

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Gabriela Lazzarotto

Epileptogênese e oscilações corticais e talâmicas *in vitro* durante o desenvolvimento no modelo animal de duplo insulto: WAR com malformação cortical

Porto Alegre

2021

Gabriela Lazzarotto

Epileptogênese e oscilações corticais e talâmicas *in vitro* durante o desenvolvimento no modelo animal de duplo insulto: WAR com malformação cortical

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestra em Neurociências pelo Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Lazzarotto, Gabriela

Epileptogênese e oscilações corticais e talâmicas in vitro durante o desenvolvimento no modelo animal de duplo insulto: WAR com malformação cortical / Gabriela Lazzarotto. -- 2021.

49 f.

Orientadora: Maria Elisa Calcagnotto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. epileptogênese. 2. criolesão. 3. Wistar Audiogenic Rat. 4. Circuito corticotalâmico. I. Calcagnotto, Maria Elisa, orient. II. Título.

Gabriela Lazzarotto

Epileptogênese e oscilações corticais e talâmicas in vitro durante o desenvolvimento no modelo animal de duplo insulto: WAR com malformação cortical

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestra em Neurociências pelo Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Aprovada em: Porto Alegre, 26 / 10 / 2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marco Idiart
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Beatriz de Oliveira Monteiro
Universidade Federal de São Paulo

Prof^a. Dra. Lisiane Porciúncula
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Claudino e Zilda, e irmã, Isadora pelo apoio e amor, por estarem sempre presentes apesar da distância e que sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Ao Vinicius, meu namorado e melhor amigo, por ter sido meu maior companheiro durante esta caminhada, por toda paciência, incentivo, compreensão, carinho e amor. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Agradeço a professora e orientadora Dra. Maria Elisa Calcagnotto pela dedicação irrestrita e por todos os ensinamentos, apoio, respeito e pelo exemplo profissional. Por acreditar no potencial e se esforçar para que os seus alunos atinjam os seus objetivos.

As minhas colegas de laboratório e amigas que contribuíram para a evolução deste trabalho, a ajuda de vocês foi fundamental: Natividade, Joseane, Querusche, Letícia, Joelma, Lívia, Ana Paula, Carine.

Ao Núcleo de Assessoria Estatística (NAE) pelos serviços de assessoria estatística, em especial a Professora Vanessa Bielefeldt Leotti e aos colegas Bernardo Altenbernd, Maicon Michael Fridrich Gottselig, Maitê Cristiane Mückler Nunes e Renan Baiocco Pereira.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Bioquímica e a agência de fomento a pesquisa CAPES por fornecerem o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

“Somewhere, something incredible
is waiting to be known.”

Carl Sagan

RESUMO

As malformações do desenvolvimento cortical (MDC) são um grupo de desordens que são caracterizadas por alterações estruturais e funcionais do desenvolvimento do córtex cerebral levando à reorganização das redes neurais que contribui para o alto potencial epileptogênico. Para o estudo das MDC, um dos modelos animais utilizado é o modelo de criolesão (*freeze-lesion*- FL), que consiste em induzir uma lesão cortical na área somatossensorial por congelamento em animais recém-nascidos, levando a formação de microgirria cortical focal. Nesse modelo, apesar da indução da reorganização da rede neural e hiperexcitabilidade local, os animais apresentam raras crises epiléticas. Entretanto, ao associar o modelo de criolesão a um modelo de susceptibilidade a crises epiléticas audiogênicas (linhagem Wistar Audiogenic Rat - WAR) há um maior potencial dos animais em desenvolver crises epiléticas espontâneas. Este modelo de duplo insulto permite estudar o processo de epileptogênese primária e secundária e a dinâmica das oscilações cerebrais durante o desenvolvimento. Assim, o objetivo é avaliar as oscilações interictais corticais e talâmicas e a atividade epileptiforme *in vitro* com indução da hiperexcitabilidade com 4-aminopiridina (4-AP) + 0 Mg²⁺ no modelo animal de duplo insulto WAR-MDC ao longo do desenvolvimento. Para isso, foi induzida microgirria por meio da criolesão no córtex somatossensorial do hemisfério cerebral direito em filhotes de ambos os sexos (P0) de ratos Wistar (Wistar-FL) e WAR (WAR-FL). Os animais Sham (Wistar-Sham e WAR-Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem a criolesão. Os registros extracelulares *in vitro* foram realizados nos diferentes grupos (Wistar-Sham, Wistar-FL, WAR-Sham e WAR-FL), nos hemisférios direito e esquerdo e em dois tempos distintos: P20 a P25 (idade 1= ID1, início da adolescência) e P35 a P45 (idade 2= ID2, adulto jovem). Os eletrodos foram posicionados na camada 4 do córtex somatossensorial e no tálamo - núcleo ventral póstero-medial (VPM) para registro eletrofisiológico extracelular simultâneo. A fim de aumentar a excitabilidade neuronal, cada fatia cerebral foi perfundida com uma solução de LCRAr modificada com 0 Mg²⁺ e adição de 4-AP 100µM. Foram feitas as análises de frequência interictal, ictal, duração dos eventos ictais e análise da densidade espectral de potência (PSD – do inglês *power spectral density*) das oscilações corticais e talâmicas registradas *in vitro*. Os principais achados mostram mudanças no padrão de atividade epileptiforme e nas oscilações corticais e talâmicas *in vitro* durante o período da adolescência e o início da idade adulta no modelo animal de duplo insulto e nos animais WAR. Apesar da diminuição da atividade epileptiforme *in vitro* no modelo de duplo-insulto ser semelhante aos demais animais, o aumento detectado da potência das oscilações de alta frequência talâmicas no decorrer do desenvolvimento neste modelo pode ser um indicador de uma reorganização patológica da rede neuronal que contribui para a hiperexcitabilidade. Estes achados sugerem que o modelo do duplo insulto pode ser muito útil para estudo da dinâmica das oscilações cerebrais, da susceptibilidade à atividade epileptiforme e dos mecanismos de epileptogênese durante o desenvolvimento.

Palavras-chave: Criolesão. Wistar Audiogenic Rat. Epileptogênese. Circuito corticotalâmico.

ABSTRACT

Developmental cortical malformations (DCM) are characterized by structural and functional developmental changes in the cerebral cortex leading to reorganization of neural networks that contributes to epileptogenesis. One of the animal models of DCM is the freeze-lesion model (FL), which consists of a cortical lesion in the somatosensory area are induced by freezing in newborn animals that leads to a cortical microgyria. Despite the induction of neural network reorganization and local hyperexcitability, the occurrence of seizure in these animals is rare. However, by performing the freeze-lesion in rats susceptible to audiogenic seizures (Wistar Audiogenic Rat - WAR strain) increases the chance of animals to develop spontaneous epileptic seizures. This double-hit model allows to study not only the epileptogenesis process but also the dynamics of brain oscillations during development. We aim to evaluate cortical and thalamic interictal oscillations and epileptiform activity in brain slices induced by 4-aminopyridine (4-AP) + 0 Mg²⁺ in the double-hit animal model WAR-MDC throughout development. Experimental microgyria in the right hemisphere somatosensory cortex were induced through freeze-lesion in neonates of both sexes (P0) of Wistar (Wistar-FL) and WAR (WAR-FL) rats. The Sham animals (Wistar-Sham e WAR-Sham) underwent to the same procedure without the freeze lesion. *In vitro* extracellular recordings were performed in all groups (Wistar-Sham, Wistar-FL, WAR-Sham and WAR-FL), in the right and left hemispheres at two different periods: P20 to P25 (age 1= ID1, early adolescence) and P35 to P45 (age 2= ID2, young adult). The electrodes were placed in the layer 4 of the somatosensory cortex and in the thalamus – ventral posteromedial nucleus - VPN and for simultaneous extracellular field potential recordings. In order to increase neuronal excitability, each brain slice was perfused with a modified LCRAr solution with 0 Mg²⁺ and addition of 100µM of 4-AP. Analyses of frequency of interictal and ictal events and duration of ictal events were performed. The power spectral density (PSD) analysis of cortical and thalamic oscillations recorded *in vitro* was also performed. The main findings were changes in the epileptiform activity pattern and cortical and thalamic oscillations *in vitro* during the period of adolescence and early adulthood in the double-hit model and in WAR animals. Although in the epileptiform activity *in vitro* in the double-hit model decreased as the other animals, the increased power of thalamic high-frequency oscillations over the course of development detected in this model could be an indicator of a pathological reorganization of the neuronal network contributing to the hyperexcitability. These findings suggest that the double-hit model may be useful to study the dynamics of brain oscillations, susceptibility to epileptiform activity and mechanisms of epileptogenesis during development.

