PEPS, para calcular o percentual de aumento do “slope” do PEPS de campo após a indução da LTP, comparou-se o aumento percentual deste parâmetro nos períodos 1^o, 5^o, 30^o e 60^o minutos após a indução da LTP, em relação à média obtida para os “slopes” durante a atividade inicial (pré-indução da LTP), a qual, neste caso, durou 20 minutos. O cálculo dos “slopes” médios correspondentes aos períodos aproximado de cada minuto procedeu-se do mesmo modo que para a amplitude.

Assim como para a amplitude do PEPS, para o cálculo das mudanças aumentos percentuais no “slope” do PEPS, foi realizada uma análise da variância (ANOVA) com modelo fatorial para identificar diferenças entre os grupos epiléticos e controles, entre os tempos de epilepsia (30, 60 e 90 dias após a injeção de pilocarpina) e entre os seis grupos formados pela interação grupo (epilético ou controle) e tempo. Por motivos técnicos (impossibilidade de medir mais precisamente a inclinação) a análise do slope foi baseada em 37 dos 40 animais.

3.10.3 Análise do brotamento neuronal evidenciado pela técnica de neo-Timm

Como medida histológica de alteração estrutural induzida pelo modelo da pilocarpina, verificou-se a ocorrência de brotamento neuronal (“sprouting”), em região próxima daquela onde se induziu a LTP (no giro denteado hipocampal). Para isto, foram utilizados os hemisférios contralaterais de uma amostra representativa dos animais analisados eletrofisiologicamente, e aplicada a técnica histológica de neo-Timm . A investigação em hemisférios diferentes (um para o estudo histológico e outro para o eletrofisiológico) de um mesmo animal fez-se possível pelo fato de o acometimento pela pilocarpina ocorrer bilateralmente, e pelo motivo de que as fatias hipocampais a sofrerem indução da LTP não poderiam passar pelos mesmos procedimentos necessários à técnica histológica. Os resultados obtidos com a técnica do neo-Timm foram submetidos a uma análise descritiva de acordo com os critérios “presença” ou “ausência” de brotamento neuronal na região estudada. Uma correlação com base nessa descrição foi feita entre os grupos (epiléptico ou controle) e os resultados observados.

4. RESULTADOS

4.1 Indução da epilepsia do lobo temporal pela injeção sistêmica de pilocarpina

4.1.1 Mortalidade pela pilocarpina e constituição da amostra estudada

Dos 39 animais injetados com pilocarpina, 3 (7,7%) evoluíram ao óbito nos primeiros minutos após a injeção, ou nos dias subseqüentes. Mesmo tendo recebido uma dosagem consideravelmente alta de pilocarpina (380 mg/Kg), 10 animais injetados não atingiram uma pontuação mínima de 3 na escala da Racine, sendo, portanto, excluídos dos grupos experimentais.

Além disso, tiveram de ser eliminados os registros eletrofisiológicos de qualidade empobrecida (poucos minutos de estímulo de base, período pós-estimulação inferior à 50 minutos, por exemplo), ou os experimentos em que houve dificuldades técnicas tais como presença de ruídos em alta voltagem, alterações no sistema de aquecimento da cuba, entre outros eventos (n=7). Desse modo, somente 19 animais foram incluídos no grupo de epilépticos.

Apesar de não ter ocorrido nenhuma mortalidade entre os animais dos grupos controles, por motivos técnicos, alguns de seus experimentos também não puderam ser incluídos na análise dos dados (n=2). Para o grupo controle foram considerados 21 animais. Portanto, ao todo, foram utilizados 40 animais (19 ratos para o grupo de epilépticos e 21 para o grupo controle).

A filmagem das gaiolas onde os animais foram mantidos revelou a presença, no grupo onde se injetou pilocarpina, de crises espontâneas e recorrentes, as quais permaneceram desde o término do período silencioso, até o dia do sacrifício. Todos os animais dos grupos experimentais foram considerados epilépticos crônicos.

4.2 Potenciação de longa duração (LTP)

4.2.1 Probabilidade de Indução da LTP

Para verificar a existência de diferenças significativas entre os dois grupos (epilépticos *versus* controles), independente do tempo de epilepsia, quanto à porcentagem de animais em que se obteve a LTP, realizou-se o teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2) com correção de continuidade em todos os minutos analisados após o tétano (1°, 5°, 30° e 60°). Aparecem diferenças significativas, entre ratos controles e epilépticos, para o minuto 30, onde em 81% dos animais controles se havia conseguido a indução de LTP, comparado a 36,8% dos animais epilépticos ($\chi^2=6.353$, gl= 1, e p= 0.012) (Tabela 3).

Tempo	p*	Grupos controles (n=21)		Grupos epilépticos (n=19)	
		Induziu*	não induziu	Induziu*	não induziu
1° min.	0,120	71,4% (n=15)	28,6% (n=6)	42,1% (n=8)	57,9% (n=11)
5° min.	0,057	66,7% (n=14)	33,3% (n=7)	31,6% (n=6)	68,4% (n=13)
30° min.	0,012	81,0% (n=17)	19% (n= 4)	36,8% (n=7)	63,2% (n=12)
60° min.	0,060	71,4% (n=15)	28,6% (n=6)	36,8% (n=7)	63,2 (n= 12)

Tabela 3: Porcentagem de animais dos grupos controles (n=21) e epilépticos (n=19) em que se induziu ou não a LTP, de acordo com os minutos (1°, 5°, 30°, e 60° após o tétano). O valor de P refere-se à comparação entre os animais em que se induziu (*) a LTP e aqueles onde não ocorreu a indução

No caso dos animais epilépticos em que se conseguiu induzir a LTP, os índices de aumento percentuais na amplitude não diferiram dos alcançados para os grupos controles diante da variável categórica do tipo presença (valor=1) ou ausência (valor=0) de indução, avaliada por um aumento igual ou maior a 40% da amplitude inicial do PEPS para o valor igual a 1. Ou seja, os registros dos animais epilépticos eram semelhantes, em percentual de aumento da amplitude, aos dos animais não epilépticos, mostrando-nos que a LTP neste caso comportou-se como um fenômeno do tipo “tudo-ou-nada” (Figuras 17, 18 e 19).

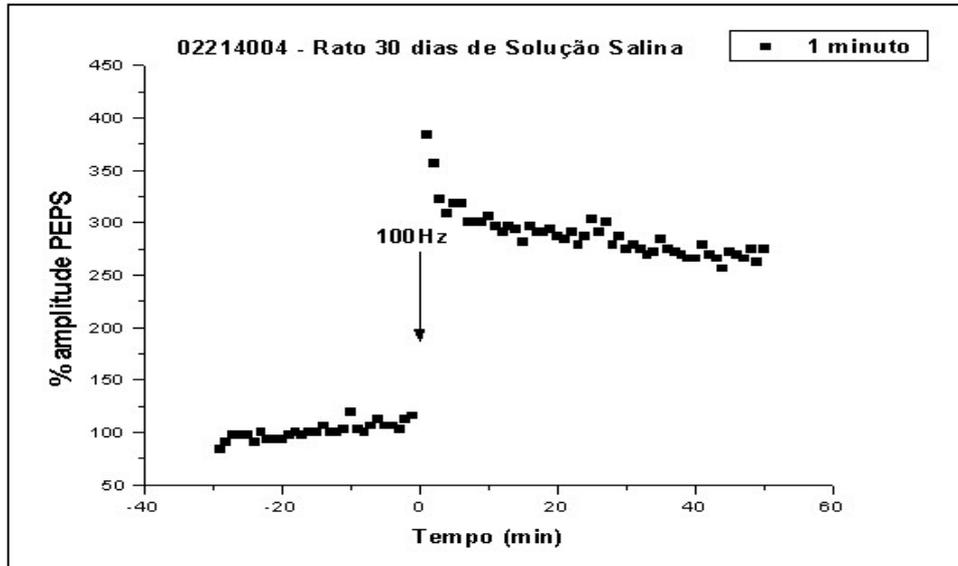


Figura 17: Exemplo de indução da LTP em uma fatia hipocampal de animal do grupo controle (30 dias após a injeção de solução salina). Percentual de aumento na amplitude do PEPS após estimulação tetânica durante 60 minutos. Obs.: cada ponto representa a média de 3 amplitudes de PEPS obtidos a cada minuto.

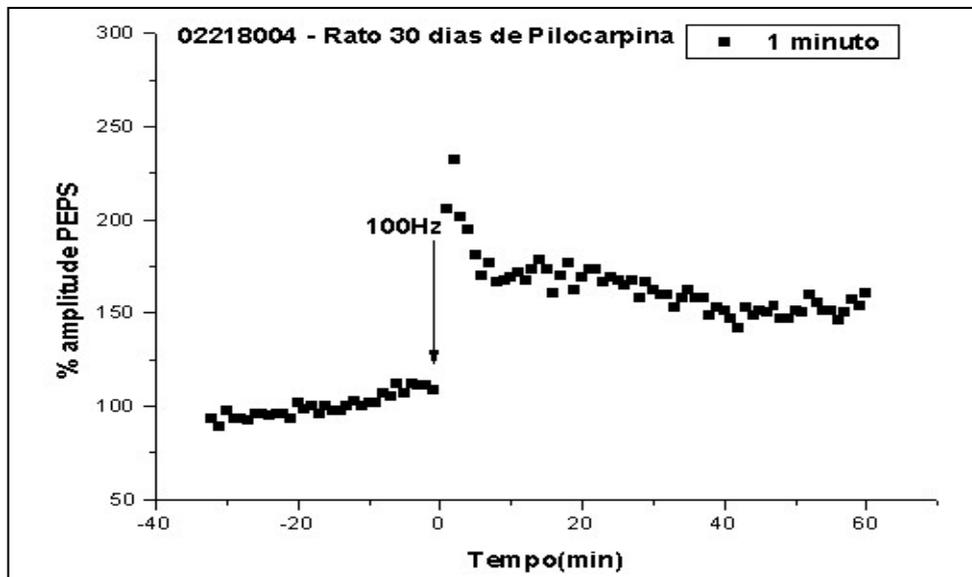


Figura 18: Exemplo de indução da LTP em uma fatia hipocampal de animal epilético (30 dias após a injeção de pilocarpina). Percentual de aumento na amplitude do PEPS após estimulação tetânica durante 60 minutos. Obs.: cada ponto representa a média de 3 amplitudes de PEPS obtidos a cada minuto.

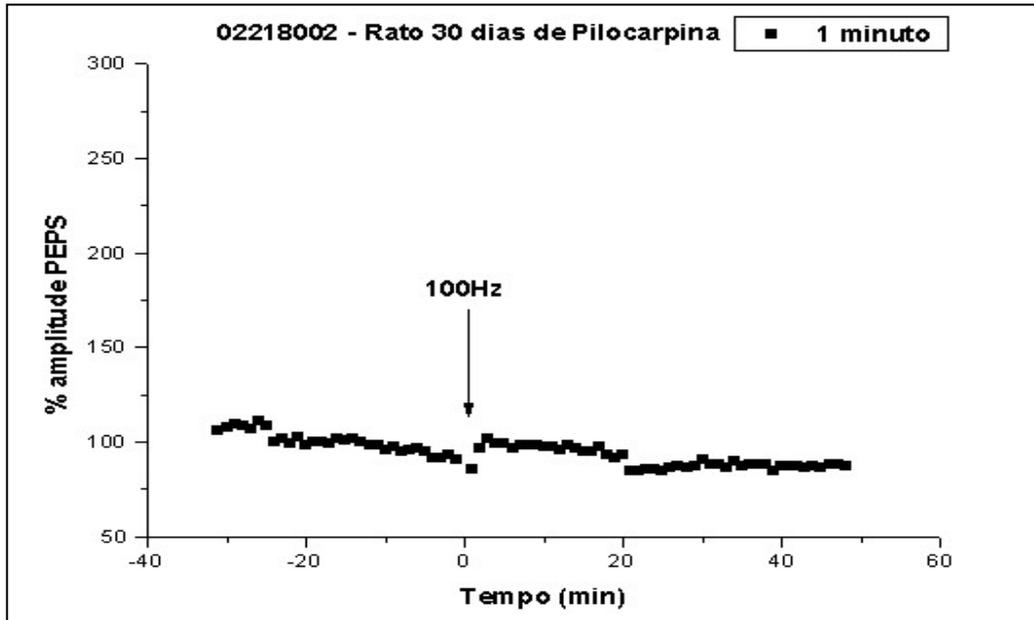


Figura 19: Demonstração de falha na indução da LTP em uma fatia hipocampal de animal epiléptico (30 dias após a injeção de pilocarpina). Obs.: cada ponto representa a média de 3 amplitudes de PEPS obtidos a cada minuto.

A seguir, buscou-se verificar o efeito de grupo, controlando os tempos de epilepsia (30, 60 e 90 dias), realizando-se uma regressão logística, onde diferenças significativas quanto a LTP começaram a aparecer mais entre os animais epilépticos e controles.

Para o primeiro minuto após o tétano, observou-se que, independente da idade do animal, a probabilidade de se induzir a LTP em ratos com solução salina foi 4,2 vezes maior do que aquela nos ratos que receberam injeção de pilocarpina (“odds ratio” ou OR = 0.24; $p= 0.046$). Para o 5º minuto, a probabilidade de indução da LTP para todos os grupos controles foi 5 vezes aquela dos ratos epilépticos (OR= 0.20; $p= 0.0232$). Para o minuto 30, a probabilidade de induções da LTP para todos os animais controles foi 10 vezes maior do que aquela para os animais epilépticos (OR= 0.09; $p=0.0043$). Finalmente, para os 60 minutos do tétano a probabilidade de se induzir a LTP para os grupos controles foi de 5,4 vezes a dos epilépticos (OR= 0.18; $p= 0.02$) (Figura 20).

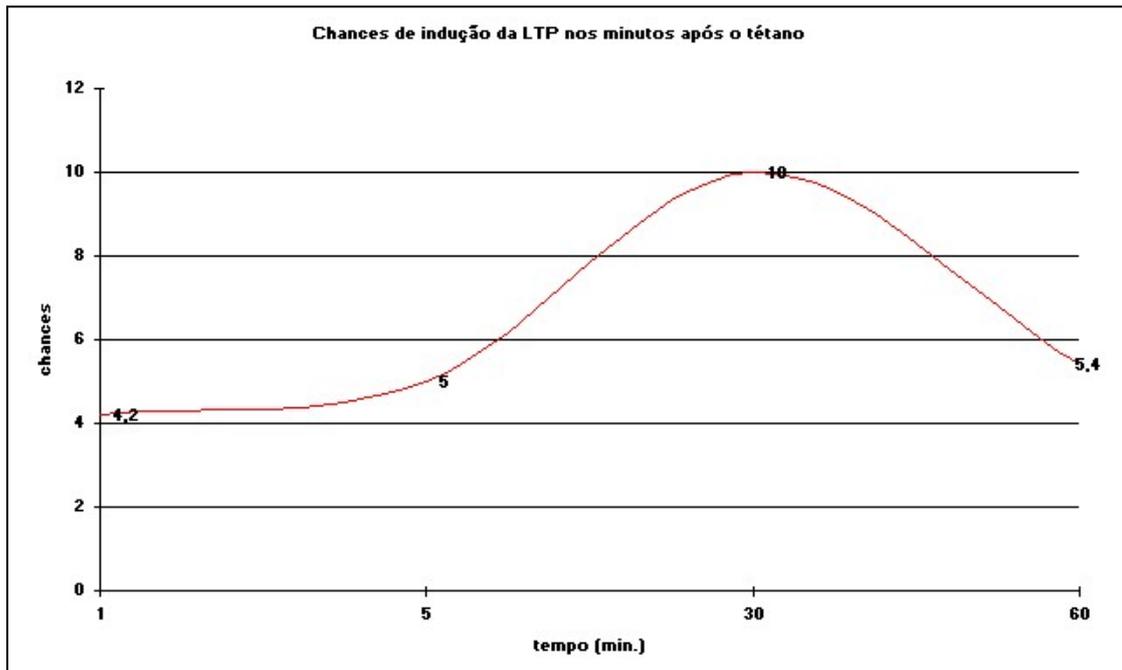


Figura 20: Probabilidade de se obter um aumento de 40% na amplitude do PEPS para os grupos dos animais controles (n=21) em comparação aos dos animais epiléticos (n=19), de acordo com os minutos (1^o, 5^o, 30^o e 60^o) após a estimulação tetânica, independente da idade do animal ou do tempo de epilepsia.

4.2. 2 Análise da amplitude do PEPS

A análise das amplitudes dos PEPS de campo, conforme os dados demonstrados no item anterior, responde nossa primeira questão de modo afirmativo: há alteração na LTP hipocampal no modelo de ELT induzido pela pilocarpina. Pode-se dizer ainda que, além de existirem diferenças significativas nas respostas obtidas para a LTP entre os grupos epiléticos e controles, as chances de indução desse fenômeno em animais no grupo epilético (independente do tempo de epilepsia) parecem ser menores do que as dos animais controles.

Levando-se em consideração a variável categórica “induziu” (valor=1) ou “não induziu” (valor=0), baseado no ponto de corte estipulado de 40% no aumento da amplitude do PEPS, analisou-se para todos os minutos acima citados qual a porcentagem de fatias hipocampais de animais dos dois grupos (epiléticos ou

controles) em que se conseguiu a obtenção da LTP e a porcentagem para a qual ocorreram falhas em tal fenômeno. Em um número sempre menor de tecidos de animais epiléticos se fez possível a ocorrência da LTP. De um modo geral, considerando-se todos os minutos estipulados, a indução de LTP foi obtida, em média, em 70 a 80% dos tecidos de animais controles, sendo obtida em apenas 30 a 40% dos tecidos de animais epiléticos, considerando-se os seis grupos estudados (Tabela 3).

Com o objetivo de investigar as mudanças percentuais sofridas nas amplitudes do PEPS (aumento ou a diminuição na altura do sinal após o estímulo tetânico em relação à amplitude média inicial) entre os 6 grupos, realizou-se uma análise da variância (ANOVA) de duas vias (grupo X tempo). O termo de interação foi eliminado do modelo por apresentar resultado não significativo. Para este modelo não foram identificadas diferenças significativas de acordo com o tempo de pilocarpina ou solução salina (30, 60 e 90 dias) dos animais, mas conforme o grupo ao qual o animal pertencia, corroborando os achados acima descritos. Ou seja, neste caso o tempo de droga não apareceu como um fator diferenciador da indução, mas sim a condição de epilepsia crônica. Para a esta análise foram utilizados os hipocampos dos 40 animais que compunham todos os 6 grupos (Tabelas 4 a 7).