Keywords: Freeze-lesion. Wistar Audiogenic Rat. Epileptogenesis. Corticothalamic pathway.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-Aminopiridina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CER	Crises Epilépticas Espontâneas e Recorrentes
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Sciences
ECoG	Eletrocorticografia
EEG	Eletroencefalograma
FG	<i>Fast Gamma</i>
FL	<i>Freeze-Lesion</i>
GEE	Equações De Estimações Generalizadas
HFO	<i>High Frequency Oscillations</i>
IBRO	International Brain Research Organization
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia
KCC2	Cotransportador K-Cl
LCRAc	Líquido Cefalorraquidiano Artificial De Corte
LCRAr	Líquido Cefalorraquidiano Artificial De Registro
MDC	Malformações do Desenvolvimento Cortical
MG	<i>Middle Gamma</i>
NKCC1	Cotransportador Na-K-2Cl
PMG	Polimicrogiria
PSD	<i>Power Spectral Density</i>
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SBNeC	Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
SG	<i>Slow Gamma</i>
SWD	<i>Spike-Wave Discharges</i>
VPM	Núcleo Ventral Póster-Medial
WAR	<i>Wistar Audiogenic Rat</i>

SUMÁRIO

1 Introdução	9
1.1 <i>Malformações do Desenvolvimento Cortical</i>	9
1.1.1 Polimicrogiria	10
1.2 <i>Oscilações cerebrais</i>	11
1.3 <i>Alterações das oscilações cerebrais em epilepsias</i>	13
1.4 <i>Modelo animal de malformação do desenvolvimento cortical por criolesão</i>	14
1.5 <i>Modelo animal de duplo insulto: lesão cortical por congelamento em ratos da linhagem WAR (wistar audiogenic rat)</i>	15
2 Justificativa	16
3 Hipótese	17
4 Objetivo	17
5 Metodologia	17
5.1 <i>Animais</i>	17
5.2 <i>Indução da criolesão</i>	18
5.3 <i>Eletrofisiologia in vitro</i>	19
5.3.1 <i>Preparo das fatias cerebrais</i>	20
5.3.2 <i>Registros eletrofisiológicos extracelulares in vitro</i>	21
5.4 <i>Análise estatística</i>	22
6 Resultados	23
7 Discussão	38
8 Conclusão	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO I	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL

As malformações do desenvolvimento cortical (MDC) são um grupo de desordens que se originam a partir de falhas no processamento normal do desenvolvimento cortical cerebral, gerando alterações micro e macroscópicas no cérebro (BARKOVICH *et al.*, 1996). Vários fatores estão ligados à patogênese das MDC, como mutações genéticas, fatores ambientais, infecções neonatais, isquemia, desordens do metabolismo e hemorragias (PANG *et al.*, 2008). É estimado que 40% das epilepsias refratárias em crianças é devido a MDC's e cerca de 75% dos pacientes com MDC terão epilepsia (KUZNIECKY *et al.*, 1994; KUZNIECKY, 1995; LEVENTER *et al.*, 1999).

A primeira classificação para as MDC's foi feita com base na primeira etapa do neurodesenvolvimento que foi afetada, porém, com o avanço das pesquisas e novas descobertas, as classificações mais recentes consideram também os fatores genéticos e achados de neuroimagem presentes nas MDC's (BARKOVICH *et al.*, 1996; BARKOVICH *et al.*, 2012). Segundo a classificação mais recente publicada em 2012 por Barkovich e colaboradores, as MDC's derivam da interrupção de algum dos três estágios principais do desenvolvimento cortical: proliferação celular e apoptose, migração celular e desenvolvimento pós-migracional (Tabela 1). Apesar das MDC's terem sido separadas nesses três estágios, é evidente que a perturbação inicial afetará as etapas seguintes do desenvolvimento do cérebro, podendo existir uma sobreposição entre as fases o que resulta em disfunções em mais de um nível (PANG *et al.*, 2008).

Entre as MDC, tem destaque as Polimicrogírias que originam regiões cerebrais epileptogênicas sendo consideradas entre as causas mais significativas de epilepsia refratária em crianças (IFFLAND; CRINO, 2017).

Tabela 1 - Classificação das Malformações do Desenvolvimento Cortical

Grupo I	Malformações secundárias à proliferação neuronal e glial anormal ou apoptose	<ol style="list-style-type: none"> 1) Microcefalia severa congênita 2) Megalencefalia 3) Disgenesia cortical com proliferação celular anormal, mas sem neoplasia 4) Displasias corticais com proliferação celular anormal e neoplasia
Grupo II	Malformações devido à migração celular anormal	<ol style="list-style-type: none"> 1) Malformações com anormalidades neuroependimais: Heterotopia periventricular 2) Malformações devidas à migração transverso anormal 3) Malformações presumidamente devidas a anormalidades na migração localizada tardia radial ou transverso tangencial 4) Malformações presumidamente devidas a anormalidades na migração terminal e defeitos na membrana limitante pial
Grupo III	Malformações devido às anomalias do desenvolvimento pós migracional	<ol style="list-style-type: none"> 1) Malformações com polimicrogírias ou malformações corticais semelhantes a polimicrogírias 2) Displasias corticais secundárias a erros inatos do metabolismo 3) Displasias corticais focais (sem neurônios dismórficos) devido a distúrbios tardios do desenvolvimento 4) Microcefalia do desenvolvimento pós migracional sem evidência de injúria encefálica

(modificada de Barkovich, 2012)

1.1.1 Polimicrogíria

A polimicrogíria (PMG) é uma das MDC's mais comuns, acontecendo em aproximadamente 20% dos casos de todas as MDC's (LEVENTER *et al.*, 1999). A PMG é causada por alterações nos últimos estágios da migração neuronal ou nos primeiros estágios da organização cortical, tipicamente entre a 17^a e a 26^a semana de gestação, sendo considerada, pela classificação mais recente, uma desordem devido a anomalias do desenvolvimento pós migracional (BARKOVICH *et al.*, 2012; KANEKAR, 2011). Como resultado do distúrbio no processo de desenvolvimento, há alterações nas camadas do córtex cerebral que se manifestam como múltiplos microgírios. Do ponto de vista histológico, há a identificação de dois subtipos: um córtex com somente 4 camadas ou um córtex sem estratificação. Contudo, os dois subtipos podem coexistir em um mesmo paciente e subtipos intermediários a estes

podem também estar presentes em áreas adjacentes (BARKOVICH, 2010; KANEKAR, 2011).

A localização mais comum das PMG, ocorrendo em 70% dos casos, é ao redor do sulco lateral, que separa o lobo frontal e parietal do lobo temporal (HAYASHI, 2002). Além disso, as PMG's podem ser encontradas associadas com outras malformações, como agenesia ou hipoagenesia do corpo caloso, heterotopia periventricular ou subcortical, displasias corticais focais e esquizencefalia (BARKOVICH, 2010; MAILLARD, 2018). A etiologia das PMG's é heterogênea, podendo ser de causa genética ou ambiental, como infecções congênitas (particularmente infecções por citomegalovírus), hipóxia-isquemia localizada ou difusa e traumas (SQUIER, 2014). A PMG pode ser focal ou difusa, unilateral ou bilateral e a extensão e localização das anormalidades determina as manifestações clínicas dos pacientes, incluindo problemas motores, atraso no desenvolvimento, atraso na linguagem e mais comumente, epilepsias, que ocorrem em 80% dos casos (JANSEN *et al.*, 2015; KANEKAR, 2011; SQUIER, 2014). Geralmente as crises começam entre 4 e 12 anos de idade e aproximadamente 65% dos pacientes são refratários aos medicamentos disponíveis (VERROTTI *et al.*, 2010).

1.2 OSCILAÇÕES CEREBRAIS

As oscilações cerebrais são caracterizadas por ondas de diferentes amplitudes e frequências e são o resultado do somatório do fluxo de correntes iônicas produzidas pela integração das células neurais no encéfalo (BUZSÁKI, 2006). As correntes iônicas geram alterações periódicas do potencial de campo que podem ser detectadas e medidas *in vivo*, através de eletrodos, por meio de registros de eletroencefalograma (EEG) e eletrocorticografia (ECoG) ou *in vitro*, com registros extracelulares em preparações de fatias cerebrais (BUZSÁKI, 2012).

As oscilações cerebrais ocorrem em um amplo espectro de frequências, variando de 0,05 a aproximadamente 600 Hz (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004). Comumente, são divididas em bandas de frequência que incluem: delta (1-4Hz), teta (4-12 Hz), beta (12-30 Hz), gama (30-100 Hz) e oscilações de alta frequência (HFO – do inglês, *high frequency oscillations*; 100-600 Hz). As HFO ainda podem ser subclassificadas em *ripples* (100-250 Hz) e *fast ripples* (250-600 Hz).

Os traçados de EEG, em geral, podem ser definidos como um somatório de ondas senoidais com diferentes frequências, amplitudes e fases. Dessa forma, um traçado pode ser decomposto nas diferentes faixas de frequência, o que possibilita estimar quantitativamente a contribuição de cada frequência no traçado eletroencefalográfico, com uma análise chamada de densidade de potência espectral (PSD, do inglês, *power spectral density*) (AL-FAHOUM, 2014). Assim, a análise espectral facilita a comparação quantitativa, sendo uma medida mais exata e informativa para os estudos (Figura 1).

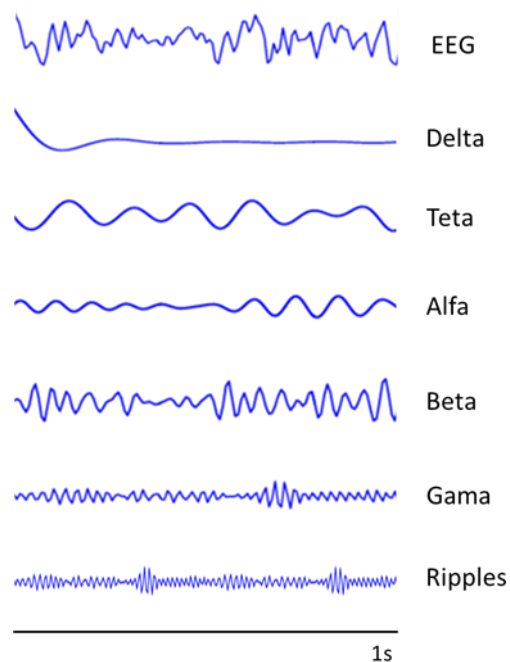


Figura 1: exemplo de decomposição do registro eletrofisiológico em diferentes bandas de frequência (modificado de ABDELAAL, 2018).

Cada banda de frequência está associada com funções cerebrais específicas, momentos do ciclo circadiano e a diferentes estruturas e redes neurais. Como por exemplo, as oscilações alfa, que foram primariamente descritas por Hans Berger em 1929, que podem ser registradas durante a vigília quando o paciente se encontra calmo e com os olhos fechados, ocorrendo principalmente no córtex occipital (BERGER, 1929). Ritmos mais rápidos, incluindo as oscilações gama e as HFO, estão envolvidos tanto em processos fisiológicos, como no processo de formação e consolidação da memória e cognição, quanto patológicos, sendo associadas a crises epiléticas (HERRMANN, 2005; TALLON-BAUDRY, 1999).

Os estudos *in vitro*, apesar das restrições em decorrência da perda de vias aferentes e eferentes, evidenciam que as preparações de fatias cerebrais podem gerar oscilações idênticas às oscilações *in vivo*, o que contribui para o estudo de regiões mais profundas do cérebro (BUZSÁKI, 2012). Uma das regiões subcorticais de grande importância é o tálamo, que forma uma extensa rede com o córtex, com vias corticotalâmicas e tálamocorticais. As oscilações geradas pelas conexões corticotalâmicas/tálamocorticais acontecem em dois estados diferentes: durante o período de sono ocorrem predominantemente as oscilações delta e os fusos do sono, já no estado de vigília, as oscilações que predominam são na faixa de gama (MCCORMICK, 1997; STERIADE, 1993).

1.3 ALTERAÇÕES DAS OSCILAÇÕES CEREBRAIS EM EPILEPSIAS

O padrão de atividade elétrica cerebral é essencial para a coordenação e funcionamento adequado das redes neurais e alterações nesse padrão estão relacionadas a diferentes patologias do sistema nervoso central, tal como as epilepsias.

As epilepsias são um grupo heterogêneo de transtornos neurológicos caracterizadas pela predisposição em gerar crises epiléticas recorrentes e espontâneas, que são em decorrência da atividade anormal, excessiva e hipersincrônica dos neurônios do cérebro (SCHEFFER *et al.*, 2017). Segundo a classificação mais recente elaborada pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE), as crises epiléticas são divididas em três grandes grupos, de acordo com o seu início: focal, generalizado ou desconhecido. O início é dito focal quando apenas uma região apresenta atividade neuronal anormal, com participação de circuitos limitados a um hemisfério; já o início é dito generalizado quando há um rápido envolvimento de várias redes neurais, distribuídas bilateralmente (FISHER *et al.*, 2017). As epilepsias também podem ser classificadas conforme a sua etiologia, englobando mutações genéticas, doenças infecciosas, desordens metabólicas, alterações estruturais como traumatismos e malformações, alterações no sistema imune e causas desconhecidas (SCHEFFER *et al.*, 2017).

O processo pelo qual a rede neuronal normalmente funcional tem sua atividade alterada é chamado de epileptogênese. Este é um processo contínuo e progressivo que leva a desbalanços de sinapses excitatórias e inibitórias e como consequência,

a geração de crises epiléticas espontâneas e recorrentes (CER) (epileptogênese primária) (PITKÄNEN *et al.*, 2015). As crises podem se tornar mais frequentes e severas, podendo envolver outras áreas cerebrais que gradualmente sofrerão alterações em suas conexões neuronais, levando a epileptogênese secundária (DALBY, 2001).

Os mecanismos por trás do surgimento das crises epiléticas ainda não estão totalmente elucidados, porém, alterações no padrão oscilatório cerebral identificados durante a epileptogênese possuem potencial como biomarcadores. Além disso, a análise quantitativa dos registros eletrofisiológicos, através de análises de potência, é um importante método para o entendimento das alterações oscilatórias vistas em pacientes e modelos animais. Essas alterações incluem o aparecimento das HFOs, no qual estão relacionadas com a zona epileptogênica e possui alto valor diagnóstico para crises epiléticas (JACOBS, 2020; ZIJLMANS *et al.*, 2012). Também, alterações no EEG com a presença de um padrão síncrono de ponta-onda (do inglês, *spike-wave discharges* - SWD) são características já estabelecidas das crises epiléticas de ausência, que são o reflexo da sincronização das oscilações da rede talamocortical (MEEREN *et al.*, 2002). Além disso, estudos indicam o envolvimento das redes talamocorticais durante as crises em pacientes com epilepsia do lobo temporal e em pacientes com epilepsia idiopática, sugerindo que a extensão da rede epileptogênica ao tálamo é um fator importante no prognóstico cirúrgico (BERNASCONI *et al.*, 2003; GUYE *et al.*, 2006).

1.4 MODELO ANIMAL DE MALFORMAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL POR CRIOLESÃO

O desenvolvimento de modelos animais a fim de mimetizar as MDC é necessário para avançar nos estudos dos mecanismos envolvidos na epileptogênese (CHEVASSUS-AU-LOUIS *et al.*, 1999; LEVENTER, 2008). Esses modelos geram malformações que se assemelham às MDC vistas em pacientes e estas podem ser induzidas experimentalmente de forma farmacológica, mecânica ou por manipulação genética (LUHMANN, H., 2016).

Dentre estes, destaca-se o modelo animal de criolesão em ratos desenvolvido por Dvofák e Feit em 1977 no qual consiste em induzir uma lesão no córtex cerebral de animais recém-nascidos (dia 0 ou 1 pós-natal) através do posicionamento de uma

sonda congelada no crânio, já que em roedores parte do desenvolvimento cortical se conclui após o nascimento (DVOFÁK; FEIT, 1977). Esta perturbação interfere no processo de desenvolvimento cortical, gerando um microgiro com somente 4 camadas corticais. Após 24 horas, há completa necrose tecidual com presença de astrócitos e macrófagos reativos. Três dias depois, se observa migração neuronal e crescimento de fibras gliais radiais para a região lesionada. A partir do quinto dia o microgiro começa a ficar evidente e a completa formação ocorre em média após 15 dias do insulto (ROSEN *et al.*, 1992).

A região paramicrogiral, adjacente ao microgiro, apresenta diversas modificações moleculares e funcionais, incluindo, desorganização das camadas corticais, projeções talamocorticais e corticotalâmicas reduzidas e conexões aferentes e eferentes anormais (JACOBS, 1999; ROSEN *et al.*, 2000). Também, a organização das projeções do córtex paramicrogiral para o hemisfério contralateral através do corpo caloso apresenta anormalidades, com uma distribuição laminar diferente da observada em animais controle, indicando interações aberrantes entre os hemisférios cerebrais (GIANNETTI *et al.*, 1999). Ainda, diversos estudos com registros eletrofisiológicos mostraram que a região paramicrogiral apresenta uma pronunciada hiperexcitabilidade devido a diversas modificações moleculares e estruturais, com alterações nos sistemas excitatórios e inibitórios (JACOBS, 1999; JACOBS *et al.*, 1996; LUHMANN *et al.*, 1998; LUHMANN, 1996).

Apesar desses animais apresentarem diversas alterações eletrofisiológicas e limiar reduzido para crises epiléticas, raramente são observadas CER (LUHMANN, 2016). No entanto, quando há um insulto adicional, como hiperemia, é possível verificar CER a partir da análise do EEG (SCANTLEBURY *et al.*, 2004).

1.5 MODELO ANIMAL DE DUPLO INSULTO: LESÃO CORTICAL POR CONGELAMENTO EM RATOS DA LINHAGEM WAR (WISTAR AUDIOGENIC RAT)

A partir do uso de modelos animais, os estudos buscam compreender o processo de epileptogênese que estão associados com as MDC. O uso de modelos animais já suscetíveis a crises epiléticas audiogênicas com associação de um insulto adicional, sendo essa a criolesão, auxilia o desenvolvimento da epileptogênese, favorecendo o estudo das MDC associadas as epilepsias.

A linhagem *Wistar Audiogenic Rat* (WAR) é um modelo animal geneticamente selecionado que possui susceptibilidade a crises epiléticas audiogênicas. Essa linhagem foi gerada no laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo e foi estabelecido a partir do acasalamento de ratos Wistar que apresentavam suscetibilidade inata a crises epiléticas quando expostos a estimulação sonora de alta intensidade, em torno de 120 dB e composto por sons de frequências entre 5000 e 20000 Hz. A colônia é mantida através do cruzamento endogâmico, apresentando um padrão genético consistente e com homogeneidade de fenótipo (DORETTO *et al.*, 2003; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996).