Considerando-se os minutos estipulados (1° , 5° , 30° , e 60°) para todas as respostas obtidas entre os grupos (epiléticos x controles), percebe-se diferenças significativas já durante o primeiro minuto após a estimulação tetânica. Identificamos, em relação à amplitude de base, um aumento percentual de 79.9% para os animais controles dos três grupos (30, 60 e 90 dias da solução salina), contrastando-se com somente o de 40,1% para os animais epiléticos (30, 60 e 90 dias da injeção de pilocarpina) ($p= 0,034$) para esse período do experimento (Figura 21 e Tabela 4).

Mudança percentual na amplitude do PEPS ao 1º minuto pós- indução LTP

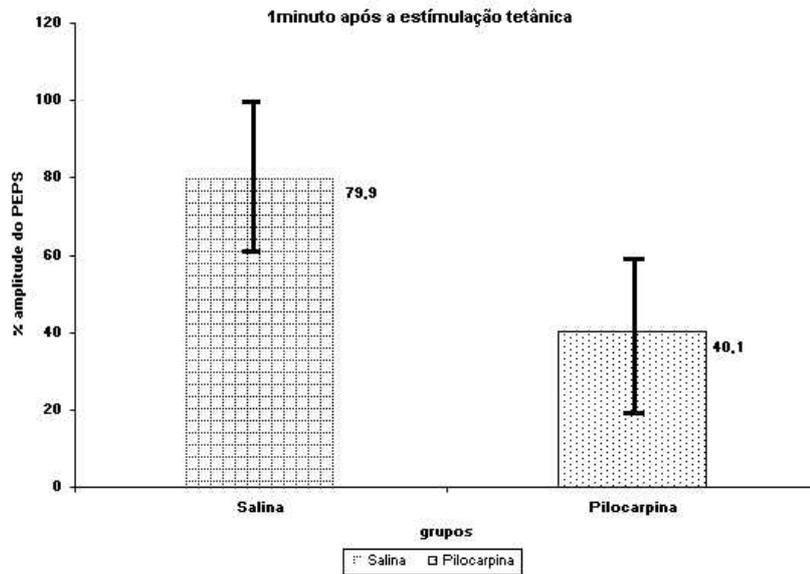


Figura 21. Aumento percentual ($\pm 2EP$) na amplitude do PEPS logo após a estimulação tetânica nos animais controles (n=21) e nos epilépticos (n=19)

Tabela 4: Mudança percentual na amplitude do PEPS de campo no 1º minuto após a estimulação tetânica, em relação à amplitude basal, de acordo com o tempo de epilepsia.

Grupo	30	60	90	Total
Salina	96.4 \pm 50.5 (n= 6)	60.6 \pm 28.4 (n= 6)	81.8 \pm 78.3 (n=9)	79.9 \pm 59.0 (n=21)
Pilocarpina	42.9 \pm 34.0 (n=8)	54.8 \pm 69.2 (n=5)	24.1 \pm 40.4 (n= 6)	40.1 \pm 46.0 (n=19)
Total	65.9 \pm 48.5 (n=14)	57.9 \pm 48.2 (n=11)	58.7 \pm 70.3 (n=15)	

Comparação entre grupos (pilocarpina ou sol.salina) de acordo com o período de tempo após a injeção de pilocarpina ou sol.salina (30, 60 e 90 dias)
ANOVA Fatorial: F(Grupo)= 4.906 (p=0.034), F(TempoPilo/Sol.Salina)= 0.346 (p=0.710), F (Grupo X Tempo)= 0.822 (p=0.488). Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão

Para os primeiros cinco minutos após a estimulação tetânica também foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Para os animais controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) foi observado um percentual de aumento na

amplitude do PEPS de 74.5% em relação à resposta de base. Em comparação, para os animais epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) foi encontrado um percentual de aumento em relação à resposta de base de 30.9% ($p= 0.029$) (Figura 22 e Tabela 5).

Mudança percentual na amplitude do PEPS aos 5 minutos pós-indução LTP

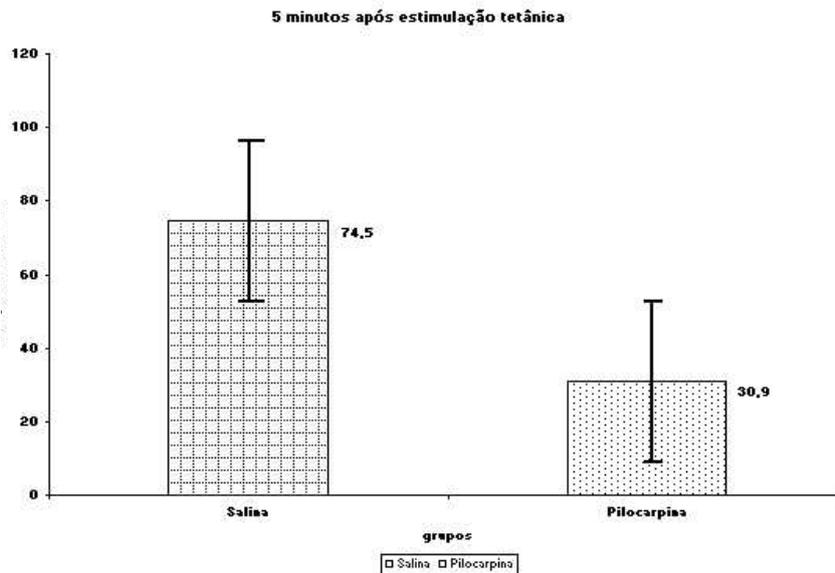


Figura 22. Aumento percentual ($\pm 2EP$) na amplitude do PEPS 5 minutos após a estimulação tetânica nos animais controles ($n=21$) e nos epiléticos ($n=19$)

Tabela 5: Mudança percentual na amplitude do PEPS de campo no 5º minuto após a estimulação tetânica, em relação à amplitude basal, de acordo com o tempo de epilepsia.

Grupo	30	60	90	Total
Salina	84.7 \pm 42.4 (n=6)	49.5 \pm 27.2 (n=6)	84.5 \pm 79.3 (n=9)	74.5 \pm 58.4 (n=21)
Pilocarpina	32.9 \pm 29.6 (n=8)	42.3 \pm 85.9 (n=5)	19.0 \pm 44.0 (n=6)	30.9 \pm 51.1 (n=19)
Total	55.1 \pm 43.2 (n=14)	46.2 \pm 57.8 (n= 11)	58.3 \pm 73.4 (n= 15)	

Comparação entre grupos (pilocarpina ou sol.salina) de acordo com o período de tempo após a injeção de pilocarpina ou sol.salina (30, 60 e 90 dias)
ANOVA Fatorial: $F(\text{Grupo})= 5.194$ ($p=0.029$); $F(\text{Tempo Pilo/Sol.Salina})= 0.161$ ($p= 0.852$); $F(\text{Grupo X Tempo})= 0.876$ ($p= 0.426$). * Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão

A análise das respostas aos 30 minutos após estimulação tetânica revela um percentual de aumento de 81.8% para os controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) comparado ao de 29.5% para os epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) ($p= 0.002$) (Figura 23 e Tabela 6).

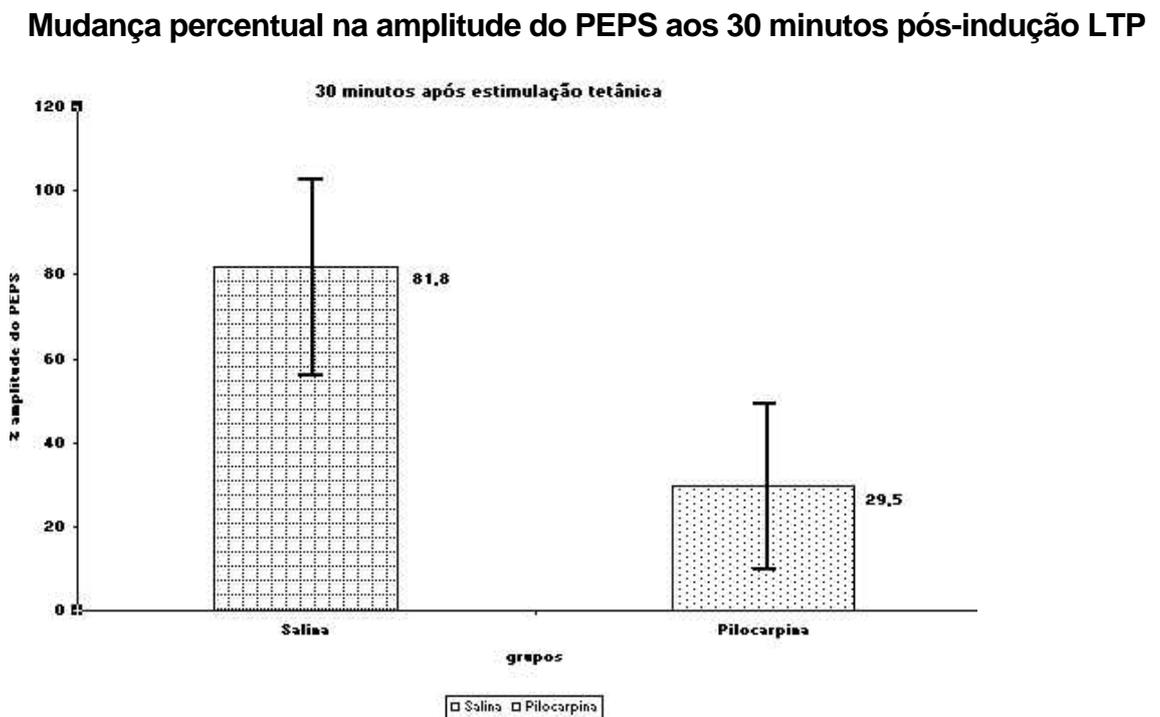


Figura 23. Aumento percentual ($\pm 2EP$) na amplitude do PEPS 30 minutos após a estimulação tetânica nos animais controles ($n=21$) e nos epiléticos ($n=19$).

Tabela 6: Mudança percentual na amplitude do PEPS de campo no 30º minuto após a estimulação tetânica , em relação à amplitude basal, de acordo com o tempo de epilepsia

Grupo	30	60	90	Total
Salina	98.8 ±40.7 (n= 6)	54.0 ± 37.6 (n=6)	88.9 ± 70.8 (n=9)	81.8 ± 55.8 (n=21)
Pilocarpina	34.7 ± 32.7 (n=8)	25.8 ±38.4 (n=5)	25.6 ±51.8 (n=6)	29.5 ±38.9 (n=19)
Total	62.2 ±47.9 (n= 14)	41.2 ±38.9 (n=11)	63.6 ± 69.7 (n=15)	

Comparação entre grupos (pilocarpina ou sol.salina) de acordo com o período de tempo após a injeção de pilocarpina ou sol.salina (30, 60 e 90 dias)
ANOVA Fatorial: F(Grupo)= 10.705 (p=0.002); F(Tempo Pilo/Sol.Salina)= 0.916 (p=0.410); F (Grupo X Tempo)= 0.511 (p= 0.605). * Os valores estão expressos em média ± desvio padrão

Aos 60 minutos da indução, já no final do experimento, as diferenças entres os grupos permanece. Para este período, os animais dos grupos controles (30, 60, e 90 dias de solução salina) apresentaram um percentual de aumento de 72.5%, enquanto que os animais epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina) demonstraram um aumento percentual de 26.8% para o mesmo minuto (p= 0.010) (Figura 24 e Tabela 7).

Mudança percentual na amplitude do PEPS aos 60 minutos pós-indução LTP

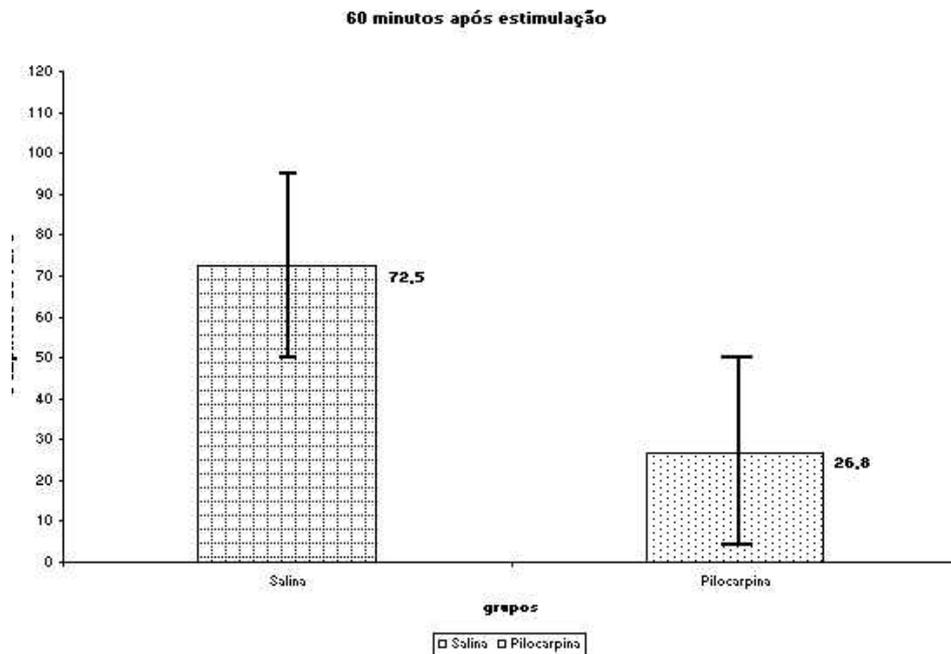


Figura 24. Aumento percentual ($\pm 2EP$) da amplitude do PEPS 60 minutos após a estimulação tetânica nos animais controles ($n=21$) e nos epiléticos ($n=19$)

Tabela 7: Mudança percentual na amplitude do PEPS de campo no 60º minuto após a estimulação tetânica, em relação à amplitude basal, de acordo com o tempo de epilepsia

Grupo	30	60	90	Total
Salina	96.9 \pm 47.9 (n= 6)	54.1 \pm 47.2 (n=6)	68.5 \pm 65.6 (n= 9)	72.5 \pm 56.0 (n=21)
Pilocarpina	40.3 \pm 61.6 (n=8)	18.8 \pm 44.7 (n=5)	15.3 \pm 45.2 (n=6)	26.8 \pm 51.3 (n=19)
Total	64.7 \pm 61.4 (n=14)	38.0 \pm 47.5 (n=11)	47.2 \pm 62.6 (n= 15)	

Comparação entre grupos (pilocarpina ou sol.salina) de acordo com o período de tempo após a injeção de pilocarpina ou sol.salina (30, 60 e 90 dias)

ANOVA Fatorial: F(Grupo)= 7.492 ($p=0.010$); F(Tempo Pilo/Sol.Salina)= 1.290 ($p=0.288$); F (Grupo X Tempo) =0.129 ($p= 0.880$).

* Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão

4.2.3 Análise do “*slope*” do PEPS

Analisando o primeiro minuto após o tétano observamos um aumento percentual de 96.6% no “*slope*” dos registros dos grupos controles (30, 60 e 90 dias de solução salina) em comparação a um aumento de 50% em média para os registros dos animais epiléticos (30, 60 e 90 dias de pilocarpina), aparecendo um efeito do tratamento com a pilocarpina conforme o tempo de epilepsia (Tabela 8). Pode-se constatar um aumento de 81% (n=6) no “*slope*” dos registros de animais controles com 30 dias de solução salina, em comparação a um aumento de 54.3% para os animais epiléticos com 30 dias da injeção de pilocarpina (n= 8). Neste mesmo ponto, para os animais com 60 dias ocorre um aumento contrário, a favor do grupo de epiléticos: 107% (n= 5) em comparação à 76% (n=6) para os controles, mas um decréscimo aproximado de - 4% (n= 6) para os animais com 90 dias de epilepsia em comparação a um aumento de 131% (n= 6) para os registros dos grupos controles. Para este primeiro minuto da indução da LTP não houve diferença significativa analisando-se somente os grupos (epiléticos ou controles), ou o tempo de epilepsia, sendo significativa a interação grupo-tempo ($p= 0.028$ para interação grupo*tempo) (Tabela 8). Acredita-se que tamanha diversidade nas respostas desse 1º minuto seja ocasionada pelas próprias interferências do tétano, não sendo este minuto uma medida mais adequada para a observação dos diferentes comportamentos entre os grupos.

Tabela 8: Mudança percentual no “slope” do PEPS de campo no 1º minuto após estimulação tetânica , em relação ao “slope” basal, de acordo com o tempo de epilepsia

Grupo	30	60	90	Total
Salina	81.1 ± 68.9 (n= 6)	75.8 ± 94.4 (n= 6)	131.8 ± 96.8 (n=6)	96.6 ± 86.3 (n=18)
Pilocarpina	54.3 ± 53.7 (n=8)	107.6 ± 37.5 (n= 5)	-3.93 ± 60.3 (n=6)	49.9 ± 65.9 (n=19)
Total	65.8 ± 59.8 (n=14)	90.8 ± 72.6 (n=11)	63.9 ± 104.6 (n= 12)	

Comparação entre grupos (pilocarpina ou sol.salina) de acordo com o período de tempo após a injeção de pilocarpina ou sol.salina (30, 60 e 90 dias)

ANOVA Fatorial: F(Grupo)= 3.409 (p=0.074); F(Tempo de Pilo/Sol.Salina)= 0.524 (p=0.597); F(Grupo X Tempo) = 4.040 (p= 0.028).

* Os valores estão expressos em média ± desvio padrão

Para os cinco minutos após o tétano, os aumentos percentuais encontrados no “slope” foram de 58% para os registros dos animais controles com 30 dias de solução salina, e de 42.6% para os animais epiléticos de mesma idade. Para os animais controles de 60 dias foi evidenciado um aumento de 74.2%, em comparação a um aumento de 96% para os epiléticos. Para os animais controles de 90 dias ocorre um aumento de 151% na resposta, enquanto que para os epiléticos ocorre um decréscimo de -13.2% (p= 0.018 para interação grupo*tempo) (Tabela 9).

Tabela 9: Mudança percentual no “slope” do PEPS de campo aos 5 minutos após estimulação tetânica , em relação ao “slope” basal, de acordo com o tempo de epilepsia

Grupo	30	60	90	Total
Salina (0)	57.9 ± 65.2 (n=6)	74.2 ± 90.2 (n= 6)	151.1 ± 115.2 (n=6)	94.4 ± 96.4 (n=18)
Pilocarpina (1)	42.6 ± 24.8 (n=8)	96.0 ± 104.3 (n=5)	-13.2 ± 57.5 (n=6)	39.0 ± 73.5 (n= 19)
Total	49.1 ± 45.0 (n= 14)	84.1 ± 92.5 (n=11)	68.9 ± 122.0 (n= 12)	

Comparação entre grupos (pilocarpina ou sol.salina) de acordo com o período de tempo após a injeção de pilocarpina ou sol.salina (30, 60 e 90 dias)
ANOVA Fatorial: F(Grupo)=4.041 (p=0.053); F(Tempo de Pilo/Sol.Salina)= 0.602 (p=0.554); F (Grupo X Tempo) = 4.608 (p= 0.018).