Em geral, os animais quando submetidos ao estímulo sonoro, apresentam crises do tipo tônico-clônicas generalizadas, exibindo diferentes comportamentos progressivos, que podem ser classificados segundo um índice de gravidade descrito por Garcia-Cairasco e colaboradores (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996). As crises audiogênicas têm início com a ativação de vias auditivas do tronco encefálico e abrangem estruturas como o colículo inferior e superior, formação reticular, substância nigra e substância cinzenta periaquedutal (GARCIA-CAIRASCO, 1993; ROSS, 2000; ROSSETTI *et al.*, 2006). Além disso, os animais WAR apresentam crises espontâneas, no entanto pouco percebidas (dados não publicados) e apresentam o envolvimento de estruturas límbicas, como o hipocampo e regiões talâmicas (CUNHA *et al.*, 2018; DERANSART *et al.*, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

Estima-se que 40% das epilepsias refratárias em crianças sejam atribuídas as MDCs e que 75% dos pacientes com alguma MDC apresentarão epilepsia (LEVENTER, 2008). Apesar de vários estudos terem enfoque nas alterações sinápticas nas malformações corticais, ainda há vários mecanismos pouco compreendidos, como os microcircuitos neoformados, fatores que podem aumentar a susceptibilidade às crises epiléticas, os mecanismos envolvidos na epileptogênese secundária e os preditores ictais. A avaliação quantitativa dos registros eletrofisiológicos *in vitro* em um modelo animal de duplo insulto com microgiria podem fornecer detalhes sobre a circuitaria envolvida na ictogênese e na epileptogênese secundária.

3 HIPÓTESE

A reorganização da rede neural induzida pela microgiria no córtex somatosensorial como um insulto adicional causa uma ruptura nos padrões de oscilações no circuito corticotalâmico durante o desenvolvimento, favorecendo o processo de epileptogênese primária e secundária.

4 OBJETIVO

Gerais

Avaliar as oscilações cerebrais interictais e a severidade da atividade epileptiforme *in vitro* no córtex somatosensorial e no tálamo - núcleo ventral pósteromedial em um modelo animal de duplo insulto WAR-MDC através de registros eletrofisiológicos extracelulares com indução da hiperexcitabilidade com 4-aminopiridina (4-AP) + 0 Mg²⁺ ao longo do desenvolvimento para determinar se existe um aumento na epileptogênese primária e secundária.

Específicos

Avaliar o perfil da excitabilidade no modelo de duplo insulto ao longo dos períodos de adolescência e adulto jovem através da:

- 1) Identificação e quantificação das atividades ictal e interictal em fatias corticotalâmicas;
- 2) Avaliação quantitativa da potência das oscilações dos potenciais de campo locais corticais e talâmicos;
- 3) Correlacionar o perfil da excitabilidade no modelo de duplo insulto com a de epileptogênese primária e secundária ao longo do desenvolvimento;

5 METODOLOGIA

5.1 ANIMAIS

O manuseio e todos os procedimentos dos animais experimentais, incluindo procedimento de eutanásia, foram realizados estritamente de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

(SBCAL), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), da International Brain Research Organization (IBRO), do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) e da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA) , com aprovação obtida em julho/2019, número 37310.

Os animais Wistar e WAR foram obtidos da criação do Biotério do Departamento de Bioquímica – UFRGS. A colônia dos animais WAR do departamento de bioquímica - UFRGS foi derivada de animais provenientes do Biotério Especial de criação desta linhagem localizado no Campus da USP em Ribeirão Preto (ninhada nº 1065, fêmea nº 8563 e macho nº 8565).

Os animais foram mantidos em salas com temperatura regulada em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com um ciclo de claro/escuro de 12 horas controlado por fotoperíodo (luzes acesas às 7h00min; luzes apagadas às 19h00min), com água e alimentação (ração comercial) ad libitum.

5.2 INDUÇÃO DA CRIOLESÃO

A criolesão (FL - do inglês, *freeze-lesion*) foi realizada em machos e fêmeas neonatos (Wistar-FL e WAR-FL) entre P0 e P1 devido a fase de desenvolvimento cortical cerebral. Para isso, os animais foram anestesiados pelo método de hipotermia, já que estes animais são poiquilotérmicos até a terceira semana de vida, ou seja, a temperatura corporal e a taxa metabólica dependem da temperatura do ambiente, e a termorregulação não está desenvolvida até a terceira semana de vida (DANNEMAN, 1997). Para a realização da criolesão, os filhotes foram removidos da caixa-moradia e levados dentro de uma caixa contendo maravalha do ninho a uma sala específica para realização de procedimentos.

Para induzir a hipotermia, os filhotes foram colocados no interior de um copo de Becker submerso em isopor com gelo até a completa perda dos reflexos de extensão das patas sob pressão. Posteriormente foi realizado uma incisão na linha média sagital do escalpo dos animais para afastar a pele do dorso do crânio. Uma sonda metálica congelada em nitrogênio líquido foi colocada em contato com o hemisfério direito do crânio do filhote durante 20 segundos e após a sutura da pele foi feita com cola instantânea universal (*Super Bonder - Loctite*) (Figura 2 omitida). Os animais ficaram em uma placa aquecedora até completa recuperação e então, devolvidos a caixa-moradia com a mãe. Os animais *sham* (Wistar-Sham e WAR-

Sham) passaram pelo mesmo protocolo experimental, porém, a sonda metálica foi mantida em temperatura ambiente (DVOFÁK; FEIT, 1977).

5.3 ELETROFISIOLOGIA *IN VITRO*

Os experimentos de eletrofisiologia *in vitro* para registro extracelular foram realizados nos diferentes grupos (Wistar-Sham, Wistar-FL, WAR-Sham e WAR-FL), nos hemisférios direito e esquerdo e em dois tempos distintos: P20 a P25 (idade 1= ID1; Wistar-Sham: n=6, Wistar-FL: n=5, WAR-Sham: n=6, WAR-FL: n=6) e P35 a P45 (idade 2= ID2; Wistar-Sham: n=6, Wistar-FL: n=7, WAR-Sham: n=8, WAR-FL: n=5) (Figura 3).

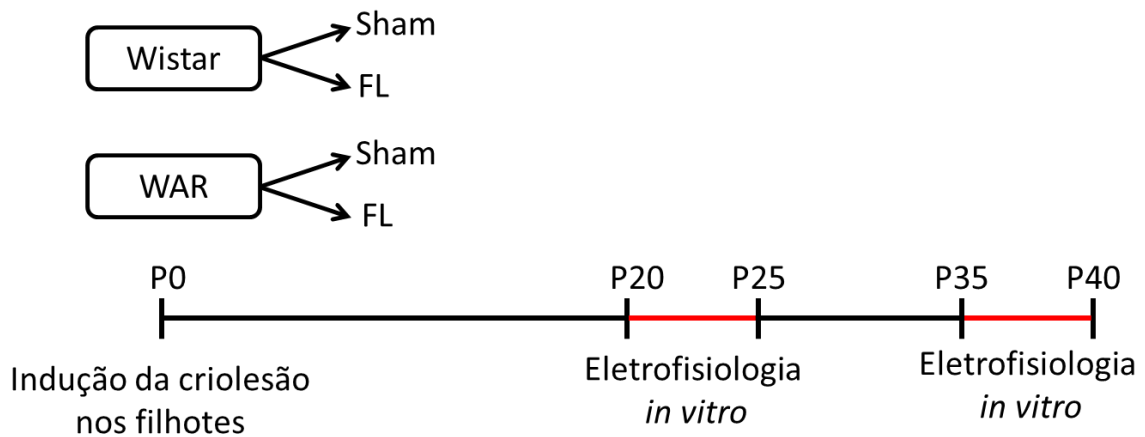


Figura 3 - Linha do tempo experimental

5.3.1 Preparo das fatias cerebrais

Os animais foram anestesiados com isoflurano e a eutanásia foi realizada por decapitação com guilhotina, o cérebro de cada animal foi removido rapidamente e colocado em uma solução de líquido cefalorraquidiano artificial de corte (LCRAc) composto por: 220 mM de sacarose, 3 mM de KCl, 1,25 mM de NaH_2PO_4 , 2 mM de MgSO_4 , 26 mM de NaHCO_3 e 10 mM de dextrose (295-305 mOsm) - oxigenado (95% O_2 - 5% CO_2) a uma temperatura de 4°C. Os hemisférios direito e esquerdo foram separados e logo em seguida, para a realização do corte das fatias cerebrais, cada hemisfério foi fixado com cola instantânea universal (*Super Bonder – Loctite*) em uma plataforma feita de 4% de agarose com angulação de 55° (Figura 4 omitida) (AGMON, 1991). A plataforma foi inserida no equipamento vibratório (VTS-1000, Leica, Alemanha) e foi realizado o corte das fatias com espessura de 500 μm . Logo após o corte, as fatias foram imediatamente transferidas para um recipiente contendo solução de líquido cefalorraquidiano artificial de registro (LCRAr) oxigenado (95% O_2 - 5% CO_2), composto por: 124 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1,25 mM de NaH_2PO_4 , 2 mM de MgSO_4 , 26 mM de NaHCO_3 , 2 mM de CaCl_2 e 10 mM de dextrose (295-305 mOsm). Os cortes permaneceram durante 45 minutos a uma temperatura de 37°C e 1 hora em temperatura ambiente para serem registrados posteriormente.

5.3.2 Registros eletrofisiológicos extracelulares *in vitro*

Foram realizados os registros de potencial de campo em fatias de ambos os hemisférios cerebrais para cada animal. Para isso, cada fatia foi transferida individualmente para uma câmara de submersão com fluxo contínuo de LCRAr oxigenado (95% O₂ - 5% CO₂). As micropipetas para registro extracelular (borossilicato-1,5 mm DI) foram preenchidas com solução de NaCl 2M. As regiões do tálamo - núcleo ventral pósteromedial (VPM) e camada 4 do córtex somatossensorial (Figura 5 omitida) foram identificadas por meio de um microscópio e a partir da identificação, os eletrodos foram colocados em ambas as regiões para registro eletrofisiológico extracelular simultâneo. O eletrodo de registro colocado no córtex somatossensorial do hemisfério direito ficou aproximadamente 2,5 mm afastado da microgiria. Nos animais Sham, o eletrodo foi posicionado no mesmo local. Além disso, para análises posteriores, foi realizado o registro eletrofisiológico do córtex próximo da microgiria juntamente com o registro do córtex afastado da microgiria (estes dados não serão abordados neste trabalho e estão em andamento).

O registro basal com líquido LCRAr oxigenado (95% O₂ - 5% CO₂) foi feito durante 10 minutos. Posteriormente, a fim de aumentar a excitabilidade neuronal, cada fatia foi perfundida com uma solução de LCRAr modificada com 0 Mg²⁺ e adição de 4-aminopiridina (4-AP; 100µM) (SERAFINI, 2016) e após em média 25 min de perfusão, houve o surgimento de atividade epileptiforme e então foi realizado o registro eletrofisiológico durante 1 hora (124 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1,25 mM de NaH₂PO₄, 26 mM de NaHCO₃, 4 mM de CaCl₂ e 10 mM de dextrose - 295-305 mOsm).

O potencial de campo foi registrado usando um sistema de aquisição de sinais (Multiclamp 700B, Digidata 1440 e o software pClamp 10.3 - Molecular Devices) com taxa de amostragem de 10 kHz, filtro passa-alta 0,5 Hz e filtro passa-baixa 2 kHz.

A análise das atividades epileptiformes interictais e ictais foram feitas através do software Clampfit 10.3 (Molecular Devices). Para a análise da frequência da atividade interictal foram selecionados 3 trechos do registro eletrofisiológico com 100 segundos cada. Os eventos interictais foram contados manualmente e após foi realizada a média dos eventos para os 3 trechos selecionados. A análise dos

eventos ictais foi realizada contando manualmente os eventos no período de uma hora de registro eletrofisiológico. Posteriormente, também foi determinada a duração de cada evento ictal.

A análise do PSD dos registros extracelulares foi realizada através de rotinas customizadas no programa *Matlab* (MathWorks, MA). As frequências das oscilações nos períodos a serem analisados foram separadas em: delta (1-4 Hz), teta (4-12 Hz), beta (12-25Hz), gama lento (do inglês, *slow gamma*, SG - 30-50 Hz), gama médio (do inglês, *middle gamma*, MG - 70-90 Hz), gama rápido (do inglês, *fast gamma*, FG - 90-150 Hz), *ripples* (150-250 Hz) e *fast ripples* (250-400 Hz). Foram selecionados 20 trechos com 5 segundos cada nos registros basais e nos registros durante a perfusão com LCRAr - 0 Mg²⁺ + 4-AP (100µM) (trechos selecionados entre os eventos interictais). Os dados obtidos do PSD foram transformados para unidade decibel (dB) e em seguida, a fim de verificar somente os efeitos de 4-AP + LCRAr 0 Mg²⁺ foi feita uma relação, dividindo o PSD dos trechos registrados de cada faixa de oscilação durante a perfusão das fatias com LCRAr - 0 Mg²⁺ +4-AP (100µM) e o PSD dos trechos registrados de cada faixa de oscilação durante o período basal.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido a estrutura experimental de repetição de medidas, foi utilizado modelos de equações de estimatórias generalizadas (GEE). Para a frequência ictal utilizou-se distribuição de Poisson com função de ligação logarítmica. Para a duração dos eventos ictais, devido a assimetria observada nos dados, utilizou-se distribuição Gama com função de ligação logarítmica. Para todas as demais variáveis foi considerado distribuição normal com função de ligação identidade. Os modelos tinham os fatores de interesse como preditores (grupo, procedimento, idade e hemisfério e suas interações) mais o termo de sexo do animal, que foi considerado

apenas para ajuste, sem interações com outros fatores. Os modelos foram ajustados através do pacote geepack do software R. As comparações de interesse foram realizadas através de contrastes estimados pelo pacote emmeans, adotando-se a correção de Bonferroni para compensar as múltiplas comparações. O nível de significância foi convencionado como $p < 0,05$. Todos os dados estão apresentados como média com limites inferior e superior e todos os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 8.

6 RESULTADOS

7 DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho envolvem mudanças no padrão de atividade epileptiforme e nas oscilações cerebrais *in vitro* durante o período da adolescência e o início da idade adulta no modelo animal de duplo insulto e nos animais WAR.

Quanto às alterações no padrão de atividade epileptiforme, observamos que os animais WAR com ou sem microgiria e Wistar com microgiria apresentaram uma menor frequência de atividade epileptiforme interictal no hemisfério contralateral no período da adolescência (P20-25); os animais com microgiria apresentaram maior atividade ictal no hemisfério ipsilateral neste período da adolescência; e a atividade epileptiforme interictal diminuiu com a idade em ambos os hemisférios dos animais WAR com ou sem microgiria.

Nas preparações de fatias cerebrais é necessário induzir farmacologicamente um aumento da excitabilidade para gerar atividade epileptiforme. O fármaco 4-AP é conhecido por induzir atividade epileptiforme por várias horas em fatias *cerebrais in vitro* (AVOLI, 2016; AVOLI, 1987; MATTIA, 1993; PERREAULT, 1992). Para investigar as alterações da excitabilidade com mais detalhes no modelo de duplo-insulto *in vitro*, a associação de 4-AP + 0 Mg²⁺ promove uma atividade epileptiforme estável, permitindo o estudo das características da atividade epileptiforme (RAGOT *et al.*, 2021).

O uso de 4-AP + 0 Mg²⁺ levou a uma diminuição da frequência da atividade epileptiforme interictal nas fatias do hemisfério contralateral de animais WAR com e sem microgiria e Wistar com microgiria no período da adolescência (P20-25). Entretanto os eventos ictais, nas fatias dos animais WAR e Wistar com microgiria, aumentaram em número no hemisfério com microgiria quando comparado com o hemisfério contralateral no período da adolescência. Alguns estudos demonstram que a região paramicrogiral apresenta uma hiperexcitabilidade mediante estimulação elétrica local (BELL, 2014; JACOBS, 1996; LUHMANN, 1996), e alguns possíveis mecanismos incluem um desequilíbrio local na densidade ou função dos receptores GABAérgicos e receptores glutamatérgicos, conexões sinápticas aberrantes ao

redor do microgiro e aumento das aferências excitatórias para a região paramicrogiral (ANDRESEN *et al.*, 2014; CAMPBELL; HABLITZ, 2008; DEFAZIO; HABLITZ, 2000; HAGEMANN *et al.*, 2003; LUHMANN, 1998; REDECKER *et al.*, 2000). Em um estudo recente, a utilização somente de 4-AP para induzir atividade epileptiforme em fatias de animais Wistar com microgíria não foi capaz de causar alterações nos parâmetros de duração e frequência interictal quando comparado com as fatias controle (RAGOT *et al.*, 2021). Apesar dos animais com microgíria apresentarem uma hiperexcitabilidade paramicrogiral, o aumento da susceptibilidade a atividade epileptiforme requer outros fatores além das mudanças na excitabilidade regional. Alguns estudos já demonstraram, por exemplo, uma hiper-regulação dos transportadores NKCC1 (que transporta cloreto para dentro da célula) e uma hiporregulação dos transportadores KCC2 (que transporta cloreto para fora da célula) na região paramicrogiral em modelos animais de microgíria e em pacientes com MDC, indicando distúrbios na homeostase do cloreto intracelular (FUKUDA, 2013; SHIMIZU-OKABE *et al.*, 2007). A isoforma 1 do cotransportador Na-K-2Cl (NKCC1) e a isoforma 2 do cotransportador K-Cl (KCC2) são os dois principais cotransportadores de cátions-cloreto que tem sido implicados na epilepsia (LIU *et al.*, 2019). O rompimento no equilíbrio entre NKCC1 e KCC2 induzido por diferentes causas pode resultar na inibição ineficaz da rede neuronal pelos neurônios GABAérgicos (MOORE *et al.*, 2017). Durante a aplicação de 4-AP, a ictogênese *in vitro* no córtex entorrinal pode ser abolida pela inibição dos transportadores KCC2 (CHEN, 2019; HAMIDI, 2015). Além disso, a 4-AP possivelmente também induz mudanças na homeostase do cloreto intracelular devido a contribuição dos receptores de GABA_A na geração dos eventos epileptiformes através da geração dos potenciais despolarizantes (AVOLI *et al.*, 1996; GONZÁLEZ *et al.*, 2018; LÉVESQUE *et al.*, 2016; LILLIS *et al.*, 2012; UVA *et al.*, 2015).