*Os valores estão expressos em média ± desvio padrão

Aos 30 minutos observa-se um percentual de aumento para o “slope” de 26% para os animais epilépticos de 30 dias em relação ao de 69.4% para os controles. Para os animais epilépticos por 60 dias o percentual é de 85.3% sendo que para os controles é de 90%. Para os animais de 90 dias de epilepsia o decréscimo que vinha aparecendo nas respostas anteriores torna-se mais discreto : -0.6% para os registros de animais epilépticos, sendo para os seus controles um aumento de 180% (p= 0.014 para interação grupo*tempo) (Tabela 10).

Tabela 10: Mudança percentual no “*slope*” do PEPS de campo aos 30 minutos após estimulação tetânica , em relação ao “*slope*” basal, de acordo com o tempo de epilepsia

Grupo	30	60	90	Total
Salina (0)	69.4 ± 51.0 (n=6)	89.9 ± 98.2 (n=6)	180.1 ± 108.6 (n=6)	113.1 ± 97.6 (n=18)
Pilocarpina (1)	25.8 ± 39.3 (n=8)	85.3 ± 41.1 (n=5)	-0.6 ± 64.9 (n=6)	33.1 ± 57.5 (n= 19)
Total	44.5 ± 48.3 (n=14)	87.8 ± 74.2 (n=11)	89.7 ± 127.2 (n=12)	

Comparação entre grupos (pilocarpina ou sol.salina) de acordo com o período de tempo após a injeção de pilocarpina ou sol.salina (30, 60 e 90 dias)
ANOVA Fatorial: F(Grupo)=10.299 (p=0.003); F(Tempo de Pilo/Sol.Salina)=1.416 (p=0.258); F (Grupo X Tempo) = 4.912 (p= 0.014). *Os valores estão expressos em média ± desvio padrão

Aos 60 minutos, as mudanças percentuais são as seguintes: para os animais epiléticos de 30 dias há um aumento percentual de 28.5%, enquanto que para os controles há um aumento de 81.3% no “*slope*”. Para os animais de 60 dias de epilepsia existe um aumento de 86%, enquanto que para os controles há um aumento de 101%. Para os animais de 90 dias de epilepsia ocorre um decréscimo de -0.7%, enquanto que para os controles há um aumento de 143%, não aparecendo, entretanto, desta vez, um fator interação grupo* tempo significativo, mas igual a 0.098 (Tabela 11).

Tabela 11: Mudança percentual no “slope” do PEPS de campo aos 60 minutos após estimulação tetânica , em relação ao “slope” basal, de acordo com o tempo de epilepsia

Grupo	30	60	90	Total
Salina (0)	81.3 ± 43.0 (n= 6)	100.9 ± 116.3 (n= 6)	143.2 ± 98.5 (n= 6)	108.5 ± 89.9 (n= 18)
Pilocarpina (1)	28.5 ± 38.9 (n= 8)	85.9 ± 41.5 (n=5)	-0.7 ± 56.9 (n= 6)	34.4 ± 55.1 (n= 19)
Total	51.1 ± 47.5 (n=14)	94.0 ± 86.7 (n= 11)	71.2 ± 107.4 (n= 12)	

Comparação entre grupos (pilocarpina ou sol.salina) de acordo com o período de tempo após a injeção de pilocarpina ou sol.salina (30, 60 e 90 dias)

ANOVA Fatorial: F(Grupo)= 8.810 (p=0.006); F(Tempo de Pilo/Sol.Salina)=0.876 (p=0.427); F (Grupo X Tempo) = 2.503 (p= 0.098).

*Os valores estão expressos em média ± desvio padrão

Resumo das mudanças nos “slopes” dos PEPSs para os minutos estipulados após a estimulação tetânica de acordo com o tempo de Pilocarpina ou Solução Salina dos animais.

Minuto	Tempo decorrido da injeção de PILO ou SAL. (em dias)	Mudança Percentual dos grupos epiléticos	Mudança Percentual dos grupos Controles	P*
1°	30	↑	↑	
1°	60	↑	↑	
1°	90	↓	↑	P=0.028
5°	30	↑	↑	
5°	60	↑	↑	
5°	90	↓	↑	P=0.018
30°	30	↑	↑	
30°	60	↑	↑	
30°	90	↓	↑	P=0.014
60°	30	↑	↑	
60°	60	↑	↑	
60°	90	↓	↑	P=0.098

Tabela 12: Resumo das mudanças nos “slopes” dos PEPSs. Aumento (↑), ou diminuição (↓) nos *slopes* nos minutos (1°, 5°, 30° e 60°) após a estimulação tetânica de acordo com o tempo de epilepsia (30, 60 e 90 dias) para todos os grupos analisados.

*Obs.: Em tinta vermelha quando a diferença é significativa, P indicando esta diferença. Note que para o 60° minuto não há diferença significativa para o slope entre os grupos de animais com 90 dias de epilepsia e seus controles.

4.3 Análise do brotamento neuronal (“Sprouting”)

Quanto aos animais em que se realizou a técnica do neo-Timm (n=14), identificou-se o brotamento neuronal (“sprouting”) em praticamente todos os que receberam injeção sistêmica de pilocarpina, independente do tempo de epilepsia. Tal fenômeno histológico apresentou-se de forma independente da ocorrência de LTP. As figuras a seguir mostram-nos a presença, ou ausência, de brotamento neuronal, bem como os registros eletrofisiológicos dos mesmos animais, apontando-nos para a possibilidade de obtenção da LTP, ou uma falha na indução desse fenômeno.

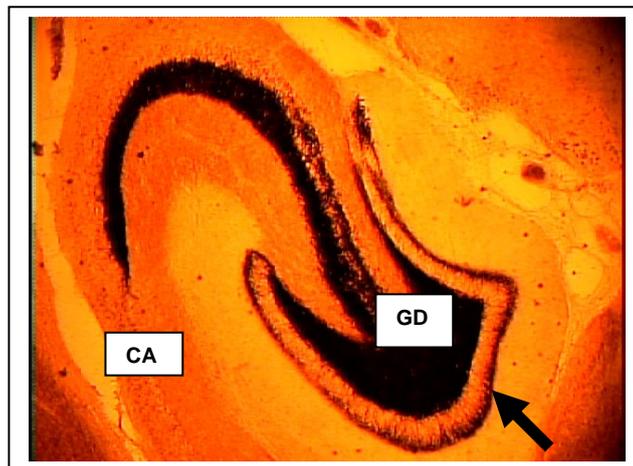


Figura 25: Fatia hipocampal de rato com 90 dias de epilepsia. Obs.: As setas indicam a presença de brotamento (“sprouting”). GD= giro denteado. CA= corno de Amonn

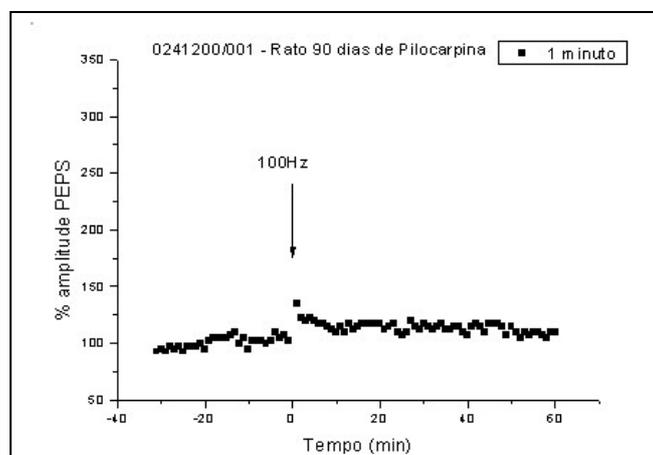


Figura 26: Falha na indução da LTP na região de CA1 do mesmo animal da figura 25 (90 dias de epilepsia)

Em um animal com 90 dias de pilocarpina, foi encontrado brotamento (“sprouting”), sendo possível também a indução da LTP.

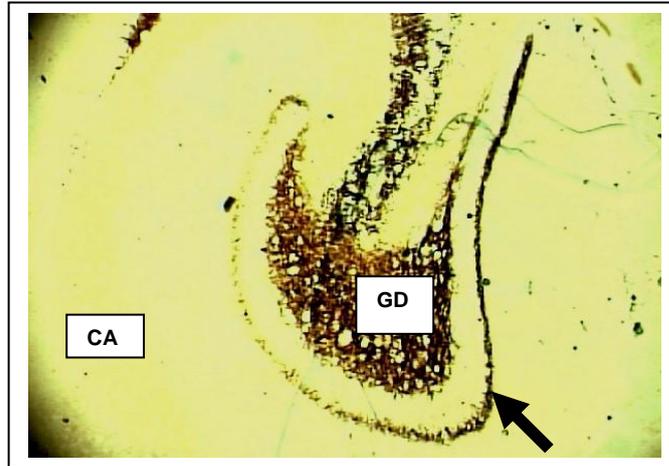


Figura 27: Fatia hipocampal de rato com 90 dias de epilepsia.

Obs.: As setas indicam a presença de brotamento (“sprouting”). GD= giro dentado. CA= corno de Amonn

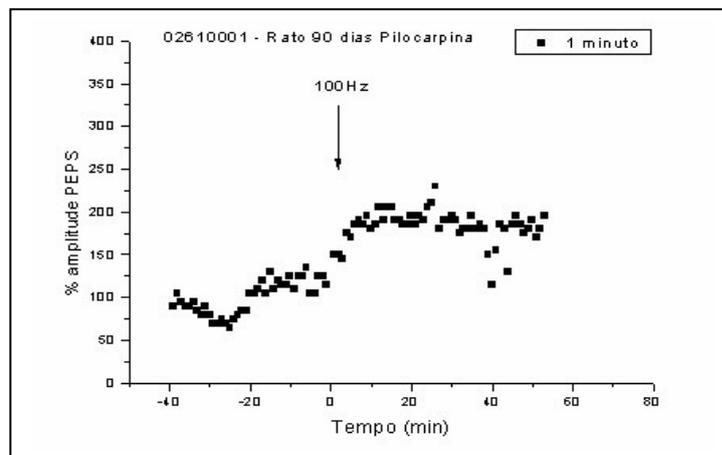


Figura 28: Potenciação de longa duração na região de CA1 do mesmo animal da figura 27 (90 dias de epilepsia)

Por outro lado, em nenhum dos animais controles foi evidenciada a presença de brotamento. As figuras 29 e 30 revelam, respectivamente, a ausência de brotamento (“sprouting”), e a possibilidade de indução da LTP em um animal controle com 90 dias após a injeção de solução salina.

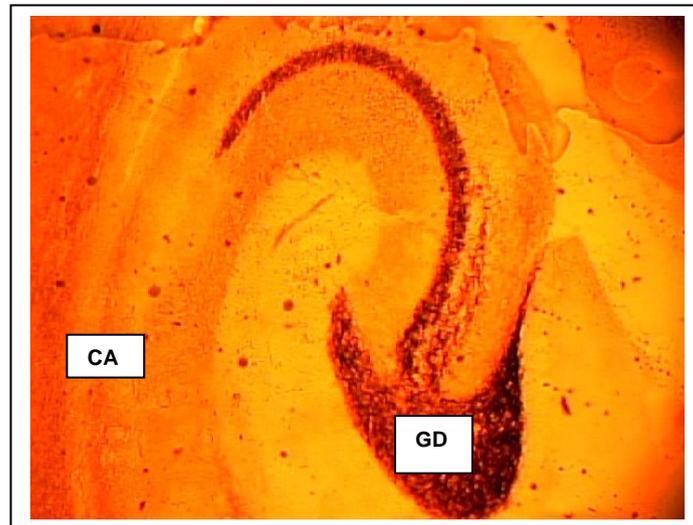


Figura 29: Fatia hipocampal de rato com 90 dias de solução salina (controle).

Obs.: Note a ausência de brotamento (“sprouting”). GD= giro denteado. CA= corno de Amonn

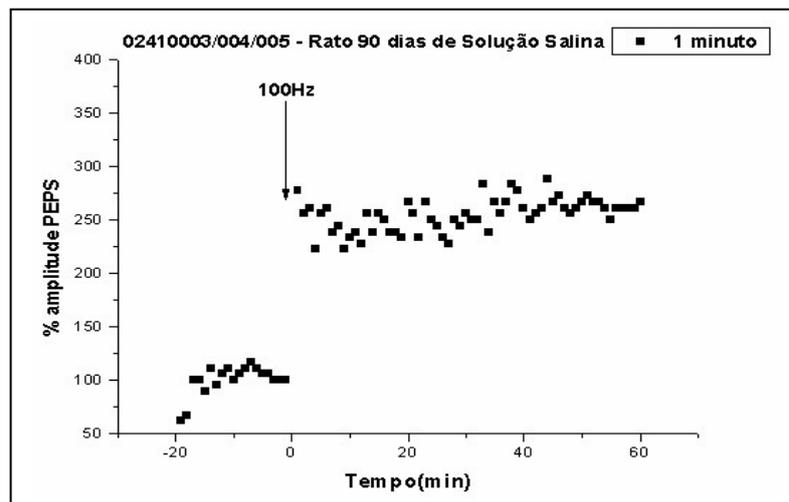


Figura 30: Potenciação de longa duração na região de CA1 do mesmo animal da figura 29 (90 dias de solução salina)

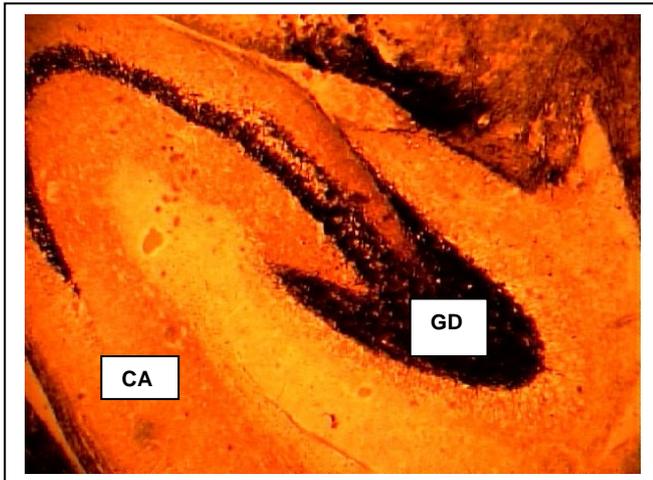


Figura 31: Fatia hipocampal de rato com 90 dias de solução salina (controle). Obs.: Note a ausência de brotamento (“sprouting”). GD= giro denteado. CA= corno de Amonn

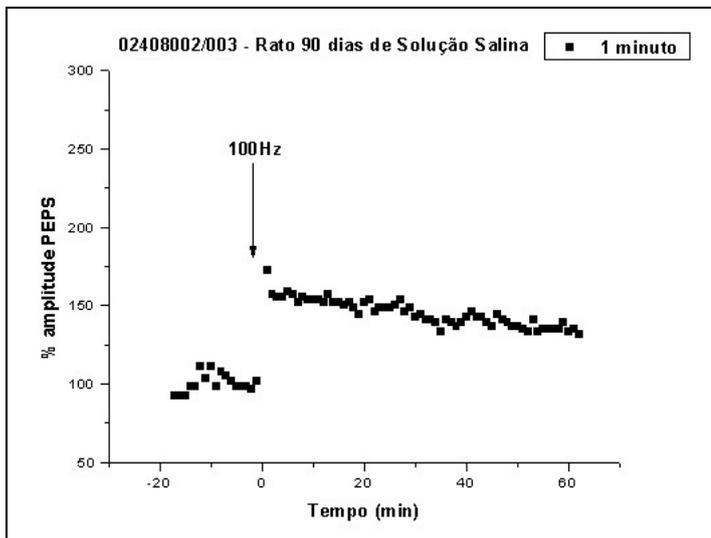


Figura 32: Potenciação de longa duração na região de CA1 do mesmo animal da figura 31 (90 dias de solução salina)

Ocorreu somente uma exceção em um animal dos três animais analisados com 60 dias de epilepsia, o qual não demonstrou o brotamento (“sprouting”) (Figura 33). Em um dos experimentos eletrofisiológicos com este animal, foi possível a obtenção da LTP (Figura 34), ocorrendo uma falha na indução do experimento seguinte (Figura 35).