As fatias cerebrais dos animais adultos jovens (P35-45) apresentam diminuição da frequência interictal e do número de eventos ictais em ambos os hemisférios principalmente nos animais WAR com ou sem microgíria quando comparado com os animais adolescentes (P20-25).

O cérebro imaturo é mais suscetível a crises epilépticas do que o cérebro maduro e a incidência de crises epilépticas é maior na primeira década de vida em humanos (HOLMES, 2005). Este fato também é observado em modelos experimentais, com animais jovens apresentando um limiar mais baixo para crise do

que animais adultos (HOLMES, 2005). Isso poderia explicar por que os animais no início da adolescência tiveram mais atividade ictal que os adultos jovens. Uma série de estudos em modelos de MDC sugerem que o insulto provocado pode atrasar a maturação do cérebro, incluindo um aumento da resposta da forma imatura dos receptores GABA_A e NMDA (BANDYOPADHYAY; HABLITZ, 2006; DEFAZIO; HABLITZ, 2000). Além disso, evidências demonstram que o atraso no desenvolvimento normal do cérebro devido a insultos e o atraso na transição de expressão dos transportadores NKCC1 para KCC2, promove um estado celular imaturo no qual a transmissão GABAérgica permanece excitatória por um período mais longo (SHIMIZU-OKABE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2014).

Quanto aos padrões de oscilações, observamos que no período da adolescência, os animais WAR com microgiria adolescentes (P20-25) apresentaram menor potência de oscilações delta, beta e *middle gamma* corticais no hemisfério direito (ipsilateral a lesão) quando comparado com o hemisfério contralateral.

Já descrito na literatura, animais com microgiria apresentam perda das aferências talamocorticais e diminuição no tamanho das células nos núcleos talâmicos (HERMAN *et al.*, 1997; JACOBS, 1999). Em um estudo *in vivo*, foi demonstrado que uma lesão completa ou parcial das vias talamocorticais promove a redução das oscilações de baixa e alta frequência no córtex (LEMIEUX *et al.*, 2014). Também, um estudo com um modelo animal de epilepsia de ausência, lesões no tálamo com destruição das vias talamocorticais foram capazes de abolir as ondas de 7-11 Hz registradas no córtex (SWD – do inglês, spike-wave discharges) (MEEREN *et al.*, 2009). Além disso, um estudo *in vitro* mostrou que fatias de animais com microgiria apresentaram redução da amplitude das respostas de potencial de campo evocado na área lateral a lesão comparado com o hemisfério contralateral. Este estudo também demonstrou uma redução do metabolismo da glicose, mensurado com [¹⁴C]-deoxiglicose, indicando uma atividade sináptica reduzida na região lateral ao microgiro (KRAEMER *et al.*, 2001).

Em relação as diferenças entre hemisférios, assimetrias hemisféricas na hiperexcitabilidade cortical já foram demonstradas em modelos animais e em pacientes com epilepsia (BLUME, 1998; MYSLOBODSKY, 1979). Em modelos

experimentais, animais com crises audiogênicas que foram submetidos a *kindling* moderado apresentam diferenças inter-hemisféricas na propensão a epileptogênese, com diferenças nas respostas eletrofisiológicas corticais, possivelmente por diferenças na propagação da crise audiogênica entre os hemisférios (VINOGRADOVA, 2012; VINOGRADOVA, 2010).

No córtex somatossensorial, os animais WAR com microgiria adultos jovens (modelo de duplo insulto) (P35-45) apresentam maior potência das oscilações delta no hemisfério ipsilateral ao microgiro e das oscilações teta e beta no hemisfério contralateral ao microgiro quando comparado ao grupo controle. Já no tálamo, houve aumento da potência das oscilações MG no hemisfério ipsilateral ao microgiro nas fatias cerebriais dos animais do modelo de duplo insulto adulto jovens e aumento da potência das oscilações SG, MG, FG, ripples e fast ripples no hemisfério direito dos animais WAR ao decorrer da idade (comparado com o grupo na idade adolescente).

Nos circuitos neurais maduros, os mecanismos da geração das oscilações gama envolvem interações sinápticas entre neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos, além de junções comunicantes (QUILICHINI *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2015). Porém, as oscilações gama, *ripples* e *fast ripples* podem surgir em condições epileptogênicas, sinalizando um estado patológico e podem ser um potencial biomarcador de redes neuronais patológicas (QUILICHINI *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2015). O aumento da potência das oscilações de alta frequência durante o desenvolvimento pode ser um preditor da formação das redes neurais patológicas (FEDELE *et al.*, 2017; JACOBS, 2020).

Além disso, a potência das oscilações lentas no tálamo aumentou com a idade de forma geral nos grupos. Já a potência das oscilações de alta frequência talâmicas aumentou com a idade somente nos animais WAR e WAR-FL.

Estudos recentes sugerem que a perda da inibição *feed-forward* no circuito corticotalâmico podem ser epileptogênicos (PAZ, 2015). Além disso, lesões corticais promovem o início de processos de morte celular cortical e degeneração de axônios corticotalâmicos/talamocorticais. Após lesões no córtex, como por exemplo acidente vascular cerebral (AVC), as consequências são vistas a longo prazo, e dependem da localização e do tamanho da lesão e da capacidade do cérebro de compensar e reorganizar as funções perdidas, e as vezes, levando a epilepsia pós-traumática envolvendo o tálamo (PAZ *et al.*, 2010). Por exemplo, um modelo animal de AVC

cortical desenvolve epilepsia ao longo do tempo (PAZ *et al.*, 2013). Além disso, após acidentes vasculares cerebrais isquêmicos, é observado uma extensa perturbação nos ritmos cerebrais, com diminuição das oscilações de alta frequência e evoluindo para diminuição de todas as faixas as frequências (FOREMAN, 2012; MÜLLER *et al.*, 2021).

O cérebro imaturo difere do cérebro maduro nos mecanismos básicos de epileptogênese, propagação de crises e nas características do EEG (HOLMES, 1997) e a avaliação quantitativa dos registros eletrofisiológicos *in vitro* em um modelo animal de duplo insulto com microgiria durante o desenvolvimento é importante para entender a dinâmica das oscilações geradas pelo córtex somatossensorial e pelo tálamo e a relação com a epileptogênese.

8 CONCLUSÃO

Nossos achados principais mostram mudanças no padrão de atividade epileptiforme e nas oscilações cerebrais *in vitro* durante o período da adolescência e o início da idade adulta no modelo animal de duplo insulto e nos animais WAR. Apesar da diminuição da atividade epileptiforme *in vitro* no modelo animal de duplo-insulto ser semelhante aos demais animais, o aumento detectado da potência das oscilações de alta frequência talâmicas ao decorrer do desenvolvimento pode ser um indicador de reorganização patológica de rede neuronal que contribuir para a hiperexcitabilidade. Estes achados sugerem que o modelo do duplo insulto pode ser muito útil para estudo da dinâmica das oscilações cerebrais, da susceptibilidade à atividade epileptiforme e dos mecanismos de epileptogênese durante o desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ABDELAAL, M. A.; ALSAWY, A. A.; HEFNY, H. A. EEG-based emotion recognition using a wrapper-based feature selection method. **Advances in Intelligent Systems and Computing**, [s. l.], vol. 639, p. 247–256, 2018.
- AGMON, A.; CONNORS, B. W. Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. **Neuroscience**, [s. l.], vol. 41, no. 2–3, p. 365–379, 1991.
- AL-FAHOUM, A. S.; AL-FRAIHAT, A. A. Methods of EEG Signal Features Extraction Using Linear Analysis in Frequency and Time-Frequency Domains. **ISRN Neuroscience**, [s. l.], vol. 2014, p. 1–7, 2014.
- ANDRESEN, L. *et al.* Gabapentin attenuates hyperexcitability in the freeze-lesion model of developmental cortical malformation. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], vol. 71, no. 1, p. 305–316, 2014.
- AVOLI, M. *et al.* Extracellular free potassium and calcium during synchronous activity induced by 4-aminopyridine in the juvenile rat hippocampus. **Journal of Physiology**, [s. l.], vol. 493, no. 3, p. 707–717, 1996.
- AVOLI, M.; JEFFERYS, J. G. R. Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], vol. 260, p. 26–32, 2016.
- AVOLI, M.; PERREAULT, P. A GABAergic depolarizing potential in the hippocampus disclosed by the convulsant 4-aminopyridine. **Brain Research**, [s. l.], vol. 400, no. 1, p. 191–195, 1987.
- BANDYOPADHYAY, S.; HABLITZ, J. J. NR2B antagonists restrict spatiotemporal spread of activity in a rat model of cortical dysplasia. **Epilepsy Research**, [s. l.], vol. 72, no. 2–3, p. 127–139, 2006.
- BARKOVICH, A. J. *et al.* A classification scheme for malformations of cortical development. **Neuropediatrics**, [s. l.], vol. 27, no. 2, p. 59–63, 1996.
- BARKOVICH, A. James *et al.* A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. **Brain**, [s. l.], vol. 135, no. 5, p. 1348–1369, 2012.
- BARKOVICH, A. James. Current concepts of polymicrogyria. **Neuroradiology**, [s. l.], vol. 52, no. 6, p. 479–487, 2010.
- BELL, A.; JACOBS, K. M. Early susceptibility for epileptiform activity in malformed cortex. **Epilepsy Research**, [s. l.], vol. 108, no. 2, p. 241–250, 2014.
- BERGER, H. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. **Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten**, [s. l.], vol. 87, no. 1, p. 527–570, 1929.
- BERNASCONI, A. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy and imaging of the thalamus in idiopathic generalized epilepsy. **Brain**, [s. l.], vol. 126, no. 11, p. 2447–2454, 2003.
- BLUME, W. T. Hemispheric epilepsy. **Brain**, [s. l.], vol. 121, no. 10, p. 1937–1949, 1998.
- BUZSÁKI, G. **Rhythms of the Brain**. [S. l.]: Oxford University Press, 2006.
- BUZSÁKI, G.; ANASTASSIOU, C. A.; KOCH, C. The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], vol. 13, no. 6, p. 407–420, 2012.
- BUZSÁKI, G.; DRAGUHN, A. Neuronal oscillations in cortical networks. **Science**, [s. l.], vol. 304, no. 5679, p. 1926–1929, 2004.
- CAMPBELL, S. L.; HABLITZ, J. J. Decreased glutamate transport enhances excitability in a rat model of cortical dysplasia. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], vol. 32, no. 2, p. 254–261, 2008.

- CHEN, L. Y.; LÉVESQUE, M.; AVOLI, M. KCC2 antagonism increases neuronal network excitability but disrupts ictogenesis in vitro. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], vol. 122, no. 3, p. 1163–1173, 2019.
- CHEVASSUS-AU-LOUIS, N. *et al.* Cortical malformations and epilepsy: New insights from animal models. **Epilepsia**, [s. l.], vol. 40, no. 7, p. 811–821, 1999.
- CUNHA, A. O. S. *et al.* Intrinsic and synaptic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain, a genetic model of epilepsy. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 8, no. 1, p. 1–11, 2018.
- DALBY, N. O.; MODY, I. The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. **Current opinion in neurology**, [s. l.], vol. 14, no. 2, p. 187–192, 2001.
- DANNEMAN, P. J.; MANDRELL, T. D. Evaluation of Five Agents/Methods for Anesthesia of Neonatal Rats. **Laboratory Animal Science**, [s. l.], vol. 47, no. 4, p. 386–395, 1997.
- DEFAZIO, R. A.; HABLITZ, J. J. Alterations in NMDA receptors in a rat model of cortical dysplasia. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], vol. 83, no. 1, p. 315–321, 2000.
- DERANSART, C. *et al.* Inhibition of the substantia nigra suppresses absences and clonic seizures in audiogenic rats, but not tonic seizures: Evidence for seizure specificity of the nigral control. **Neuroscience**, [s. l.], vol. 105, no. 1, p. 203–211, 2001.
- DORETTO, M. C. *et al.* Quantitative study of the response to genetic selection of the wistar audiogenic rat strain (WAR). **Behavior Genetics**, [s. l.], vol. 33, no. 1, p. 33–42, 2003.
- DVOFÁK, K.; FEIT, J. Migration of neuroblasts through partial necrosis of the cerebral cortex in newborn rats-contribution to the problems of morphological development and developmental period of cerebral microgyria - Histological and autoradiographical study. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], vol. 38, no. 3, p. 203–212, 1977.
- FEDELE, T. *et al.* Resection of high frequency oscillations predicts seizure outcome in the individual patient. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 7, no. 1, p. 1–10, 2017.
- FISHER, R. S. *et al.* Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, [s. l.], vol. 58, no. 4, p. 522–530, 2017.
- FOREMAN, B.; CLAASSEN, J. Quantitative EEG for the detection of brain ischemia. **Critical Care**, [s. l.], vol. 16, no. 2, p. 216, 2012.
- FUKUDA, A.; WANG, T. A perturbation of multimodal GABA functions underlying the formation of focal cortical malformations: Assessments by using animal models. **Neuropathology**, [s. l.], vol. 33, no. 4, p. 480–486, 2013.
- GARCIA-CAIRASCO, N. *et al.* Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, [s. l.], vol. 26, no. 1, p. 177–192, 1996.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V. C.; DORETTO, M. C. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], vol. 58, no. 1–2, p. 57–67, 1993.
- GIANNETTI, S. *et al.* Organization of callosal connections in rats with experimentally induced microgyria. **Child's Nervous System**, [s. l.], vol. 15, no. 9, p. 444–448, 1999.
- GONZÁLEZ, O. C. *et al.* Role of KCC2-dependent potassium efflux in 4-Aminopyridine-induced Epileptiform synchronization. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], vol. 109, no. Pt A, p. 137–147, 2018.

- GUYE, M. *et al.* The role of corticothalamic coupling in human temporal lobe epilepsy. **Brain**, [s. l.], vol. 129, no. 7, p. 1917–1928, 2006.
- HAGEMANN, G. *et al.* Distribution of glutamate receptor subunits in experimentally induced cortical malformations. **Neuroscience**, [s. l.], vol. 117, no. 4, p. 991–1002, 2003.
- HAMIDI, S.; AVOLI, M. KCC2 function modulates in vitro ictogenesis. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], vol. 79, p. 51–58, 2015.
- HAYASHI, N.; TSUTSUMI, Y.; BARKOVICH, A. J. Morphological features and associated anomalies of schizencephaly in the clinical population: Detailed analysis of MR images. **Neuroradiology**, [s. l.], vol. 44, no. 5, p. 418–427, 2002.
- HERMAN, A. E. *et al.* Cerebral microgyria, thalamic cell size and auditory temporal processing in male and female rats. **Cerebral Cortex**, [s. l.], vol. 7, no. 5, p. 453–464, 1997.
- HERRMANN, C. S.; DEMIRALP, T. Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders. **Clinical Neurophysiology**, [s. l.], vol. 116, no. 12, p. 2719–2733, 2005.
- HOLMES, G. L. Effects of seizures on brain development: Lessons from the laboratory. **Pediatric Neurology**, [s. l.], vol. 33, no. 1, p. 1–11, 2005.
- HOLMES, G. L. Epilepsy in the developing brain: Lessons from the laboratory and clinic. **Epilepsia**, [s. l.], vol. 38, no. 1, p. 12–30, 1997.
- IFFLAND, P. H.; CRINO, P. B. Focal Cortical Dysplasia: Gene Mutations, Cell Signaling, and Therapeutic Implications. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], vol. 12, p. 547–571, 2017.
- JACOBS, J.; ZIJLMANS, M. HFO to Measure Seizure Propensity and Improve Prognostication in Patients With Epilepsy. **Epilepsy Currents**, [s. l.], vol. 20, no. 6, p. 338–347, 2020.
- JACOBS, K. M.; KHARAZIA, V. N.; PRINCE, D. A. Mechanisms underlying epileptogenesis in cortical malformations. **Epilepsy Research**, [s. l.], vol. 36, no. 2–3, p. 165–188, 1999.
- JACOBS, Kimberle M.; GUTNICK, M. J.; PRINCE, D. A. Hyperexcitability in a model of cortical maldevelopment. **Cerebral Cortex**, [s. l.], vol. 6, no. 3, p. 514–523, 1996.
- JANSEN, L. A. *et al.* PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. **Brain**, [s. l.], vol. 138, no. 6, p. 1613–1628, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1093/brain/awv045>. Accessed at: 29 Sep. 2021.
- KANEKAR, S.; GENT, M. Malformations of cortical development. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, [s. l.], vol. 32, no. 3, p. 211–227, 2011.
- KRAEMER, M. *et al.* Metabolic and electrophysiological alterations in an animal model of neocortical neuronal migration disorder. **NeuroReport**, [s. l.], vol. 12, no. 9, p. 2001–2006, 2001.
- KUZNIECKY, R. *et al.* The epileptic spectrum in the congenital bilateral perisylvian syndrome. **Neurology**, [s. l.], vol. 44, no. 3, p. 379–385, 1994.
- KUZNIECKY, R. I. MRI in cerebral developmental malformations and epilepsy. **Magnetic resonance imaging**, [s. l.], vol. 13, no. 8, p. 1137–1145, 1995.
- LEMIEUX, M. *et al.* The impact of cortical deafferentation on the neocortical slow oscillation. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 34, no. 16, p. 5689–5703, 2014.
- LEVENTER, R. J. *et al.* Clinical and imaging features of cortical malformations in childhood. **Neurology**, [s. l.], vol. 53, no. 4, p. 715–722, 1999.