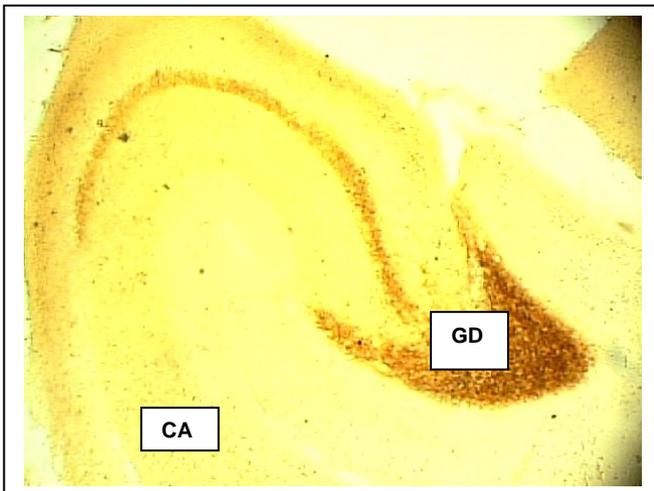


Figura 33: Fatia hipocampal de rato com 60 dias de epilepsia. Obs.: Note a ausência de brotamento (“sprouting”) no animal epiléptico. GD= giro denteado. CA= corno de Amonn

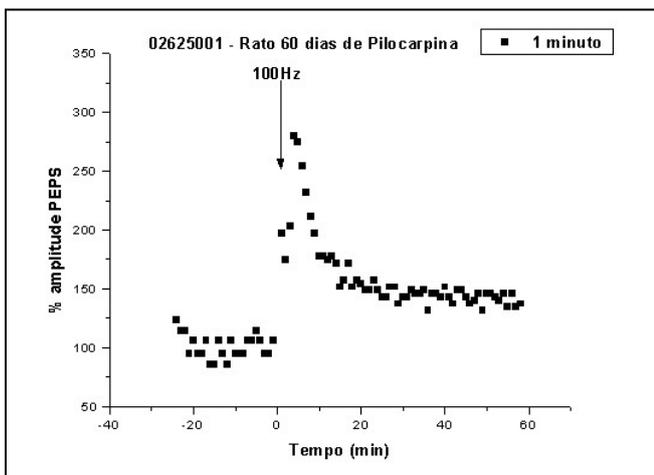


Figura 34 : Potenciação de longa duração na região de CA1 do mesmo animal da figura 33 (60 dias de epilepsia)

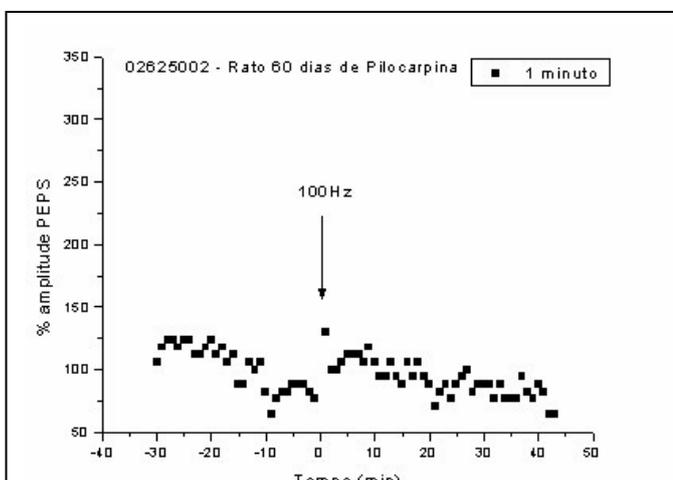


Figura 35 : Falha na indução da LTP na região de CA1 do mesmo animal das figuras 33 e 34 (60 dias de epilepsia)

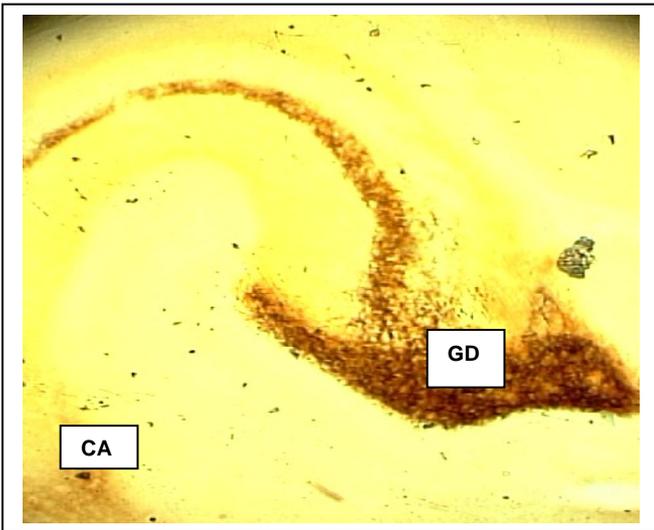


Figura 36: Fatia hipocampal de rato com 60 dias de solução salina (controle). Obs.: Note a ausência de brotamento (“sprouting”). GD= giro denteado. CA= corno de Amonn

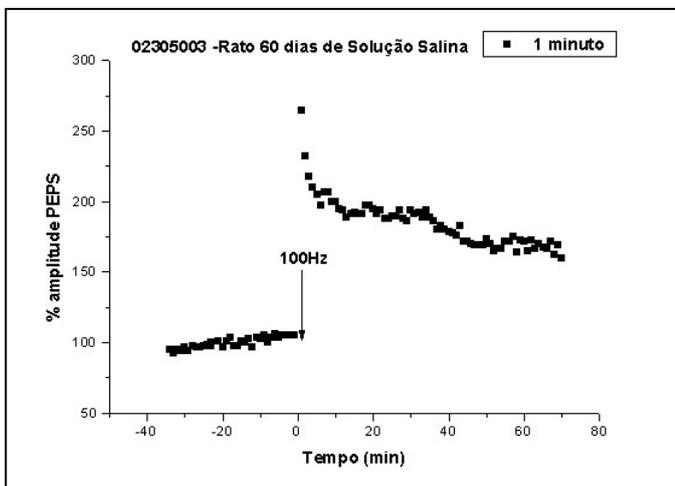


Figura 37 : Potenciao de longa durao na região de CA1 do mesmo animal da figura 36 (60 dias de soluço salina)

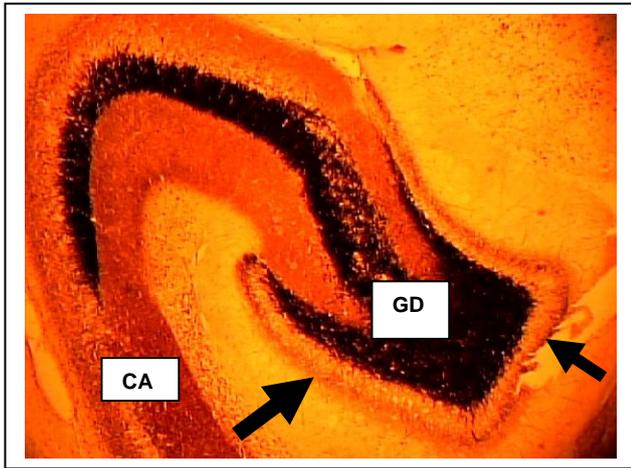


Figura 38: Fatia hipocampal de rato com 30 dias de epilepsia. Obs.: As setas indicam a presença de brotamento ("sprouting") em um grau mais leve, em comparação aos dos animais de 90 dias. GD= giro denteado. CA= corno de Amonn

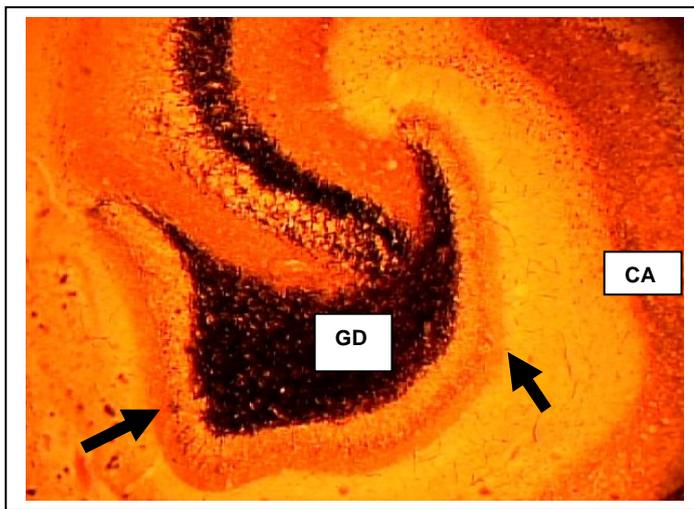


Figura 39: Representação de brotamento ("sprouting") em diferente fatia hipocampal do mesmo animal da figura 38. Obs.: O brotamento em um grau mais leve fica ainda mais evidenciado. GD= giro denteado.

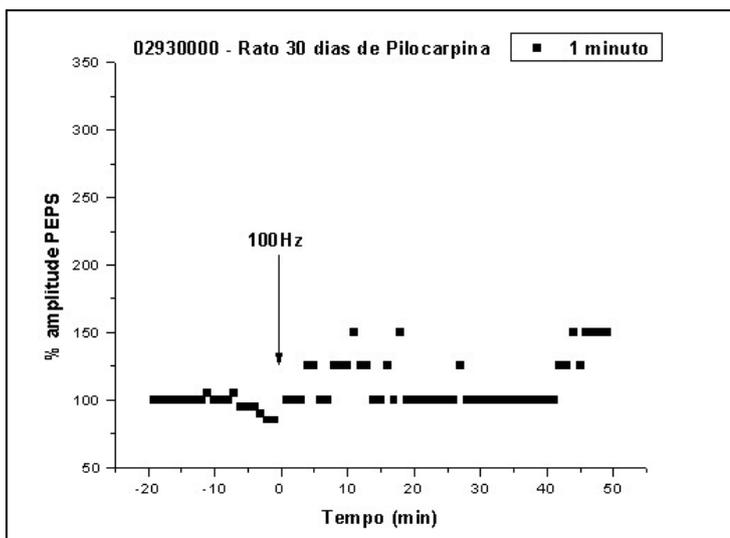


Figura 40: Falha na manutenção da LTP na região de CA1 do mesmo animal das figuras 38 e 39. Obs.: Note que ao final do experimento parece haver uma potenciação tardia.

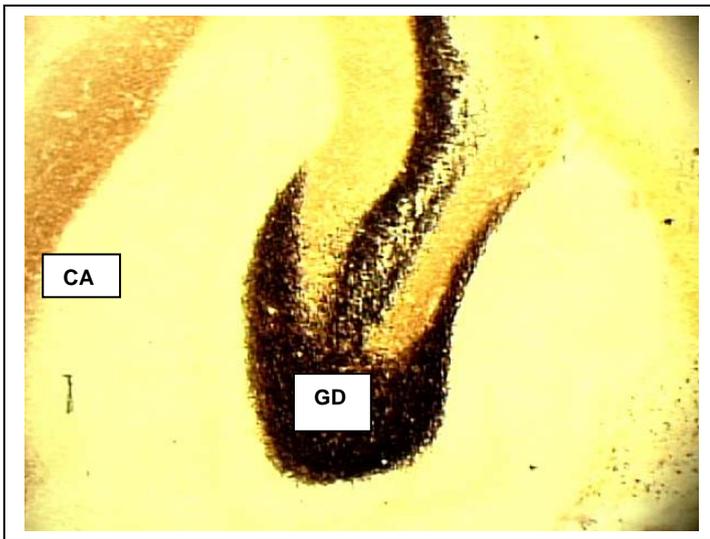


Figura 41 : Fatia hipocampal de rato com 30 dias de solução salina (controle). Obs.: Note a ausência de brotamento (“sprouting”). GD= giro denteado. CA= corno de Amonn

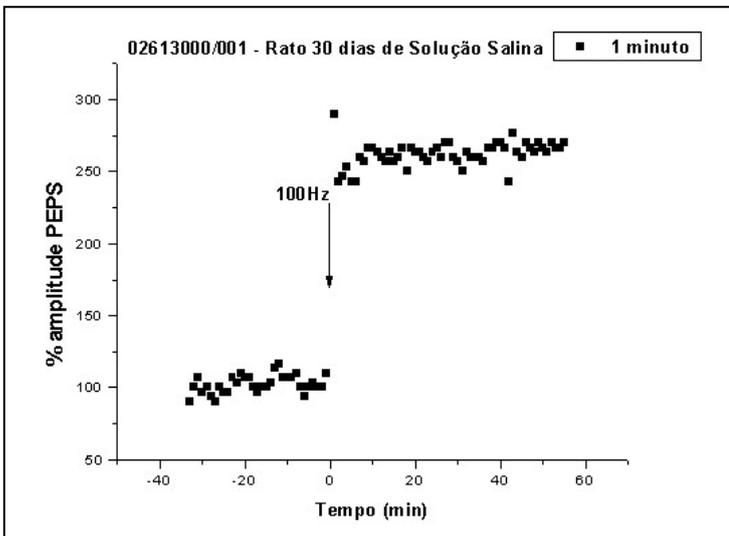


Figura 42 : Potenciação de longa duração na região de CA1 do mesmo animal da figura 41 (30 dias de solução salina)

Pelo tamanho da amostra e pela característica dos resultados tais como presença de brotamento (“sprouting”) quase que em 100% dos animais epiléticos analisados, e ausência em 100% do brotamento nos animais controles não foi aplicado nenhum modelo para o cálculo estatístico, apenas a descrição dos achados (Tabela 13) .

Grupos	Ausência	Presença
Pilocarpina		
30 dias (n=2)		XX
60 dias (n= 3)	X	XX
90 dias (n= 3)		XXX
Total= 8		
Solução Salina		
30 dias (n=2)	XX	
60 dias (n= 2)	XX	
90 dias (n= 2)	XX	
Total= 6		

Tabela 13. Descrição da presença ou ausência de brotamento neuronal no giro denteado de acordo com o número (X) de animais analisados para cada grupo.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar possíveis alterações na LTP, no modelo experimental de ELT induzido pela pilocarpina, em fatias hipocampais de ratos. Além disso, propôs-se a analisar se essas mudanças na LTP sofriam influência de diferentes tempos de epilepsia (30, 60 e 90 dias). Concomitante ao estudo eletrofisiológico, buscou-se verificar a presença de brotamento neuronal (“sprouting”), uma alteração tecidual associada ao SE e à recorrência de crises epiléticas, numa região hipocampal próxima de CA, no giro denteado. Tal medida serviu-nos como um indicador de modificações na integridade hipocampal dos animais estudados.

A associação entre a presença de crises epiléticas, aumento na excitabilidade neuronal, e uma probabilidade maior para a ocorrência da LTP em determinadas estruturas do sistema nervoso, vem sendo demonstrada em grande parte dos estudos com modelos experimentais de epilepsia (BUZSAKI e cols., 1987; WU & LEUNG, 2003). No que se refere ao hipocampo, de modo mais específico, certos modelos de ELT *in vivo*, ou *in vitro* parecem facilitar, ou, ao menos, não dificultar algumas formas de indução da LTP (RACINE et al., 1991; CONTZEN & WITTE, 1994). Dessa forma, tínhamos como uma de nossas hipóteses de trabalho a de que uma maior ocorrência de indução da LTP e um aumento mais proeminente na amplitude e no “slope” do PEPS após o tétano seria encontrada para os tecidos dos animais epiléticos. Pelo fato de a LTP e a epilepsia apresentarem mecanismos morfofisiológicos em comum (HERRON et al, 1985; CONTZEN & WITTE, 1994), a LTP poderia estar associada à presença de descargas epiléticas cada vez mais freqüentes, intensas e extremas, colaborando para a geração de crises e manutenção da atividade epilética crônica na ELT. Por outro lado, nossa segunda hipótese era a de que o processo de indução da LTP poderia estar prejudicado nesse modelo de ELT, visto que a pilocarpina está associada a alterações na integridade hipocampal (MELLO et al, 1993; CAVAZOS & SUTULA, 1990). Por fim, nossa terceira hipótese era a de que o tempo de epilepsia poderia interferir tanto na primeira como na segunda hipótese.

Nossos resultados, a favor da segunda hipótese, demonstraram que a indução da LTP foi possível em um número maior de animais do grupo controle (71 a

81%), os quais haviam recebido solução salina, em comparação aos animais epiléticos (32 a 42%), que haviam recebido a injeção de pilocarpina, embora a LTP não tenha sido obtida em 100% dos animais de qualquer um dos dois grupos (controles e epiléticos) analisados. Além disso, para todos os minutos analisados após a indução da LTP, encontramos um aumento percentual na amplitude do PEPS mais acentuado para os grupos controles em comparação aos epiléticos. Assim, o modelo de ELT utilizado demonstrou conter mecanismos que interferiram negativamente na LTP. Os achados do presente estudo, dessa maneira, opõem-se à maioria do que vem sendo descrito na literatura a respeito da relação entre os modelos experimentais de ELT e a LTP, onde a epilepsia “favorece” a LTP.

Até o momento, não encontramos estudos *in vitro* que investigassem a relação entre epilepsia induzida pela pilocarpina e LTP. Desse modo, pode-se dizer que o presente estudo é pioneiro neste sentido.

Um exemplo do que vem sendo descrito a respeito de uma associação “positiva” entre LTP e epilepsia, *in vitro*, é o trabalho de Morgan & Teyler (2001), no qual os autores identificaram que a atividade epileptiforme espontânea *in vitro*, através do modelo agudo da alta concentração de K^+ no meio de perfusão da fatia hipocampal, estimulava componentes de uma LTP, que podia ser tanto acionada por receptores NMDA, como por receptores de cálcio dependentes de voltagem. Contzen & Witte (1994), utilizando-se desse mesmo modelo agudo de epilepsia, observaram que esse não só promoveu o aumento na amplitude dos potenciais de campo, favorecendo conseqüentemente à LTP, de uma forma dependente de NMDA, mas também uma LTD. A estimulação de alta freqüência induziu a LTP, tanto nas fatias cerebrais que precederam a potenciação, como naquelas que precederam depressão do potencial de campo. A LTD, segundo esses pesquisadores, poderia representar um mecanismo de auto-proteção do encéfalo, envolvido na depressão pós-ictal da atividade cerebral. Stringer & Lothman (1988) relataram que concentrações acima de 7.5 mM do íon, que não induziram descargas epiléticas, também não afetaram a LTP. Relacionando-se esses achados aos nossos, pensa-se que o uso de modelos agudos de epilepsia possa estar associado a uma “facilitação” na obtenção da LTP até mesmo pelo fato de não envolverem um processo lesivo duradouro capaz de causar dano ao tecido neuronal, como é o caso da pilocarpina.

Quanto aos trabalhos *in vivo*, um modelo de epilepsia que vem sendo consideravelmente relacionado a uma “facilitação” para a LTP é o da injeção intracerebroventricular de ácido caínico, um análogo do glutamato endógeno (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000), associado à estimulação tetânica de alta frequência (BERNARD & WHEAL, 1995). Um aumento duradouro na amplitude da população de espículas (do inglês, *population spike*), uma medida de resposta eletrofisiológica pós-estímulo, parece ocorrer após o tétano em um semana seguinte à injeção do ácido (BERNARD & WHEAL, 1995).

Em um quadro crônico de epilepsia como este induzido pelo ácido caínico, a hiperexcitabilidade das células piramidais de CA1, por mecanismos ainda insuficientemente esclarecidos, mas que provavelmente envolvam vias aferentes excitatórias, seriam responsáveis pelo disparo de prolongadas descargas em salva (“burst”) em tal região, o que poderia se transformar em uma informação de saída para demais áreas, como o córtex, por exemplo (BERNARD et al., 1999; BERNARD et al., 2001), como uma forma de acoplamento excitação sináptica para potencial de ação de saída. De um modo complementar e mais específico, pode-se pensar que as crises nesse modelo induzem desinibição em CA1, a qual leva dendritos apicais e distais dessa região a um estado de excitabilidade (WU & LEUNG, 2003), em um padrão progressivo (MANGAN & BERTRAM, 1998), o que resulta no aumento de entrada de estímulos para CA1 e reverberações no circuito hipocampo- córtex entorrinal. Tais mudanças na saída de estímulos do hipocampo, a partir de CA1, poderiam contribuir para uma suscetibilidade aumentada para crises após episódios ictais (WU & LEUNG, 2003). Assim, a relação entre presença de excitabilidade neuronal e propensão à indução da LTP seria diretamente proporcional.

Relacionando-se esses dados aos do presente estudo, pensa-se que tanto o modelo do ácido caínico, como o da pilocarpina, produzem variados padrões de dano neuronal cortical e subcortical que atingem, fundamentalmente, o neocórtex, o córtex entorrinal, o hipocampo e a amígdala. O modelo da pilocarpina, entretanto, está associado a perdas nas regiões de CA3 e CA1 (além do hilo do giro denteado), enquanto que o do ácido caínico está mais associado a um acometimento intenso na região do hilo e na área de CA3 (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000), sendo que a área de CA1 parece ter uma maior resistência, o que pode ser melhor identificado em estudos com injeção intra-hipocampal do ácido. As áreas de CA1 e CA2 demonstram ter poucos receptores específicos para o cainato, resistindo mais,

desse modo, à lesão excitotóxica induzida. Assim, conseqüências fisiopatológicas diretas do modelo do ácido caínico constituem uma preservação relativa de neurônios piramidais de CA1 (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000), o que pode permitir um registro de campo mais facilmente nessa região, ou ainda a presença de uma reinervação nessa área relacionada a uma reestruturação de circuitos sinápticos locais, os quais possam ser a base da epileptogênese (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000). Daí a possibilidade de ocorrer a LTP em um circuito que constantemente permanece hiperexcitado. Tais achados quanto à preservação da região de CA1, entretanto, não possuem uma concordância entre os autores (SANTOS, 2000). No caso do modelo da pilocarpina, como se pode ver, a área lesionada seria justamente àquela onde seria necessária a manutenção da integridade do tecido para posterior indução da LTP.

Um forma complementar de mostrar a interferência “negativa” do modelo de ELT utilizado sobre a LTP diz respeito às probabilidades de indução desse fenômeno para os animais epiléticos crônicos em comparação às de seus controles. Nossos resultados mostraram que as chances de ocorrência da LTP para os animais controles foi de 4 a 10 vezes a chance desse fenômeno nos animais epiléticos. Uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos apareceu para o 30^o minuto após o tétano, onde se atingiu um índice de sucesso na obtenção da potenciação para 81% dos animais controles em comparação 36,8% dos animais epiléticos. Para os minutos 5^o e 60^o esta diferença foi quase significativa, mostrando-nos uma tendência a este resultado. Nessa análise, os dados obtidos para o primeiro minuto não mostraram diferenças entre os grupos, o que se atribuiu a um efeito de estimulação recente do tétano. Ou seja, embora a obtenção da LTP não tenha sido excluída diante do quadro de epilepsia, não se pode afirmar que o modelo de epilepsia utilizado “favoreceu” a obtenção da LTP, devido à presença de excitabilidade neuronal ocasionada pelas crises epiléticas recorrentes de origem límbica.

A evidência sugestiva de que o hipocampo está ativo na consolidação da memória, bem como a hipótese de que mecanismos celulares e moleculares subjacentes à LTP façam parte desse processo (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; MALENKA & NICOLL, 1999; IZQUIERDO & MC GAUGH, 2000), permitem-nos comparar nossos resultados ao de estudos *in vivo*, onde tarefas de aprendizado e memória foram avaliadas em animais epiléticos crônicos no modelo da pilocarpina

(em associação ou não ao uso de lítio). Buscando investigar os efeitos motores, cognitivos e morfológicos de longo prazo em animais epiléticos imaturos pelo modelo experimental de ELT através da aplicação sistêmica de lítio e pilocarpina, WU et al. (2001), observaram déficits na memória espacial e de trabalho para as tarefas de labirinto aquático de Morris e labirinto radial de oito braços, respectivamente. Além dos déficits cognitivos de longo prazo, os quais poderiam estar associados a alterações na integridade hipocampal, foram identificados uma perda celular permanente em CA1, e ausência de déficits motores. Embora tais autores não tenham se utilizado de estudos eletrofisiológicos, os resultados por eles obtidos parecem ser o correlato comportamental de nossos achados com a LTP.

Pensa-se que o efeito “negativo” da pilocarpina sobre a LTP encontrado em nosso estudo possa ser associado a alterações morfofisiológicas resultantes da presença do SE após a injeção dessa droga e da recorrência de crises. A frequência de crises, no modelo utilizado, poderia ter levado o tecido hipocampal a uma reorganização estrutural e funcional do tecido nervoso que interferiu com a LTP de forma a dificultar a sua indução.

De acordo com Turski et al (1983), a injeção sistêmica de pilocarpina produz um estado de crises recorrentes e espontâneas que está associado a lesões cerebrais. Sabe-se que diferentes tipos de morte neuronal, ativação de mecanismos de reorganização sináptica, sinaptogênese e neurogênese aparecem no giro denteado, bem como mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais e em circuitos inibitórios, diante do dano neuronal excitotóxico agudo. No modelo experimental da pilocarpina, assim como em outros modelos de ELT, bem como em tecido epilético humano (BABB et al, 1984) verifica-se uma perda neuronal importante em CA1(MELLO, 1993; CAVAZOS & SUTULA, 1990), e de proporções razoáveis em CA3. Esta seqüência de eventos lesivos que irão ocorrer no encéfalo do animal epilético é iniciada já durante o SE, ainda na fase de indução do quadro de epilepsia. Um hipótese é a de que a LTP em CA1, que segue o postulado Hebbiano, possa ficar “carente” de um pareamento adequado de sua atividade pré-sináptica, com a despolarização pós-sináptica (BROWN et al, 1990) por perda de elementos necessários à sinapse. Neste caso, poderia-se pensar que um prejuízo mais amplo na LTP em nossos tecidos de animais epiléticos estaria associado à condição permanente de epileptogênese, à perda neuronal progressiva, às anormalidades dendríticas e do corpo neuronal, e de axônios, entre outros eventos.

Somando a esses fatos, tem-se que o bloqueio das correntes iônicas de K^+ , e, conseqüente facilitação das descargas em salva (tipo “*burst*”) promovidas pela injeção de pilocarpina, dificultam a gênese do pós-potencial hiperpolarizante rápido (PPH_R) e intermédio (PPH_I) (STORM, 1988; STORM, 1989), assim como a acomodação neuronal (MADISON & NICOLL, 1984), como ocorre em um cérebro saudável. Dessa forma, passa a existir um mecanismo também Hebbiano nesse processo de epileptogênese, quando a ativação dos receptores muscarínicos de acetilcolina, do subtipo m1 nos neurônios da camada II do córtex entorrinal é ampliada por influxo de íons de cálcio, causando uma despolarização amplificada da membrana e disparo repetitivo dos neurônios quando acompanhada de atividade da célula pós-sináptica (KLINK & ALONSO, 1997).

Juntamente ao excesso de correntes glutamatérgicas, parece existir no animal epiléptico crônico um defeito na inibição local em CA1, a qual parece estar relacionada a uma anomalia nos receptores do tipo GABA_A. Anomalias nos receptores GABA_A também foram encontradas em outros modelos experimentais de ELT (ENGEL, 1996; MANGAN & BERTRAM, 1997), assim como em fatias cerebrais hipocampais e neocorticais de tecido epiléptico humano (LOSCHER, 1993; LOUVEL et al, 1996). A hiperexcitabilidade presente nos neurônios da formação hipocampal a partir da injeção de pilocarpina, bem como a inibição dos interneurônios hipocampais por neurônios GABAérgicos septo-hipocampais, os quais são sensíveis a esta droga, resultam na hiperatividade dos neurônios hipocampais (WU et al., 2000), que é acompanhada da ativação do sistema glutamatérgico. Neste caso, poderia-se imaginar que este aumento na excitabilidade favoreceria a ocorrência da LTP nas células hipocampais dos ratos epilépticos diante de um estímulo elétrico fornecido às sinapses excitatórias, o não ocorreu em nosso caso.

Um indicativo da presença de anormalidades nos circuitos recorrentes inibitórios, na região de CA1, ocasionadas pela injeção de pilocarpina, é o de que registros sublimiares e supralimiais tendem ao disparo de potências pós-sinápticos que necessitam na maior parte das vezes de pós-hiperpolarização (GIBBS et al, 1997). Para outros autores isso nem sempre ocorre, visto que a gênese ou a propagação de uma atividade epileptiforme ainda podem ser eficientemente inibidas (ESCALPEZ et al, 1997).

Frente aos nossos resultados pensa-se que a ativação do sistema glutamatérgico, decorrente da injeção de pilocarpina, tenha sido seguida de

excitotoxicidade. Dessa forma, os mecanismos necessários à indução da LTP nos neurônios epilépticos, estariam sob o efeito prévio dessa excitotoxicidade.

De acordo com alguns autores, a aplicação local de glutamato sobre o corpo neuronal ou dendritos, da maior parte dos neurônios, resulta em uma transitória, mas potente, despolarização da membrana e descarga celular (HABLITZ & LANGMOEN, 1982; SCHWARTZKROIN & ANDERSEN, 1975). Por outro lado, trabalhos com registro extracelular mostram que uma perfusão prolongada de glutamato a 1.0 mM ocasiona uma depressão reversível do PEPS (FAGNI et al., 1984). Bernstein & Fisher (1985) descreveram que uma exposição prolongada ao glutamato, em concentrações que variavam entre 1 a 2 mM, resultava em um bloqueio específico da transmissão entre a via colateral de Schaffer e os neurônios piramidais de CA1, sendo que vias paralelas para interneurônios adjacentes inibitórios eram pouco afetadas.

Para a ocorrência de LTP em CA1 quatro fatores principais eram necessários: a despolarização pós-sináptica, a ativação de receptores NMDA, o influxo de Ca^{2+} e a ativação de Ca^{2+} por sistemas de segundos mensageiros na célula pós-sináptica (COTMAN et al., 1994; ZIGMOND, 1999). Sabe-se também que o sucesso na obtenção da LTP, pode ser marcado por modificações pré-sinápticas que resultam em um aumento na quantidade de neurotransmissor L-glutamato liberado, modificações pós-sinápticas, tais como um aumento no número de receptores ou uma mudança em suas características funcionais, uma mudança extra-sináptica, tal como uma redução na apreensão do glutamato pelas células gliais, levando a um aumento na quantidade de neurotransmissor disponível, e modificações morfológicas (BEAR et al., 2002; COTMAN et al., 1994). Pode-se atribuir também o fracasso na indução da LTP para os animais epilépticos no modelo da pilocarpina a alterações em um ou em mais de um desses eventos.

Como fora visto, a fase de indução da LTP em CA é associada pela maioria dos estudos, à ação dos receptores glutamatérgicos, principalmente o NMDA, e à presença do íon Ca^{2+} pós-sináptico (COLLINGRIDGE et al., 1983). Para que o receptor NMDA funcione, entretanto, é preciso ocorrer de forma simultânea a despolarização na membrana pós-sináptica (o que em grande parte é mediada por receptores AMPA) e a liberação do transmissor glutamato. Então, o aumento da excitabilidade neuronal para a potenciação do PEPS, que é o marco inicial da LTP, é primeiramente atribuído à ação dos receptores AMPA e NMDA, além dos canais de

Ca^{2+} dependentes de voltagem concomitante à liberação do glutamato. Faz-se necessário, portanto, o funcionamento adequado dessas proteínas de membrana para a passagem dos íons Ca^{2+} , principalmente, bem como a liberação de vesículas no terminal pré-sináptico. Alterações mínimas na excitabilidade neuronal, e no disparo para o potencial de ação poderiam levar aos déficits encontrados na obtenção da LTP.

O fato de que baixas doses de antagonistas de AMPA possam bloquear a atividade interictal revela que os circuitos recorrentes ou polissinápticos AMPAérgicos participam da gênese da atividade epileptiforme crônica espontânea em CA1 (SANABRIA, 1999). A prevalência de circuitos AMPAérgicos na epileptogênese crônica pode estar associada a alterações funcionais, estruturais, ou na expressão acentuada desses receptores. Além disso, aberrações na expressão, distribuição, funcionamento de subtipos específicos de receptores NMDA e AMPA podem também estar envolvidos na hiperexcitabilidade crônica da ELT (MODY, 1998; ISOKAWA & LEVESQUE, 1991). Diante do tétano para a indução da LTP, nos animais epiléticos, poderíamos já estar encontrando células com prejuízos estruturais e funcionais, incapazes de produzir uma adequada despolarização da membrana após o tétano, ou de permitir um influxo íons Ca^{2+} para a potenciação da resposta pós-sináptica.

Podemos relacionar uma hipótese como essa a da presença de “canais epiléticos” (MODY, 1998), bem como a de um “agregado neuronal epilético”, onde ocorrem circuitos recorrentes, alterações na neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica. Estudos de hibridização “*in situ*” em pacientes epiléticos mostraram um aumento seletivo de subunidades GLUR1 e GLUR2 dos receptores tipo AMPA, e NMDA R1 no corno de Ammon (MATHERN et al., 1997).

O bloqueio da atividade interictal espontânea também pode ser promovido, juntamente com os antagonistas de AMPA, por antagonistas de correntes de cálcio (KÖHLING et al., 1998). No caso da indução da LTP sabe-se que os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem possuem um papel essencial no influxo deste íon juntamente com o receptor NMDA para o aumento do PEPS, colaborando também para a liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} (MALENKA, R.C; NICOLL, R.A., 1999). Mais uma vez, o mesmo íon Ca^{2+} , necessário para a indução da LTP, pode ter levado à célula, durante a atividade epileptiforme, aos níveis mais elevados de sua concentração, com conseqüente injúria, o que diante do tétano tornou o

neurônio não mais responsivo. Ou seja, se a entrada de Ca^{2+} através dos canais da membrana neuronal fazia-se necessária para a indução da LTP, ela também era lesiva ao neurônio que se tornara epilético.

Um outro achado importante desse estudo é o de que o aumento na amplitude do PEPS característico da indução da LTP, independentemente de se tratar do tipo de grupo (epilético ou controle), caracterizou-se por ser do tipo “tudo-ou-nada”, segundo o critério para a indução (aumento percentual mínimo de 40% na amplitude do PEPS após o tétano) estipulado. Trabalhos anteriores “*in vitro*” com o modelo experimental da pilocarpina, que consideravam como resposta a estímulos supralimiar simples o potencial de campo na forma de população de espículas (PE) identificaram uma evocação desta resposta também da forma tudo-ou-nada, abruptamente (SANABRIA, 1999), confirmando achados previamente descritos com outros modelos de epilepsia crônica (MC INTYRE & WONG, 1986), ou em tecido humano “epilético” (SCHWARTZKROIN et al, 1983; AVOLI et al, 1987, KHOLING et al., 1998). Uma duração aumentada da resposta na PE após estímulo supralimiar também tem sido referida em tais trabalhos e são indicativos do excesso de correntes glutamatérgicas mediadas por NMDA nas células dos animais epiléticos (SANABRIA, 1999). A hiperexcitabilidade na região de CA1 parece estar presente durante toda a fase crônica do modelo da pilocarpina. Estes achados, entretanto, nem sempre se mostram compatíveis com aqueles obtidos a partir de tecido humano “epilético”.

Em relação ao sucesso na obtenção da LTP, sugere-se que tenham ocorrido, diante do tétano, dois mecanismos moleculares independentes: o aumento na excitabilidade da população de células piramidais da região hipocampal de CA1 e o aumento na eficiência da transmissão sináptica, a nível de sinapses da via colateral de Schaffer com as células piramidais de CA1. Por outro lado, a falha na obtenção da LTP, segundo os critérios desse estudo, leva-nos a observar os percentuais de sucesso na obtenção da LTP relatados em trabalhos iniciais sobre esse fenômeno (BLISS & LØMO, 1973).

Investigando o fenômeno da LTP no giro denteado hipocampal de coelhos, Timothy Bliss e Terje Lømo (1973), analisaram a resposta de campo de acordo com os seguintes parâmetros: a amplitude do potencial pós-sináptico excitatório de campo (PEPS), sinalizando a despolarização celular; a amplitude e a latência da população de espículas (PE- “population spike”), sinalizando a descarga das células

granulares (BLISS & LØMO, 1973). Mesmo trabalhando com animais saudáveis, para estes experimentos, fora identificada uma potenciação dos três parâmetros em somente 29% dos experimentos, sendo que muitas vezes a potenciação ficara restrita a um ou dois dos três parâmetros. Em outras palavras, é esperado não ocorrer a indução da LTP em um determinado percentual de animais estudados.

Devemos considerar também que os mecanismos de epileptogênese não possam ser explicados por um processo único e isolado. A gênese do fenômeno epiléptico encontra-se associada a múltiplos fatores que podem vir a se expressar de diferentes maneiras, variando de animal para animal, assim como ocorre em seres humanos com ELT. Para ser expressada, a atividade epileptiforme requer uma determinada série de eventos que devem ocorrer de forma “aleatória” e/ou “combinada”, como por exemplo: anormalidades nos potenciais excitatórios pós-sinápticos, falha nos circuitos inibitórios locais, circuitos excitatórios recorrentes (ex.: brotamento axonal, reorganização sináptica, neo-sinaptogênese, etc.), gênese de descargas em salva (do tipo “burst”) neuronal intrínseco, propriedades neuronais anormais ou epileptogênicas (SANABRIA, 1999). Padrões diferenciais na atividade epileptiforme podem aparecer de acordo com o predomínio de uma determinada característica. Mesmo podendo ser observada a presença de crises epiléticas em todos os animais injetados com pilocarpina, cada animal epiléptico pode ter apresentado diferente alteração morfofisiológica específica em seus canais iônicos, assim como pode ter sofrido diferente processo neuroplástico.

Conforme os dados acima descritos, a obtenção da LTP, medida através do aumento e manutenção na amplitude do PEPS após o estímulo, e relacionada à excitabilidade neuronal, não demonstrou ter sofrido influência do tempo de epilepsia que o animal possuía, mas simplesmente do fato de o animal ser ou não epiléptico. Por outro lado, a eficiência sináptica após a estimulação tetânica, que foi medida através do “*slope*” (SARIHI et al., 2002), demonstrou ter sofrido interferência do tempo de epilepsia. Uma diminuição no “*slope*” do PEPS após o tétano ocorreu na maior parte dos tecidos dos animais que permaneceram durante mais tempo com o quadro de crises recorrentes, ou seja, aqueles com 90 dias de ELT, sendo significativa a diferença entre esses animais epiléticos e seus controles para o 1º, o 5º, e o 30º minutos da indução da LTP, mas não para o 60º minuto (já no final do experimento). Uma observação a ser feita é a de que as medidas dos “*slopes*”, comparando-se com as das amplitudes dos PEPSs, sofreram muitas oscilações, as

quais ocorreram principalmente para os animais de 60 dias. Acredita-se que neste caso o número de ratos necessários deveria ser maior do que o utilizado, devido às diferenças que cada animal pode apresentar quanto à atividade epileptiforme e suas conseqüentes alterações no SNC após o SE.

De um modo geral, na maior parte dos experimentos, houve um aumento na eficiência sináptica após a estimulação tetânica. Isto foi observado nos animais com 30 e 60 dias de ELT, onde esse aumento ocorreu em todos os minutos analisados (1°, 5°, 30° e 60°), porém em índices menos elevados do que os observados para os animais controles de mesma idade. As diferenças entre estes índices não foram significativas entre os grupos. Para os animais com 90 dias de ELT, ao contrário dos demais, observou-se um prejuízo na eficiência na transmissão sináptica em todos os minutos analisados (1°, 5°, 30°, e 60°) após a estimulação.

No caso dos animais com 90 dias de epilepsia e seus controles, observamos que, embora tenha sempre existido um comportamento contrário para os dois grupos quanto às medidas do "slope", estas não apresentaram mais diferenças significativas a partir dos 60 minutos da estimulação, mesmo havendo uma tendência para tal. Ou seja, a partir dos 60 minutos da estimulação, a resposta do animal controle com 90 dias da solução salina não se diferenciou do animal epiléptico com 90 dias da injeção de pilocarpina. De um modo complementar pensa-se que a sinapse para o grupo de animais controles de 90 dias de solução salina tenha perdido sua eficiência após os 30 minutos da indução da LTP. Aqui sim, parece ter surgido um dado relacionado ao tempo de vida do animal, já que o declínio nas respostas, na maior parte das vezes, vinha ocorrendo de uma forma independente de idade, mas dependente do tempo de epilepsia.

A análise da LTP, bem como de seus componentes neuroquímicos, em diferentes idades, e em animais distintos, têm-se constituído em um modelo de pesquisa sobre o impacto do envelhecimento no cérebro (BARNES, 1979). Uma forma de identificação das mudanças na plasticidade sináptica associadas à senilidade é o estudo dos receptores glutamatérgicos. Na literatura há uma série de trabalhos nesse sentido com ratos da raça F-344 (BARNES et al., 1996). Dados a respeito de alterações estruturais e funcionais em receptores NMDA durante o envelhecimento, entretanto, são contraditórios e parecem depender da técnica utilizada (BARNES et al., 1996). Para alguns autores, no caso de o número de receptores NMDA estar diminuído na velhice (BONHAUS et al., 1990; CLARK et al.,

1992), a funcionalidade dos receptores existentes encontra-se preservada e sua quantidade denota ser o suficiente para mediar uma indução da LTP normalmente, porém em condições um tanto desconhecidas (BARNES et al., 1997). Um rápido decaimento da potenciação de curto prazo a nível somático e dendrítico, por exemplo, também pode ser observado em ratos F-344 velhos, além de um decréscimo na LTP somática, mas não dendrítica (DEUPREE et al., 1993). Além disso as alterações a nível de receptores podem estar restritas a determinadas áreas hipocâmpais. Um declínio relacionado ao número, ou aos locais de ligação em receptores NMDA em CA1, CA3 e região subicular pode ser evidenciado com a idade, o que não ocorre na região hilar do GD. Ao contrário, quanto aos receptores AMPA, estes parecem estar em um número menor com o avanço da idade nesta última região, sofrendo uma preservação na regiões do CA. (WENK & BARNES, 2000). O decaimento no número desses receptores, entretanto, não segue um processo homogêneo e contínuo.

Uma outra modificação interessante diz respeito à ação dos receptores canais do íon Ca^{2+} , e os processos subseqüentes do íon nos animais mais velhos (FOSTER, 1999). Componentes da LTP dependentes do íon Ca^{2+} parecem contribuir mais para a sua expressão aumentada na velhice, do que componentes da LTP dependente de NMDA. Portanto, nos casos em que é observado um rápido decaimento da LTP, é possível que se refiram à ação dos componentes da LTP dependente de NMDA (FOSTER, 1999). Esses achados ainda necessitam, contudo, serem melhor investigados. Certos estudos anatômicos e neurofisiológicos mostram que na região de CA1 não há perdas axonais, mas uma redução no número de sinapses da via colateral de Schaffer por axônio, com nenhuma mudança compensatória quanto à eficiência sináptica (BARNES et al., 1992). Uma das principais descobertas desses estudos com ratos F-344 é a de que existe um declínio no potencial excitatório pós-sináptico mediado por receptores NMDA e não-NMDA para uma determinada gama de estímulos em CA1.

O presente estudo, que utilizou o eletrodo de registro extracelular para a análise da LTP no tecido epiléptico não nos permite um aprofundamento quanto aos mecanismos mais detalhados da ação de receptores glutamatérgicos ou de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Podemos somente levantar algumas hipóteses para os nossos resultados tomando como base o que vem sendo descrito na

literatura, ainda assim considerando que a comparação com animais de outras raças torna-se delicada e sujeita a equívocos.

Em neurônios saudáveis, sabe-se que receptores AMPA estão em um fluxo dinâmico nas sinapses e constantemente circulam entre a membrana pós-sináptica e compartimentos intracelulares. A redistribuição desses receptores entre porções da superfície e intracelulares parece ser um importante mecanismo de plasticidade pós-sináptica que contribui para a LTP (LÜSCHER et al., 2000; MALINOW et al., 2000; SHENG & LEE, 2001). Ao contrário, receptores NMDA parecem ter uma relativa estabilidade sobre a superfície da célula (EHLERS, 2000).

No caso de nossos animais, questionamos se a presença de receptores AMPA estaria realmente preservada em CA, visto as alterações ocasionadas pela pilocarpina. Em acordo com os estudos com ratos F-344, poderíamos estar diante de uma diminuição nas possibilidades de ocorrência de uma LTP dependente de NMDA, mas não dependente de íons Ca^{2+} . Além disso, poderíamos também estar diante de tecidos com diminuição no PEPS mediado por NMDA e não-NMDA, e conseqüentemente diminuição na eficiência sináptica, como aquela evidenciada em ratos F-344.

Como fora visto, o mesmo receptor AMPA necessário para o aumento na eficiência na transmissão, participa seletivamente (RAINNIE et al., 1992), juntamente com o do tipo NMDA (AVOLI & OLIVIER, 1987) nas alterações epileptiformes, no modelo de ELT da pilocarpina. A morte seletiva neuronal, subsequente ao SE, que é vista como altamente dependente da ativação dos receptores NMDA (MELDRUM, 2000) pode ter sido iniciada pela ação amplificada de receptores desse tipo. Em outras palavras, a diminuição na eficiência da transmissão poderia também estar associada a um decaimento na atividade fisiológica natural dos receptores AMPA após um período de atividade epileptiforme crônica, embora podendo estar associada à expressão acentuada de receptores do mesmo tipo.

Diante de uma possível preservação estrutural neuronal para os nossos animais epiléticos estudados, pensa-se que possa ter ocorrido uma falha mais específica na transmissão sináptica ocorrida durante o tétano. Isto significa que, mesmo estando presentes as porções pré- e pós-sinápticas, podem ter ocorrido modificações funcionais nestes locais, o que acabou por alterar a transmissão sináptica que nela ocorreria normalmente.

Para que fosse observada a ocorrência da LTP, bem como o aumento na eficiência sináptica, fazia-se necessária a ativação de propriedades específicas de caráter Hebbiano como associação, cooperação, e especificidade. A propriedade associativa significa que é necessária uma ativação sináptica (estimulação tetânica) intensa concomitante àquela que já atua sobre as entradas sinápticas normalmente. As sinapses ativadas por si só não desenvolveriam LTP (BARRIONUEVO & BROWN, 1983; GUSTAFSSON & WIGSTRÖM, 1986). A cooperação pode ser vista quando duas entradas sinápticas não induzem LTP ao receber uma estimulação tetânica fraca e separada, mas sim quando a estimulação ocorre simultaneamente (LEE, 1983). A cooperação remete-se à existência de um limiar de intensidade do estímulo para a indução. Em outras palavras, um número suficiente de sinapses deve ser ativado simultaneamente para causar uma somação espacial significativa dos PEPSs (BEAR et al, 2002). Quanto à especificidade, pode se dizer que não são todas as sinapses em que irá ocorrer a LTP, somente haverá um aumento da amplitude da resposta naquelas sinapses que sofrerem a estimulação tetânica (ANDERSEN, et al, 1977). Em resumo, as três propriedades referem que uma sinapse será potenciada se, e somente se, estiver ativada no momento em que a região do dendrito sobre o qual ela ocorre estiver suficientemente despolarizada (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; BROWN et al., 1990). No caso de haver uma diminuição no número de sinapses tais propriedades podem ficar prejudicadas. Dessa forma, poderia-se pensar que o aumento na eficiência sináptica, nos animais estudados com 90 dias de epilepsia, pode ter deixado de ocorrer devido, por exemplo, à existência de um número restrito de vias de entrada para o estímulo, as quais ainda poderiam encontrar-se separadas.

Mecanismos fisiológicos correspondentes aos 30 minutos da indução da LTP estavam preservados nos tecidos dos animais controles de 90 dias, não estando mantidos na maior parte dos tecidos dos animais epiléticos de 90 dias no período pós-estimulação. Ao contrário, as alterações em mecanismos relacionados à expressão da LTP, e que promovem sua manutenção após esse período (relativo aos 60 minutos da indução) poderiam estar prejudicados tanto nos animais controles como nos animais epiléticos de mesma idade. Tais resultados sugerem que a alteração na eficiência da transmissão sináptica na LTP, não só tenha sofrido uma interferência negativa após um período de epilepsia, como após um certa idade do animal.

O rápido decaimento na LTP em animais mais velhos anteriormente referida poderia estar relacionado a um limiar reduzido para ativação de mecanismos subjacente a LTD, visto que esse fenômeno, ao contrário da LTP, é caracterizado por um decaimento na resposta pós-sináptica. A LTD, da mesma forma que a LTP, é dependente do influxo de Ca^{2+} , embora de formas diferentes, sendo que ambas têm a sua indução prejudicada por bloqueadores de canais NMDA e de Ca^{2+} dependentes de voltagem (MULKEY & MALENKA, 1992). Parâmetros de estimulação para a indução da LTD atuam no sentido de reverter a LTP, um processo denominado depotenciação ou reversão (LEVY & STEWARD, 1979). Uma LTD significativa pode ser obtida através de padrões de estimulação de baixa frequência (como por exemplo, 1 Hz) no rato mais velho, sugerindo que uma menor atividade neuronal é exigida para começar esse processo, enquanto que a LTP no animal com mais idade, parece exigir estímulos de corrente mais elevada (FOSTER, 1999; ROSENZWEIG & BARNES, 2003). Juntos, o aumento no limiar para a indução da LTP, ou uma dificuldade maior para a obtenção de tal fenômeno, e uma facilidade maior para a indução da depressão sináptica poderia explicar a redução na força sináptica de CA3 e CA1 em animais com idade mais avançada.

O fato de não se verificar um aumento no “*slope*” para todos os minutos dos animais com 90 dias da injeção de pilocarpina fez com que também pensássemos que novamente fatores relacionados à epilepsia estariam interferindo negativamente com a LTP. Mudanças celulares recentes são características do dano excitotóxico (DUGAN & CHOI, 1999), e constituem mudanças pós-sinápticas envolvendo alterações dendríticas locais, dilatação mitocondrial e acúmulo de Ca^{2+} (MELDRUM & CHAPMAN, 1999). Tais mudanças podem ser observadas no período de 1 a 4 horas após o SE na maior parte dos neurônios de CA3, CA1, entre outras regiões do hipocampo. Subseqüentemente há proliferação glial, principalmente de astrócitos e microglia. A perda neuronal seletiva passa a ocorrer em período subseqüente.

As crises epilépticas estão associadas a mudanças massivas nas concentrações iônicas intracelulares, as quais podem causar mudanças persistentes na eficiência da excitação aferente (CONTZEN & WITTE, 1994). No caso de nossos resultados, alterações nesse âmbito poderiam ter levado a uma dificuldade em aumentar a eficiência sináptica dos animais epilépticos após o estímulo. A diferenciação se as alterações funcionais são devidas à lesão epileptogênica, ou a

um agente epileptogênico, ou a uma conseqüência da atividade epiléptica é geralmente delicada e difícil (CONTZEN & WITTE, 1994).

A morte neuronal é seletiva. Apenas alguns receptores dos tipos AMPA e caínicos, que normalmente são permeáveis apenas a cátions monovalentes, tornam-se permeáveis também a cálcio, sendo denominados canais Ca^{2+} -A/C (WEISS & SENSI, 2000). Os canais Ca^{2+} -A/C são permeáveis também a zinco, e sob condições de grande liberação sináptica desse íon, como ocorre na epilepsia e em isquemias, o Zn^{2+} pode translocar-se através da sinapse, acumulando-se no neurônio pós-sináptico (FREDERICKSON et al., 1989). O aumento da concentração citoplasmática de Zn^{2+} e também de Ca^{2+} leva a uma despolarização mitocondrial e a uma produção intensa de espécies reativas de oxigênio que causam a morte neuronal (SENSI et al., 1999).

Na literatura, a atividade dos receptores do tipo canal iônico vem sendo associada à evocação direta de potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) ou inibitórios (PIPS), e a atividade de receptores acoplados à proteína G à modulação da transmissão sináptica, ou seja, estes últimos estão associados a uma modificação na efetividade dos PEPSs gerados por outras sinapses empregando canais iônicos dependentes de voltagem (ANDERSON & COLLINGRIDGE, 2001).

Durante a crise epiléptica alguns eventos relacionados à ação dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos sofrem alterações e podem levar a alterações na eficiência sináptica (BEAR, 2002). No cérebro em crises as concentrações para glutamato, aspartato e GABA permanecem, inicialmente, constantes, e à medida em que a atividade de crise é prolongada, o glutamato e o aspartato geralmente diminuem, enquanto que a glutamina e o GABA aumentam.

Apesar de haver um suprimento aumentado de oxigênio e glicose no cérebro em crise, o aumento massivo de energia associado com o início da atividade de crise ocasiona uma queda rápida dos metabólitos energéticos. Estoques teciduais de glicogênio e glicose são rapidamente depletados e concentrações de fosfocreatina e ATP diminuem de modo transitório. Uma diminuição nos nucleotídeos é acompanhada de um aumento nos nucleosídeos (adenosina, bases livres- hipoxantina, por exemplo). Mudanças ocorrem a nível de segundos mensageiros devido a uma liberação aumentada de neurotransmissores agindo sobre receptores metabotrópicos desde o início da crise. Uma ativação de receptores α - adrenérgicos ocasiona um aumento no cAMP. A formação de NO é

capaz de causar um aumento no cGMP. Observa-se também a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA.

A ativação de receptores $\alpha 1$ - adrenérgicos ou metabotrópicos muscarínicos e glutamato acarretam a ativação da fosfolipase C (PLC) e a quebra de Fosfoinosítídeo (PIP_2). A atividade da fosfolipase C (PLC) resulta na formação de diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína cinase C e inositolfosfato (IP_3) que provoca a liberação de cálcio de estoques não mitocondriais. Há um aumento importante no cálcio intracelular devido a sua entrada facilitada pelos canais de cálcio dependentes de voltagem. Assim, são fosforiladas muitas enzimas, e receptores de membrana, e ativadas muitas enzimas dependentes de cálcio (ex. fosfolipase A2 que leva à formação de ácidos graxos como o ácido araquidônico, por exemplo). Devido à ativação de das fosfolipases, os ácidos graxos são liberados durante a atividade de crise. A atividade epileptiforme irá produzir mudanças na expressão gênica e na síntese de proteínas. Todas essas alterações devem ser consideradas como fatores que podem ter interferido de um modo a alterar a eficiência na transmissão sináptica de nossos animais epiléticos estudados.

A excessiva entrada de Ca^{2+} e a falha nos mecanismos de tamponamento do Ca^{2+} intracelular e de extrusão do Ca^{2+} dependente de ATP apresentam-se como fatores críticos nestas circunstâncias. A morte celular é também promovida pela ativação das proteases tais como as próprias proteínas cinases e as fosfolipases pelo Ca^{2+} (PUTNEY, 1999). Assim a influência da magnitude ou a dinâmica do Ca^{2+} interno às espinhas dendríticas altera profundamente a plasticidade sináptica resultante, e, conseqüentemente, sua funcionalidade. Tais alterações permitiram-nos que, através da técnica do neo-Timm fosse observada, uma preservação de uma característica comum da epilepsia do lobo temporal e dos modelos animais de ELT, que é o crescimento das fibras musgosas hipocampais na camada molecular do giro denteado. A observação desta alteração estrutural era referente, entretanto, a uma área próxima daquela onde se induziu a LTP, e serviu-nos como uma marca histológica de atrofia hipocampal. Os achados histológicos comprovaram deste modo, que estávamos diante de animais tornados epiléticos crônicos pelo modelo aplicado de ELT.

Um dado interessante a ser relacionado com o nosso estudo é o de que alterações no aprendizado e na memória encontradas juntamente da suscetibilidade a crises no indivíduo epilético encontram-se relacionadas não só ao dano neuronal,

conforme anteriormente citado, mas também a uma reorganização celular, como é o caso do brotamento (“sprouting”) nas fibras musgosas, induzido pela repetição de crises (NEILL et al., 1996; LIU et al., 1999). A quantidade de perda neuronal e o brotamento das fibras musgosas, é influenciada também pelo tempo de crise durante do desenvolvimento hipocampal (MATHERN et al., 1994). A sinaptogênese reativa ao SE serviria, nesse caso, como um marcador patológico da ELT que contribuiria para a epileptogênese local (BABB et al., 1988). A cascata de eventos relacionados à epilepsia e ao brotamento neuronal, entretanto, ainda não é completamente desvendada, mesmo porque possivelmente relacione-se ao modelo experimental de epilepsia utilizado. Uma resposta diferenciada quanto a esta técnica histológica pode aparecer, até mesmo, entre animais de uma mesma ninhada.

Os animais epiléticos estudados por WU et al. (2001) no modelo da injeção sistêmica de lítio e pilocarpina, que apresentaram falhas em seu desempenho para as tarefas de labirinto aquático e de labirinto radial, mostraram também um mesmo padrão de Timm quando comparados aos grupos controles. Em ambos os grupos houve uma marcação normal dos terminais das fibras musgosas em todos os subcampos e através do hilus. Além disso, nenhum terminal aberrante de fibra musgosa foi observado na camada supragranular do giro denteado de qualquer um dos grupos.

Assim, a relação entre os fatores presença de epilepsia do lobo temporal e brotamento neuronal (“sprouting”) sofre divergências na literatura. Alguns autores propõem que a ocorrência do brotamento das fibras musgosas (“sprouting”) no giro denteado contribui para o aumento na excitabilidade neuronal e crises (GOLARAI & SUTULA, 1996; WUARIN & DUDEK, 2001), embora outros não concordem com esta hipótese. Estudos com animais tratados com o modelo do ácido caínico (WU & LEUNG, 2001) discordam dessa associação entre os dois fatores. Uma suscetibilidade aumentada para crises nos modelo de ELT da injeção de pilocarpina, bem como de ácido caínico, também já fora identificada na ausência de brotamento (“sprouting”) (LONGO & MELLO, 1998). Tais autores sugerem que as crises recorrentes possam não ser originadas no hipocampo, não ficando dependentes de um circuito reverberante como aquele que ocorre no brotamento das fibras musgosas. Conforme visto em nossos resultados, um dos animais epiléticos examinado com 60 dias da injeção de pilocarpina não demonstrou brotamento neuronal, embora em um experimento tenha sido obtida a LTP e em outro não.

Pode-se pensar, nesse caso, que a presença de brotamento, assim como a presença de crises tenham ocorrido como processos paralelos.

Embora seja válido considerar que nenhum modelo experimental de ELT reproduza fielmente as epilepsias que ocorrem em humanos, isto não os invalida, pois os mesmos fornecem-nos o conhecimento a cerca de pequenos componentes desse grupo de doenças, podendo nos remeter a questões básicas tais como o conhecimento do modo como um cérebro fisiologicamente normal pode ser alterado a ponto de gerar crises (MATHERN et al., 1996).

Mesmo considerando as críticas em relação aos modelos da ELT e da LTP estudados e as limitações de cada pesquisa científica, poderíamos, ao final desse trabalho, relacionar nossos achados àqueles referentes aos de pesquisas clínicas com pacientes que sofrem de ELT com EH bilateral, visto que o modelo da pilocarpina é apontado como aquele que mais se assemelha à ELT humana. Nossos resultados revelam que o modelo experimental de epilepsia pelo uso da pilocarpina interferiu de modo negativo na indução da LTP e, portanto, na excitabilidade neuronal da região de CA1. O modelo da pilocarpina também interferiu negativamente na eficiência sináptica após um período crônico de crises recorrentes. Nesse sentido, pode-se pensar que déficits em funções cognitivas como memória e aprendizado, entre outros observados em avaliação neuropsicológica, possam estar relacionados a esse prejuízo do fenômeno plástico da LTP.

Por outro lado, também há críticas em relação aos estudos com a LTP. Essas referem que evidências experimentais não justificam a visão de que a LTP possa ser um equivalente da memória e do aprendizado (MC EACHERN & SHAW, 1996). Para tais autores, a relevância fisiológica da LTP permaneceria incerta devido a complexidade intrínseca do fenômeno, e seus componentes pelo uso heterogêneo e freqüentemente ambíguo de suas técnicas experimentais. Algumas controversas estariam associadas à função real da LTP, ao local exato de suas modificações, ao papel dos receptores e suas mudanças, ao fato de sofrer influência da idade do animal, ao grau de semelhança entre os efeitos facilitadores e inibidores da LTP. Assim a LTP não seria um processo único mas sim um espectro de vários fenômenos de potenciação que variam em sua duração, em sua função e em seus substratos bioquímicos (MC EACHERN & SHAW, 1996). Uma outra questão importante trazida nesse sentido é a de que a LTP é uma mudança artificialmente induzida na força sináptica, produzida por um estímulo elétrico ou químico em

determinadas vias sinápticas (KANDEL, 2000; MATHERN et al., 1996). Deste modo, não temos a certeza da existência natural dessa forma de plasticidade sináptica, o que pode nos levar a pensar que em alguns cérebros esta estimulação torna possível a potenciação, podendo existir também suas exceções.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho investigamos a existência de alterações na potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo de ratos no modelo experimental de epilepsia de lobo temporal (ELT) induzida pela pilocarpina. Para o estudo da LTP, analisamos os registros dos potenciais excitatório pós-sinápticos (PEPS) de campo previamente e posteriormente à estimulação tetânica, em fatias hipocampais de animais epiléticos com 30, 60 e 90 dias de epilepsia, e seus controles.

Nosso estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1) A LTP foi induzida em 70 a 80% dos animais dos grupos controles, em comparação a uma média de 30 a 40% dos animais epiléticos. Essa diferença foi significativa para os 30 minutos de estimulação tetânica. De um modo complementar, a chance de ocorrência da LTP em animais controles foi de 4 a 10 vezes maior do que a dos animais epiléticos. Assim, a ELT induzida pela pilocarpina demonstrou interferir de modo “negativo” na obtenção da LTP.

2) Identificou-se uma diminuição na inclinação (“slope”) do PEPS, medida esta associada à eficiência sináptica em praticamente todos os minutos (1^o, 5^o, 30^o) analisados após a indução da LTP para os animais epiléticos de 90 dias. A medida não se diferenciou entre os grupos de animais epiléticos de 90 dias e controles para o 60^o minuto da indução.

3) Observou-se a ocorrência de brotamento neuronal (“sprouting”) em quase todos os hipocampos dos animais epiléticos (com a exceção de um animal com 60 dias de pilocarpina), o que não foi evidenciado nos animais controles.

4) Nossos achados associam-se à hipótese de que a LTP sofreu modificações desfavoráveis a sua indução nos animais epiléticos e encontra-se alterada devido a um prejuízo na integridade hipocampal induzido pelo modelo da pilocarpina.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo constituiu-se em um desafio não só pessoal, mas também para nossa equipe de trabalho. Algumas técnicas já utilizadas anteriormente, tais como o fatiamento cerebral e a injeção sistêmica de pilocarpina, foram empregadas com experiência de anos anteriores. Por outro lado, a aplicação da técnica histológica de neo-Timm e, principalmente, os experimentos eletrofisiológicos para a indução da LTP constituíram-se em novos passos a serem dados, mas que hoje já fazem parte de um obstáculo vencido.

Dessa forma, constituem-se em um projeto futuro o aprofundamento de nossos achados sobre epilepsia e LTP. De especial interesse torna-se o estudo da LTP induzida por receptores metabotrópicos, visto que a necessidade de ampliar nossos estudos para além daqueles referentes a receptores do tipo NMDA ou AMPA. A introdução do registro intracelular concomitante ao registro do potencial pós-sináptico de campo torna-se essencial nesse aprofundamento da LTP. No sentido de dar um seguimento ao estudo de medidas de plasticidade em epilepsia, um outro ponto a ser trabalhado, é o estudo da LTD, já que alguns de nossos registros tenderam a não potenciar a resposta, principalmente quando se tratava dos animais epiléticos. Quanto às técnicas histológicas, pensa-se na necessidade de um estudo das sinapses, e até mesmo de corpo neuronal, para melhor mensurar a perda de corpos neuronais decorrentes do modelo de ELT trabalhado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) AFFIFI, A.K; BERGMAN,R.A. Functional Neuroanatomy: Text and Atlas. McGraw-Hill, 1998.
- 2) AGRANOFF, B.W; COTMAN, C.W; UHLER, M.D. Learning and Memory. In: SIEGEL, G.J. et al. Basic Neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects. Cap. 50. 6th ed. Lippincot Williams & Wilkins. p.607-625, 1999.
- 3) AMARAL, D.G. A Golgi study of the cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. J Comp Neur.182: 851-914, 1978.
- 4) AMARAL, D.G. Introduction: What is where in the medial temporal lobe? Hippocampus. 9: 1-6,1999.
- 5) ANDERSEN, P; ECLES , J.C; LOYNING, Y. Pathway of postsynaptic inhibition in the hippocampus. J. Neurophysiol. 27:608-619, 1964.
- 6) ANDERSEN, P; SILFVENIUS , H; SUNDBERG, S.H; SVEEN, O. A comparison of distal and proximal dendritic synapses on CA1 pyramids in guinea-pig hippocampal slices in vitro. J. Pyshiol. (Lond).307: 273-299, 1980.
- 7) ANDERSEN, P; SUNDBERG, S.H; SVEEN,O; WIGSTRÖM,H. Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. Nature. 266: 736-737, 1977.
- 8) ANDERSON, W.W; COLLINGRIDGE, G.L. The LTP program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. J. Neurosci. 15, 108 (1):71-83, 2001.
- 9) AVOLI, A; OLIVIER, A. Electrophysiological properties and synaptic responses in the deep layers of human epileptogenic neocortex *in vitro*. J. Neurophysiol. 61(3): 589- 606, 1989.
- 10)AVOLI, M; OLIVIER, A. Bursting in human epileptogenic neocortex is depressed by an N-methyl- D- aspartate antagonist. Neurosci. Lett. 76:249-254, 1987.
- 11)BABB, T. L; KUPFER, W. R; PRETORIUS, J.K. Recurrent excitatory circuits by sprouted mossy fibers into the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. Epilepsia. 29: 674, 1988.

- 12) BABB, T. L.; KUPFER, W.R.; PRETORIUS, J.K.; CRANDALL, P.H.; LÉVESQUE, M.F. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*. 42: 351-363, 1991.
- 13) BABB, T.L.; LIEB, J.P.; BROWN, J.W.; PRETORIUS, J.; CRANDALL, P.H. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia*. 25: 721–728, 1984.
- 14) BARNES, C.A.; RAO, G.; SHEN, J. Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartate_R- mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. *Neurobiol. of Aging*. 14: 445-452, 1997.
- 15) BARNES, C.A.; DANYSZ, W.; PARSONS, C.G. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. *Eur. J. Neurosci*. 8(3):565-571, 1996.
- 16) BARNES, C.A.; RAO, G.; FOSTER, T.C.; MC NAUGHTON, B.L. Region-specific age effects on AMPA sensitivity: electrophysiological evidence for loss of synaptic contacts in hippocampal field CA1. *Hippocampus*. 2(4):457-468, 1992.
- 17) BARNES, C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp Physiol Psychol*. 93(1):74-104, 1979.
- 18) BARRIONUEVO, G.; BROWN, T.H. Associative long-term potentiation in hippocampal slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80 (23): 7347-7351, 1983.
- 19) BEAR M.F.; CONNORS B.W.; PARADISO M.A. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 2^aed. Artes Médicas, 2002.
- 20) BERNARD, C.; HIRSCH J.C.; BEM-ARI Y. Excitation and inhibition in temporal lobe epilepsy: a close encounter. *Adv. Neurol*. 79: 821-828, 1999.
- 21) BERNARD, C.; WHEAL, H.V. Plasticity of AMPA and NMDA receptor mediated epileptiform activity in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 21: 95-107, 1995.
- 22) BERNARD, C.; MARSDEN, D.P.; WHEAL H.V. Changes in neuronal excitability and synaptic function in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 103: 17-26, 2001.
- 23) BERNSTEIN, J.; FISHER, R.S. Excessive glutamate as an inhibitor of excitatory transmission in rat hippocampal slice. *Neurosc. Lett*. 61: 19-24, 1985.

- 24) BLISS T.V.P; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of perforant path. *J.Physiol.*:331-356, 1973.
- 25) BLISS, T.V & COLLINGRIDGE G.L. A synaptic model of memory: long-term-potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361, 31-9, 1993.
- 26) BLUNCKE, I; BECK, H; AILING, A. L ; OTMAR, D.W. Molecular Neuropathology of Human Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res*. 36: 205- 223, 1999.
- 27) BONHAUS, D.W; PERRY, W.B; MC NAMARA, J.O. Decreased density, but not number, of N-methyl-D-aspartate, glycine and phencyclidine binding sites in hippocampus of senescent rats. *Brain Res*. 5:532(1-2):82-86, 1990.
- 28) BROWN, D.A; GAHWILER, B.H; GRIFFITH, W.H; HALIWELL, J.V. Membrane currents in hippocampal neurons. *Prog. Brain.Res*. 83: 141-160, 1990.
- 29) BROWN, T.H, KAIRISS, E.W.; KEENAN, C.L. Hebbian synapses: Biophysical mechanisms and algorithms. *Ann. Rev. Neurosc*. 13: 475-511, 1990.
- 30) BROWN, T.H; ZADOR, A.M. Hippocampus. In: SHEPERD, G. The Synaptic Organization of the Brain. Cap. 11. 3th ed. Oxford University Press, 1990.
- 31) BUCKMASTER, P.S; DUDEK, F.E. In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. *J Neurophysiol*. 81: 712-721, 1999.
- 32) BUZSAKI, G; HAAS, H.L; ANDERSON, E.G Long-term potentiation induced by physiologically relevant stimulus patterns. *Brain Res*. 435: 331-333, 1987.
- 33) CAVALHEIRO, E. A; LEITE, J. P; BORTOLLOTO, Z. A; TURSKI, W. A; IKONOMIDOU, C; TURSKI, L.. Long term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 32: 778-782, 1991.
- 34) CAVALHEIRO, E.A; SANTOS, N.F; PRIEL, M.R. The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia*. 37: 1015-1019, 1996.
- 35) CAVAZOS, J; SUTULA, T.P. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res*. 527: 1-6, 1990.
- 36) CENDES, F; KOBAYASHI, E. Epilepsia do lobo temporal. In: GUERREIRO, C.A.M (ed.). *Epilepsia*. Cap. 18. p. 201-213. Lemos Editorial, 2000.
- 37) CLARK, A. S; MAGNUSSON, K.R; COTMAN, C.W. In vitro autoradiography of hippocampal excitatory amino acid binding in aged Fischer-344 rats: Relationship to performance on the Morris water maze. *Behav. Neurosci*. 106: 324-335, 1992.

- 38) COLLINGRIDGE, G.L; KEHL, S.J; MC LENNAN, H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol.* 334:33-46, 1983.
- 39) CONTZEN, R; WITTE, O.W. Epileptic activity can induce both long-lasting potentiation and long-lasting depression. *Brain Res.* 653: 340-344, 1994.
- 40) COTMAN, C.W; PINILLA, F.G; KAHLE, J.S. Neural Plasticity and Regeneration. In: SIEGEL, G.J. et al. *Basic Neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects.* Cap. 29. 5^a ed. New York: Raven Press. Ltd. p. 607-625, 1994.
- 41) COULTER, D.A; RAFIQ, A; SHUMATE, M; GONG, Q.Z; DE LORENZO, R.J; LYETH, B.G. Brain injury-induced enhanced limbic epileptogenesis: anatomical and physiological parallels to an animal model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*, 26: 81-91, 1996.
- 42) COUTINHO, L.M.B; HILBIG, A; CALCAGNOTTO, M.A; PAGLIOLI, E; PAGLIOLI, N-E; DA COSTA, J.C; PALMINI, A; DE PAULA, E.C. Neuropatologia das epilepsias de difícil controle. *Arq. Neuropsiquiatria.* 57.2-B: 405-401, 1999.
- 43) DA COSTA, J.C; PALMINI, A.; YACUBIAN, E.M.T; CAVALHEIRO, E. (eds.). *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias – aspectos clínicos e cirúrgicos.* Vol. 1. p.129-136. Lemos, 1998.
- 44) DEUPREE, D.L; BRADLEY, J; TURNER, D.A. Age-related alterations in potentiation in CA1 region in F344 rats. *Neurobiol. of Aging.* 14: 249-258, 1993.
- 45) DINGLELINE, R. & MCBAIN, C.J.. Glutamate and Aspartate. In: SIEGEL, G.J et al. *Basic Neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects.* Cap.15.6th ed. Lippincot Williams & Wilkins. p. 607-625, 1999.
- 46) DINGLELINE, R. Hippocampus: synaptic pharmacology. In: DINGLELINE, R.(ed). *Brain Slices.* Plenum Press. p. 87-112, 1984.
- 47) DINGLELINE, R; MCBAIN, C. Excitatory amino acid transmitters. In: SIEGEL, G.J. et al. *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* Cap. 17.5th ed. New York: Raven Press. Ltd . p.367- 386, 1994.
- 48) DOUGLAS, R.J. The hippocampus and behavior. *Psychol. Bull.* 67: 416-442, 1967.
- 49) DU; F; WHETSELL, W.O, Jr; ABOU KHALIL, B; BLUMENKOPF, B; LOTHMAN, E.W; SCHWARCZ, R. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy . *Epilepsy Res.* 16: 223-233, 1993.

- 50) DUGAN, L.L ; CHOI, D.W . Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: SIEGEL, G.J. et al. Basic Neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects. Cap.34., 6th ed. Lippincot Williams & Wilkins. p.607-625,1999.
- 51) EHLERS, M.D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*. 28: 511-525, 2000.
- 52) ENGEL, J. Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Brain Res*. 26: 141-150, 1996.
- 53) ESCLAPEZ, M; HIRSCH, J. C; KHAZIPOV, R; BEN-ARI, Y; BERNARD, C. Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA*.94: 12151-12156, 1997.
- 54) FAGNI, L; BAUDRY, M; LYNCH,G. Electrophysiological study of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampal slice. *Behav. Brain Res*. 12: 187-188, 1984.
- 55) FERREIRA, B.C.L. Efeito de drogas anti-convulsivantes durante o status epilepticus induzido pela pilocarpina: aspectos ontogenéticos. Dissertação de Mestrado em Neurociências- Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, 1995.
- 56) FOSTER, T.C. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Rev*. 30: 236-249, 1999.
- 57) FREDERICKSON, C.J, HERNANDEZ, M.D; MC GINTY, J.F. Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res*. 480: 317-321, 1989.
- 58) FRIEDMAN, L.K; PELLEGRINI-GIAMPIETO,D.E; SPERBER,E.F; BENNETT, M. V. L; MOSHÉ, S. L; ZUKIN, R.S. Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABA_A receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. *J. Neurosci*. 14: 2697–2707, 1994.
- 59) FROTSCHER, M; ZIMMER, J. Lesion-induced mossy fiber to the molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. *J. Comp. Neurol*. 215: 299-311, 1983.
- 60) GIBBS, J.W; SHUMATE, M.D; COULTER, D.A. Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA_A receptor function in dentate granule and CA1 neurons. *J. Neurophysiol*. 77: 1924–1938, 1997.
- 61) GOLARAI, G; SUTULA, T.P. Functional alterations in the dentate gyrus after induction of long-term potentiation , kindling, and mossy fiber sprouting. *J. Neurophysiol*. 75: 343-353, 1996.

- 62) GOLDENSOHN. The relevance of secondary epileptogenesis to the treatment of epilepsy: kindling and the mirror focus *Epilepsia*. 25 (Suppl.) 2:S156-73, 1984.
- 63) GROOMS, S.Y; OPITZ, T; BENNETT, M. V. L; ZUKIN, R. S. Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 3631-3636, 2000.
- 64) GUERREIRO, A.M.; GUERREIRO, M.M. *Epilepsia*. Lemos Editorial, 1993.
- 65) GUSTAFSSON B, & WIGSTRÖM, H. Hippocampal long-lasting potentiation produced by pairing single volleys and brief conditioning tetani evoked in separate afferents. *J, Neurosci*. 6, 1575-1582, 1986.
- 66) GUTIERREZ, R.; HEINEMANN, U. Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. *Brain Res*. 815: 304-16, 1999.
- 67) HABLITZ, J.J; LANGMOEN, I.A. Excitation of hippocampal pyramidal cells by glutamate in the guinea pig and rat. *J. Physiol.Lond*.325: 317-331, 1982.
- 68) HALLIWELL, J.V; ADAMS, P.R. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res*. 250: 71-92, 1982.
- 69) HARTLEY. D. *Observations on man, his frame, his duty and his expectations*. London: Leake Y Frederick, 1749.
- 70) HEBB, D.O. *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. New York: Wiley.1949.
- 71) HEINEMANN, U; STABEL, J; RAUSCHE, G. Activity-dependent ionic changes and neuronal plasticity in rat hippocampus. *Prog. Brain Res*. 83: 197-214, 1990.
- 72) HENDERSON, G. Pharmacological analysis of synaptic transmission in brain slices. In: WALLIS, D.I. *Electrophysiology: A practical Approach*. Cap 5, 1993.
- 73) HERRON, C.E; WILLIAMSON, R; COLLINGRIDGE, G.L. A selective n-methyl-D-aspartate antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett*.61: 255-260, 1985.
- 74) HOLLMANN, M; HARTLEY, M; HEINEMANN, S. Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252: 851-853, 1991.
- 75) ISOKAWA, M; LEVESQUE, M,F. Increased NMDA responses and dendritic degeneration in human epileptic hippocampal neurons in slices. *Neurosci. Lett.*, 132: 212-216, 1991.

- 76) ITO, M. Long-term depression. *Annual Review of Neuroscience*. 12: 85-102, 1989.
- 77) IZQUIERDO, I; MC GAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology*. 11: 517-534, 2000.
- 78) IZQUIERDO, I; MC GAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology*. 11: 517-534, 2000.
- 79) IZQUIERDO, I; MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem (Review)*. 63(1):19-32, 1995.
- 80) IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. *Drug Dev. Res.* 30: 1-17, 1993.
- 81) KANDEL, E.R; SCHWARTZ, J.H; JESSEL, T.M. *Principles of Neural Science*. McGraw- Hill Companies. 4th ed. 2000.
- 82) KLINK, R ;ALONSO A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *J. Neurophysiol.* 77: 1829-1843, 1997.
- 83) KNOWLES, W.D, SCHWARTZKROIN, P.A. Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. *J. Neurosci.* 1: 318-322, 1981.
- 84) KNOWLES, W.D. Normal anatomy and neurophysiology of hippocampal formation. *J. Clinical Neurophysiol.* 9 (2): 252-63, 1993.
- 85) KNOWLES, W.D; AWAD, I.A; NAYE, L.M. Differences of in vitro electrophysiology of hippocampal neurons from epileptic patients with mesiotemporal sclerosis versus structural lesions. *Epilepsia.* 33: 601-609, 1992.
- 86) KÖHLING, R; LÜCKE, A; STRAUB, H; SPECKMANN, E; TUXHORN, I; WOLF, P; PANNEK, H; OPPEL, F. Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain.* 121: 1073-1087, 1998.
- 87) KOLB, B & WILSHAW, Q. Plasticity in the neocortex: mechanisms underlying recovery from early brain damage. *Prog in Neurob.* 32: 235-276, 1989.
- 88) LEE, K.S. Cooperativity among afferents for the induction of potentiation in CA1 region of the hippocampus. *J. Neurosci.* 3: 1369- 1372, 1983.
- 89) LEITE, J.P; CAVALHEIRO, E.A. Neurobiologia da Esclerose Mesial Temporal. In: DA COSTA, J.C. et al. *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias – aspectos clínicos e cirúrgicos*. Cap. 7. Vol. 1. Editora Lemos. 129-136, 1998.

- 90) LEMOS, T; CAVALHEIRO, E.A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp. Brain Res.* 102: 423-28, 1995.
- 91) LEVY, W.B; STEWARD, O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Res.* 175: 233-245, 1979.
- 92) LIU, Z; YANG, Y; SILVEIRA, D.C; SARKISIAN, M.R; TANDON, P; HUANG, L.T; STAFSTROM, C.E. ; HOLMES, G.L. Long-term effects of neonatal seizures during early brain development. *Neuroscience*, 92: 1443-1454, 1999.
- 93) LONGO, B.M; MELLO, L.E. Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. *Epilepsy Res.* 32: 172-182, 1998.
- 94) LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol.* 46: 113-177, 1934.
- 95) LOSCHER, W; RUNDFELDT, C; HONACK, D. Low doses of NMDA receptor antagonists synergistically increase the anticonvulsant effect of the AMPA receptor antagonist NBQX in the kindling model of epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 5: 1545-1550, 1993.
- 96) LOUVEL, J; PUMAIN R; AVOLI, M; KURCEWICZ, I; DEVAUX, B; CHODKIEWICZ, J.P. GABA_A inhibition controls the calcium flows during NMDA-dependent epileptiform activity in human epileptogenic neocortex. *Epilepsy Res. (Suppl).* 12: 293-300, 1996.
- 97) LÜSCHER, C; NICOLL, R.A; MALENKA, R.C; MULLER, D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nature Neurosc.* 3: 545-550, 2000.
- 98) MADISON, D.V; NICOLL, R.A. Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurones in vitro. *J. Physiol. (Lond).* 354: 319-331, 1984.
- 99) MALENKA, R.C; NICOLL, R.A. Long-term potentiation- a decade of progress? *Science.* 285: 1870-73, 1999.
- 100) MALENKA, R.C; KAUER, J.A; PERKEL, D.J; KELLY, P.T; NICOLL, R.A; WAXHAM, M.N. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature.* 340: 554-557, 1989.
- 101) MALINOW, R; MAINEN, Z.F; HAYASHI, Y. LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Current Opinion in Neurobiol.* 10: 352-357, 2000.

- 102) MALINOW,R; SCHULMAN,H; TSIEN,R.W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*.245: 862-866, 1989.
- 103) MANGAN, P.S; BERTRAM, E.H. Ontogenic of altered synaptic function in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Brain Res.*, 799: 183-196, 1998.
- 104) MANGAN, P.S; BERTRAM, E.H. Shortened-duration GABA(A) receptor-mediated synaptic potentials underlie enhanced CA1 excitability in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 80: 1101-1111, 1997.
- 105) MAREN, S & BAUDRY, M. Properties and Mechanisms of Long- Term Synaptic Plasticity in the Mammalian Brain: Relationships to Learning and Memory. *Neurobio Learn. and Memory*.63: 1-18, 1995.
- 106) MATHERN, G.W; BABB, T.L; LEITE, J.P; PRETORIUS, J.K; YEOMAN, K.M; KUHLMAN, P.A. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res*. 26: 151-161, 1996.
- 107) MATHERN, G.W; LEITE, J.P; PRETORIUS, J.K; QUINN, B; PEACOCK, W.J; BABB, T.J. Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. *Dev.Brain Res*. 78: 70-80, 1994.
- 108) MATHERN, G.W; PRETORIUS, J.K; KORNBLUM, H.I; MENDOZA,D; LOZADA,A; LEITE,J.P; CHIMELLI, L.M; FRIED, I; SAKAMOTO, A.C; ASSIRATI, J.A.; LEVESQUE, M.F; ANDELSON, P.D; PEACOCK, W.J. Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain*. 120: 1937-1959, 1997.
- 109) MC INTYRE, D.C; WONG, R.K. Cellular and synaptic properties of amygdala-kindled pyriform cortex in vitro. *J.Neurophysiol*. 55: 1295-1307, 1986.
- 110) McILWAIN, H; BUCHEL, L; CHESHIRE , J.D. The inorganic phosphate and phosphocreatine of brain especially during metabolism in vitro. *Bioch, J*. 48: 12-20, 1951.
- 111) MCNAMARA, J.O. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci*. 14: 3413-3425, 1994.
- 112) MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *Am. Soc. for Nutritional Sciences*. 1007s-1015s, 2000.
- 113) MELDRUM, B.S; AKBAR, M.T; CHAPMAN, A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res*, 36: 189-204, 1999.

- 114) MELLO, L.E; CAVALHEIRO, E.A; TAN, A.M; KUPFER, W.R; PRETORIUS, J.K; BABB, T.L; FINCH,D.M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting . *Epilepsia*. 34: 985-995, 1993.
- 115) MELLO, L.M.A. Aspectos Neurofisiológicos das epilepsias do Lobo Temporal. *Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia*. 6 (3): 1-4, 1993.
- 116) MODY,I. Ion channels in epilepsy. *Int.Ver. Neurobiol*. 42: 199-226, 1998.
- 117) MORGAN, S.L; TEYLER, T.J. Epileptic-like activity induces multiple forms of plasticity in hippocampal area CA1. *Brain Res*. 917: 90-96, 2001.
- 118) MORRELL, F. The role of secondary epileptogenesis in human epilepsy. *Arch. Neurol*. 48: 1221-1224, 1991.
- 119) MULKEY, R.M; MALENKA, R.C. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*. 9: 967-975,1992.
- 120) MULLER, M. Morphological and functional consequences of chronic epilepsy in rat hippocampal slice cultures. *Europ. J. Physiol*. 422(4): 418-423, 1993b.
- 121) MÜLLER,M. GAHWILLER, B.H; RIETSCHIN, L and THOMPSON. Reversible loss of dendritic spines and altered excitability after chronic epilepsy in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90 (1): 257- 61, 1993a.
- 122) NEILL , J; LIU, Z; SARKISIAN, M; TANDON, P; YANG, Y; STAFSTROM, C.E; HOLMES, G.L. Recurrent seizures in immature rats: effect on auditory and visual discrimination. *Dev. Brain Res*. 95: 283-292, 1996.
- 123) NICOLL R.A & MALENKA, R.C. Constrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 377, 115-8, 1995.
- 124) O'DELL, T.J; HAWKINS,R.D; KANDEL,E.R; ARANCIO,O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc.Natl.Acad.USA*. 88: 11285-11289, 1991.
- 125) O'DELL, T.J; KANDEL, E.R; GRANT,S.G.N. Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature*.353: 558-560,1991.
- 126) OKAZAKI, M.M; EVENSON,D.A; NADLER, J.V. Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin. *J. Comp. Neurol*. 352: 515-534, 1995.

- 127) OKAZAKI,M.M; MOLNAR,P; NADLER,J.V. Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth. *The Am. Psysiol. Soc.* 1645-1660, 1999.
- 128) OLDS, J. Learning and the hippocampus. *Rev..Can. Biol.(Suppl.)*, 31:215-238, 1972 .
- 129) PALMINI, A; DA COSTA, J.C. Introdução à epileptologia clínica e classificação das epilepsias e crises epilépticas. In: DA COSTA, J.C. et al. *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias – aspectos clínicos e cirúrgicos.* Vol. 1. Editora Lemos. 129-136, 1998.
- 130) PITCKÄMEN, A; TUUNANEM,J; KALVIAINEM; PARTANEN,K; SALMENPERÄ,T. Amigdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 32: 233-253, 1998.
- 131) PRIGOGINE, I. Dos Relógios às nuvens. *Novos Paradigmas, cultura e subjetividade.* Artes Médicas.p.257-270, 1996.
- 132) PUTNEY, J.W.J. Calcium. In: SIEGEL, G.J. et al. *Basic Neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects.* Cap.23.6th ed. Lippincot Williams & Wilkins. p.453-469, 1999.
- 133) QUIGG, M; BERTRAN, E.H; JACKSON, T. Longitudinal distribution of hippocampal athrophy in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 27: 101-110, 1997.
- 134) RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Eletroenceph. Clin. Neurophysiol.*32: 281-294, 1972.
- 135) RACINE, R.J; MOORE,K.A; EVANS, C. Kindling-induced potentiation in the piriform cortex. *Brain Res.* 556: 218-225, 1991.
- 136) RAINNIE, D.G; ASPRODINI, E.K; SHINNICK GALLAGHER, P. Kindling-induced long-lasting changes in synaptic transmission in the basolateral amygdala. *J. Neuropshysiol.* 67: 443-454, 1992.
- 137) RAMON y CAJAL , S. The Croonian Lecutre : Le fine structure des centres nerveux. *Proc R.Soc. London Ser. B*55, 444-447, 1894.
- 138) RAMÓN y CAJAL, S. *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés.* Em: Maloine, Paris, 1911.
- 139) RATZLIFF, A.D.H; SANTHAKUMAR, V; HOWARD, A; SOLTESZ, I. Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis? *Trends Neurosci.* 25: 140-144, 2002.

- 140) RIBAK, C.E; TRAN, P.H; SPIGELMAN, I; OKAZAKI, M. M.; NADLER, J.V. Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. *J. Comp. Neurol.* 428: 240-253, 2000.
- 141) ROSENZWEIG, E.S; BARNES, C.A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurob.* 69: 143-179, 2003.
- 142) SANABRIA, E.G. Estudo Eletrofisiológico da Epileptogênese crônica no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina. Tese de Doutorado em Neurociências- Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, 1999.
- 143) SANABRIA, E.R.G; CAVALHEIRO,E.A. Epileptogênese: contribuição dos modelos experimentais. In GUERREIRO C.A.M. et al. *Epilepsia*. Cap.4. Lemos editorial e gráficas LTDA. p 29-57, 2000.
- 144) SANABRIA, E.R.G; SCORZA, F.A; CAVALHEIRO,E.A. O uso de fatias de tecido cerebral ("brain slices") no estudo da epilepsia do lobo temporal. *Rev. Neurociências*, 5(1): 34-46, 1997.
- 145) SANDER, J.W; HART, Y.M. *Epilepsia: um guia prático*. Merit Publishing International. 1999.
- 146) SANDERS, M.J. Chronic Failure in the maintenance of long term potentiation. *Brain Res.* 69-76,2000.
- 147) SANTOS, M.F. Efeitos de Múltiplos *Status Epilepticus* induzidos pela pilocarpina em animais em desenvolvimento. Tese de Doutorado em Ciências- Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina), 2000.
- 148) SARIHI, A; FATHOLLAHI,Y; MOTAMEDI,F; NAGHDI,N; POUR, A.R. Effects of lidocaine inactivation of the median raphe nucleus on long-term potentiation and recurrent inhibition in the dentate gyrus of rat hippocampus. *Brain Res.* 962: 159-168, 2003.
- 149) SCHWARTZKROIN, P.A; ANDERSEN, P. Glutamic acid sensitivity of dendrites in hippocampal slices in vitro. *Adv. Neurol.* 12: 45-51, 1975.
- 150) SCHWARTZKROIN, P.A; TURNER, D.A; KNOWLES, W.D; WYLER, A. R. Studies of human and monkey "epileptic" neocortex in the in vitro slice preparation. *Ann. Neurol.*13: 249-257, 1983.
- 151) SENSI, S.L; YIN, H.Z; CARRIEDO, S.G; RAO, S.S; WEISS, J.H. Preferential Zn^{2+} influx through Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate triggers prolonged

- mitochondrial superoxide production. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 2414-2419, 1999.
- 152) SERAFINI, L.N; LEITE, J.P. Neuropatologia. In: GUERREIRO, C.A.M (ed.). Epilepsia. Cap. 5. p. 59-69. Lemos Editorial, 2000.
- 153) SERESS, L;FROTSCHER, M. Morphological variability is a characteristic feature of granule cells in the primate fascia-dentata: A combined golgi electron-microscope study. J Comp Neurol. 293: 253-267, 1990.
- 154) SHENG, M; LEE,S.H. AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. Cell. 105: 825-828, 2001.
- 155) SHEPHERD, G. M ; KOCH, C (1997). Introduction to synaptic circuits. In: SHEPHERD, G.M et al. Synaptic Organization of the Brain, 4ed,. New York, Oxford University Press, pp 1-36.
- 156) SHERRINGTON, C.S. The Central Nervous System. In: FOSTER, M. et al. A textbook of physiology. Macmillan, 1897.
- 157) SLATER, N.T; STELZER, A; GALVAN,M. Kindling-like stimulus patterns induce epileptiform discharges in the guinea pig in vitro hippocampus. Neurosc. Lett. 60: 25-31, 1985.
- 158) SLOVITER, R.S. Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability *in vivo*. Hippocampus. 1: 31-40, 1991.
- 159) SQUIRE, L.R. Memory and the hippocampus: a syntesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev.99: 195-231
- 160) STORM, J.F. Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. Nature. 336: 379-381, 1988.
- 161) STORM,J.F. An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. J. Physiol. Lond., 409: 171-190, 1989 apud SANABRIA, 1999.
- 162) STRINGER, J.L; LOTHMAN, E.W. Hippocampal slices from kindled rats show an increased sensitivity for induction of epileptiform activity by changes in extracelular ion concentrations. Neurosci. Lett.89: 43-48, 1988.
- 163) SUTULA, T; CASCINO, G; CAVAZOS, J; PARADA, I; RAMIREZ, L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. Ann Neurol. 26: 321-330, 1989.

- 164) SUTULA, T; HE, X-X; CAVAZOS, J; SCOTT,G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science*. 239: 1147-1150, 1988.
- 165) TAKEDA, A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Rev*. 34: 137-148,2000.
- 166) TAUCK, D.L; NADLER, J. V. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci*. 5: 1016-1022,1985.
- 167) TEYLER, T.J. Brain slice preparation: hippocampus. *Brain Research Bulletin*. 5: 391-403, 1980.
- 168) TEYLER, T.J; DI SCENNA. The hippocampal memory indexing theory. *Behav. Neurosci*.100: 147-154, 1986.
- 169) TURSKI, W.A; CAVALHEIRO, E.A; SCHWARZ, M; CZUCZWAR, S.J; KLEINROK, Z; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavior Brain Res*. 9: 315-35, 1983.
- 170) WEISS, J.H; SENSI, S.L. Ca^{2+} - Zn^{2+} permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 23: 365-371,2000.
- 171) WENK, G.L; BARNES C.A. Regional changes in the hippocampal density of AMPA and NMDA receptors across the lifespan of the rat. *Brain Research*. 885: 1-5, 2000
- 172) WENZEL, H.J; WOOLEY, C.S; ROBBINS, C.A; SCHWARTZKROIN, P.A. Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. *Hippocampus*. 10: 244-260, 2000.
- 173) WIGSTRÖM, H; GUSTAFSSON, B; HUANG, Y.Y; ABRAHAM, W.C. Hippocampal long lasting potentiation is induced by pairing single afferent volleys with intracellularly injected depolarizing current pulses. *Acta Physiol.Scand*. 126: 317-319, 1986.
- 174) WU, C.L; HUANG, L.T; LIOU, C.W; WANG,T.J; TUNG, Y.R; HSU, H.Y; LAI,M.C. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats result in long-term deficits in spatial learning and hippocampal cell loss. *Neurosc. Lett*. 312: 113-117,2001.

- 175) WU, K.; LEUNG, L.S. Increased dendritic excitability in hippocampal CA1 *in vivo* in the kainic acid model of temporal lobe epilepsy: a study using current source density analysis. *Neuroscience*.116: 599-616, 2003.
- 176) WU, M.; SHANABROUGH, M; LERANTH, C. & ALREJA, M. Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. *J Neurosci*. 20: 3900-3908, 2000.
- 177) WUARIN J,P; DUDEK, F.E. Excitatory synaptic input to granule cells increases with time after kainate treatment . *J. Neurophysiol*. 85: 1067-1077, 2001.
- 178) YE, L; QI, J.S; QIAO, J.T. Long-term potentiation in hippocampus of rats is enhanced by endogenous acetylcholine in a way that is independent of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosc. Lett*. 300: 145-148, 2001.
- 179) ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press, 1999.
- 180) ZILLES, K. Neuronal plasticity as na adaptative property of central nervous system. *Annals of Anatomy*, 174: 383-391, 1992.