- LEVENTER, Richard J; GUERRINI, R.; DOBYNS, W. B. **Malformations of cortical development and epilepsy**. [S. l.: s. n.], 2008.
- LÉVESQUE, M. *et al.* Interneurons spark seizure-like activity in the entorhinal cortex. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], vol. 87, p. 91–101, 2016.
- LILLIS, K. P. *et al.* Pyramidal cells accumulate chloride at seizure onset. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], vol. 47, no. 3, p. 358–366, 2012.
- LIU, R. *et al.* Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], vol. 10, p. 1407, 2019.
- LUHMANN, H. Models of cortical malformation— Chemical and physical. **J Neurosci Meth**, [s. l.], vol. 260, p. 62–72, 2016.
- LUHMANN, H. J. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: Extracellular in vitro recordings. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 10, no. 10, p. 3085–3094, 1998.
- LUHMANN, H. J. *et al.* Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures. II. Intracellular in vitro recordings. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], vol. 80, no. 1, p. 92–102, 1998.
- LUHMANN, H. J.; RAABE, K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: I. Expression of epileptiform activity in an animal model. **Epilepsy Research**, [s. l.], vol. 26, no. 1, p. 67–74, 1996.
- MAILLARD, L.; RAMANTANI, G. Epilepsy surgery for polymicrogyria: a challenge to be undertaken. **Epileptic Disorders**, [s. l.], vol. 20, no. 5, p. 319–338, 2018.
- MATTIA, D.; HWA, G. G. C.; AVOLI, M. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in guinea-pig and rat neocortices. **Neuroscience Letters**, [s. l.], vol. 154, no. 1–2, p. 157–160, 1993.
- MCCORMICK, D. A.; BAL, T. Sleep and arousal: Thalamocortical mechanisms. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], vol. 20, p. 185–215, 1997.
- MEEREN, H. K. M. *et al.* Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 22, no. 4, p. 1480–1495, 2002.
- MEEREN, H. K. M. *et al.* Thalamic lesions in a genetic rat model of absence epilepsy: Dissociation between spike-wave discharges and sleep spindles. **Experimental Neurology**, [s. l.], vol. 217, no. 1, p. 25–37, 2009.
- MOORE, Y. E. *et al.* Seizing Control of KCC2: A New Therapeutic Target for Epilepsy. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], vol. 40, no. 9, p. 555–571, 2017.
- MÜLLER, G. C. *et al.* Effects of intranasal guanosine administration on brain function in a rat model of ischemic stroke. **Purinergic Signalling**, [s. l.], vol. 17, no. 2, p. 255–271, 2021.
- MYSLOBODSKY, M.; ROSEN, J. Hemispheric Asymmetry of Pentamethylenetetrazol-Induced Wave-Spike Discharges and Motor Imbalance in Rats. **Epilepsia**, [s. l.], vol. 20, no. 4, p. 377–386, 1979.
- PANG, T.; ATEFY, R.; SHEEN, V. Malformations of cortical development. **Neurologist**, [s. l.], vol. 14, no. 3, p. 181–191, 2008.
- PAZ, J. T. *et al.* Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. **Nature Neuroscience**, [s. l.], vol. 16, no. 1, p. 64–70, 2013.

- PAZ, J. T. *et al.* Focal cortical infarcts alter intrinsic excitability and synaptic excitation in the reticular thalamic nucleus. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 30, no. 15, p. 5465–5479, 2010.
- PAZ, J. T.; HUGUENARD, J. R. Microcircuits and their interactions in epilepsy: Is the focus out of focus? **Nature Neuroscience**, [s. l.], vol. 18, no. 3, p. 351–359, 2015.
- PERREAULT, P.; AVOLI, M. 4-Aminopyridine-induced epileptiform activity and a GABA-mediated long-lasting depolarization in the rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 12, no. 1, p. 104–115, 1992.
- PITKÄNEN, A. *et al.* Epileptogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], vol. 5, no. 10, 2015.
- QUILICHINI, P. P. *et al.* Hub GABA Neurons Mediate Gamma-Frequency Oscillations at Ictal-like Event Onset in the Immature Hippocampus. **Neuron**, [s. l.], vol. 74, no. 1, p. 57–64, 2012.
- RAGOT, A. *et al.* Pathology-selective antiepileptic effects in the focal freeze-lesion rat model of malformation of cortical development. **Experimental Neurology**, [s. l.], vol. 343, p. 113776, 2021.
- REDECKER, C. *et al.* Differential Downregulation of GABAA Receptor Subunits in Widespread Brain Regions in the Freeze-Lesion Model of Focal Cortical Malformations. **J. Neurosci.**, [s. l.], vol. 20, no. 13, p. 5045–5053, 2000.
- REN, L. *et al.* Gamma oscillations precede interictal epileptiform spikes in the seizure onset zone. **Neurology**, [s. l.], vol. 84, no. 6, p. 602–608, 2015.
- ROSEN, G. D. *et al.* The development of induced cerebrocortical microgyria in the rat. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, [s. l.], vol. 51, no. 6, p. 601–611, 1992.
- ROSEN, Glenn D; BURSTEIN, D.; GALABURDA, A. M. Changes in Efferent and Afferent Cerebrocortical Microgyria. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], vol. 440, no. May 1999, p. 423–440, 2000.
- ROSS, K. C.; COLEMAN, J. R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: Behavior and biological substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], vol. 24, no. 6, p. 639–653, 2000.
- ROSSETTI, F. *et al.* EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: Audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). **Epilepsy Research**, [s. l.], vol. 72, no. 2–3, p. 192–208, 2006.
- SCANTLEBURY, M. H. *et al.* Freeze lesion-induced focal cortical dysplasia predisposes to atypical hyperthermic seizures in the immature rat. **Epilepsia**, [s. l.], vol. 45, no. 6, p. 592–600, 2004.
- SCHEFFER, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, [s. l.], vol. 58, no. 4, p. 512–521, 2017.
- SERAFINI, R.; DETTLOFF, S.; LOEB, J. A. Neocortical slices from adult chronic epileptic rats exhibit discharges of higher voltages and broader spread. **Neuroscience**, [s. l.], vol. 322, p. 509–524, 2016.
- SHIMIZU-OKABE, C. *et al.* Changes in the expression of cation-Cl⁻ cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. **Neuroscience Research**, [s. l.], vol. 59, no. 3, p. 288–295, 2007.
- SQUIER, W.; JANSEN, A. Polymicrogyria: Pathology, fetal origins and mechanisms. **Acta Neuropathologica Communications**, [s. l.], vol. 2, no. 1, 2014.
- STERIADE, M.; MCCORMICK, D. A.; SEJNOWSKI, T. J. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. **Science**, [s. l.], vol. 262, no. 5134, p. 679–685, 1993.

TALLON-BAUDRY, C.; BERTRAND, O. Oscillatory gamma activity in humans and its role in object representation. **Trends in Cognitive Sciences**, [s. l.], vol. 3, no. 4, p. 151–162, 1999.

UVA, L. *et al.* Synchronous inhibitory potentials precede seizure-like events in acute models of focal limbic seizures. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 35, no. 7, p. 3048–3055, 2015.

VERROTTI, A. *et al.* New trends in neuronal migration disorders. **European Journal of Paediatric Neurology**, [s. l.], vol. 14, no. 1, p. 1–12, 2010.

VINOGRADOVA, L. V.; SHATSKOVA, A. B. Lateral asymmetry of early seizure manifestations in experimental generalized epilepsy. **Neuroscience**, [s. l.], vol. 213, p. 133–143, 2012.

VINOGRADOVA, Lyudmila V. Interhemispheric difference in susceptibility to epileptogenesis: Evidence from the audiogenic kindling model in Wistar rats. **Brain Research**, [s. l.], vol. 1329, p. 175–181, 2010.

WANG, T. *et al.* Accumulation of GABAergic neurons, causing a focal ambient GABA gradient, and downregulation of KCC2 are induced during microgyrus formation in a mouse model of polymicrogyria. **Cerebral Cortex**, [s. l.], vol. 24, no. 4, p. 1088–1101, 2014.

ZIJLMANS, M. *et al.* High-frequency oscillations as a new biomarker in epilepsy. **Annals of Neurology**, [s. l.], vol. 71, no. 2, p. 169–178, 2012.

ANEXO I



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37310

Título: Epileptogênese em modelo de duplo insulto

Vigência: 01/07/2019 à 31/12/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARIA ELISA CALCAGNOTTO - coordenador desde 01/07/2019
Eduardo Rigon Zimmer - pesquisador desde 01/07/2019
Natividade de Sá Couto Pereira - pesquisador desde 01/07/2019
Querusche Klippel Zanona - Aluno de Doutorado desde 01/07/2019
LETÍCIA BARBIERI CAUS - Aluno de Mestrado desde 01/07/2019
GABRIELA LAZZAROTTO - Aluno de Mestrado desde 01/07/2019
Joseane Righes Marafiga - Aluno de Doutorado desde 01/07/2019

Equipe Externa:

Norberto Garcia Cairasco - pesquisador desde 01/07/2019
Artur Fernandes - pesquisador desde 01/07/2019
José Antonio C. Oliveira - pesquisador desde 01/07/2019
Ana Luiza Ferreira Donatti - pesquisador desde 01/07/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 164 animais adultos (41 animais Wistar: 33 fêmeas adultas Wistar e 8 machos adultos Wistar e 82 animais WAR: 66 fêmeas adultas WAR e 16 machos adultos WAR) para a obtenção de 528 animais (264 Wistar + 264 WAR), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 20 de Agosto de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética