

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Larissa Samara Santos Xavier

**ACOPLAMENTO LOCAL DE ATIVIDADE OSCILATÓRIA POR ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA PROFUNDA EM UM MODELO DE ICTOGÊNESE**

Belo Horizonte
2020

Larissa Samara Santos Xavier

**ACOPLAMENTO LOCAL DE ATIVIDADE OSCILATÓRIA POR ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA PROFUNDA EM UM MODELO DE ICTOGÊNESE**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia e
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial à
obtenção de título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra
Moraes

Coorientador: Dr. Leonardo de Oliveira
Guarnieri

Belo Horizonte

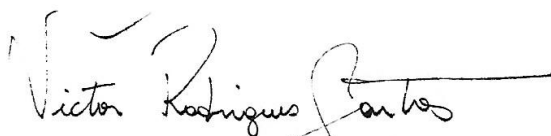
2020

- 043 Xavier, Larissa Samara Santos.
Acoplamento local de atividade oscilatória por estimulação elétrica profunda em um modelo de ictogênese [manuscrito] / Larissa Samara Santos Xavier. - 2020.
195 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes. Coorientador: Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.
1. Fisiologia e Farmacologia. 2. Epilepsia. 3. Convulsões. 4. Rede Nervosa. 5. Estimulação Elétrica. I. Moraes, Márcio Flávio Dutra. II. Guarnieri, Leonardo de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.
- CDU: 612:615

"ACOPLAMENTO LOCAL DE ATIVIDADE OSCILATÓRIA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PROFUNDA EM UM MODELO DE ICTOGÊNESE"

LARISSA SAMARA SANTOS XAVIER


Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **06 de fevereiro de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. VICTOR RODRIGUES SANTOS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. LÍGIA ARAÚJO NAVES KUSHMERICK
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



DR. LEONARDO DE OLIVEIRA GUARNIERI
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COORDENADOR



PROF. DR. MÁRCIO FLÁVIO DUTRA MORAES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 06 de fevereiro de 2020

Trabalho realizado no Núcleo de Neurociências (NNC) do departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), bloco A4, sala 240, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com auxílio das seguintes agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Aos meus pais.

Agradecimentos

Confesso que adiei até o último momento escrever os agradecimentos pois pensar em todas as pessoas que me auxiliaram nesse processo longo e árduo sempre me traz lágrimas aos olhos. Porém é necessário deixar registrado o quanto vocês foram importantes para mim.

Primeiramente, agradeço ao professor Márcio, que prontamente me abriu as portas do laboratório e confiou no meu trabalho muito mais do que eu mesma.

Eu reconheço o privilégio que é ser orientada por você e ter acesso à sua genialidade, apesar de você me deixar louca! Muitos dos seus alunos te chamam de mestre e você faz juz ao título. Sou muito grata por todos os ensinamentos, mas também por todos os papos despretensiosos e cervejas compartilhadas (e não foram poucas!). Obrigada por me mostrar que nenhuma pergunta é idiota e me ensinar que “o ótimo é inimigo do bom” (apesar de nenhum de nós seguirmos isso).

Léo, meu neném, minha princesa, meu amigo instantâneo, muito obrigada por ter sido muito mais que um coorientador. Obrigada por ter sido meu companheiro em todos os momentos, me incentivando e puxando orelha quando necessário, chorando quando as coisas não davam certo e celebrando as pequenas vitórias. Eu sei que você sabe que eu não teria conseguido sem você. Desculpa ser tão teimosa, vou melhorar. Meu maridinho, se cuida porque você vai ter que me aturar pra sempre...

Flavinho, meu mau-humorado favorito, muito obrigada pela paciência. Não sei como a gente se tornou amigo, tendo em vista que somos opostos em quase tudo, mas sou muito feliz por isso ter acontecido. Obrigada por todos os conselhos, os cafezinhos compartilhados, as risadas sem fim e pelos papos inapropriados que você tem o dom de iniciar! (não agradecerei pelas zueiras pois sou rancorosa)

Johnzinho, bb! Obrigada por toda a ajuda! Sem você, mestre do MATLAB, eu não saberia nem abrir um registro! Obrigada pela paciência comigo, pelo apoio em todo o processo e por me ajudar a não surtar! Você tem um futuro brilhante pela frente!

Sou extremamente grata a Keite, por toda a ajuda com as rotinas finais de análise. Obrigada por estar sempre disponível, pelo seu cuidado e ética profissional. Graças a você temos figuras dignas de pendurar em um quadro!

Obrigada Jé, meu amorzinho, dona do melhor abraço, por ser sempre luz no meu dia! Obrigada por toda a ajuda com as infinitas matrizes, pelos papos aleatórios e por me aturar te mostrando vídeos idiotas ou textos bizarros.

Tenho que agradecer a Lu, minha psicóloga de plantão! Obrigada por me ouvir e colocar meus pés no chão todas as vezes. O laboratório não foi mais o mesmo sem você.

Muito obrigada aos que compartilharam comigo o Dark Side: Simões, Hyorrana, Mateus, Daniel, Cayo, Aline e Samir. Tem que ser meio doido pra encarar esse laboratório, mas sou feliz por dividir essa loucura com vocês.

Não posso deixar de agradecer a prof. Grace, afinal de contas foram as suas aulas que me despertaram o interesse em fazer parte do NNC (tudo culpa sua sempre, né?). Obrigada por, do seu jeito meio bruto às vezes, ter me incentivado durante esse mestrado infinito. Se algum dia me tornar verdadeiramente cientista, saiba que estarei emulando muito do que você faz.

Obrigada à “galera da 168” que, apesar de não compartilharmos o mesmo ambiente, foram companheiros em diversos momentos, dividindo as felicidades e o sofrimento que só a carreira acadêmica nos proporciona! Em especial à Lorena, minha irmãzinha, doida, maluca e única! Obrigada por ser companheira, dentro e fora do laboratório. Te amo!

Obrigada também ao prof. Bruno, que em vários momentos foi essencial pra minha sanidade! Obrigada pelos cafezinhos, palhas italianas e pelas conversas infindáveis sobre todas as dores do mundo.

Obrigada aos “alunos do Cleitin” por terem sido fuga pra mim, às vezes literalmente quando ia pro CTPMag, outras figurativamente, quando dividimos uma cervejinha em bares duvidosos. Vocês são incríveis!

Obrigada prof. André, prof. Cleiton, prof Mazonni e prof. Juliana pelos ensinamentos e pela oportunidade de dividir o laboratório com vocês.

Tenho que agradecer também à todos os amigos que acumulei ao longo da vida e tenho MUITA sorte de ter ao meu lado. Galera da bio, povo do DA, amados do 168, queridos do coltec, obrigada por sempre me lembrarem que a vida é muito mais do que o laboratório (mesmo que às vezes não pareça). Não ousarei citar nomes, mas quem é, sabe! Amo vocês.

O agradecimento do Dig tem que ser separadinho, pois ele ocupa um pedaço especial na minha vida. Obrigada por ter me apoiado todo esse tempo e por sempre acreditar em mim. Não teria conseguido sem você. Serei eternamente grata por ter você na minha vida, independente do título que a gente usar pra isso. Obrigada obrigada obrigada.

Obrigada à minha família. Mamis e papis, vocês são o início, meio e fim de tudo. Obrigada por terem investido na minha educação durante toda a minha vida e por serem uma rede de segurança em todas as loucuras que eu me joga. Lud e Lucas, se eu estou aqui é por vocês.

Finalmente, mas não menos importante, obrigada à todos os ratos utilizados neste projeto. Vocês involuntariamente cederam suas vidas e espero que não tenha sido em vão.

Resumo

Durante a ictogênese é observado um estado de hiperexcitação local que pode se alastrar para áreas adjacentes sinápticamente conectadas. Hipotetizamos que o espalhamento dessa atividade para outros locais do cérebro só é possível devido ao acoplamento anormal de osciladores facilitados por eventos sincronizantes. Como forma de testar essa hipótese utilizamos a estimulação elétrica profunda pareada com a crise como um promotor de sincronismo - mimetizando eventos interictais. Para a execução do presente trabalho, foi necessário o desenvolvimento dos equipamentos de registro e estimulação para registro simultâneo em múltiplas áreas, descrito no capítulo 1. Ratos adultos wistar receberam o implante de uma matriz de múltiplos eletrodos bilateralmente no núcleo basolateral do complexo amigdalóide e na região CA3 do hipocampo para registro, além de cânula guia para a injeção de ácido caínico. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. Os pertencentes ao grupo controle foram registrados por um período basal e após a injeção sem nenhuma forma de interferência, enquanto os do grupo estimulado receberam pulsos elétricos pareados com as crises. O sistema de aquisição desenvolvido apresentou excelente relação sinal/ruído permitindo extrair parâmetros associados à dinâmica de propagação da crise em animais movendo-se livremente (capítulo 1). Uma avaliação subjetiva do início e fim da crise, baseado em critérios utilizados na clínica (capítulo 2), foi utilizada como padrão ouro para algoritmos automáticos (correlação com $r^2 > 0,9$) utilizados no capítulo 3. As crises individuais de cada animal/grupo foram então classificadas quanto à sua dinâmica de propagação entre as áreas. Análises de similaridade entre canais (Coeficiente de correlação de Pearson) e Z-score da energia sinal foram submetidos a uma redução dimensional de sinal (Análise de Componente Principal) para confirmar que agrupamentos distintos no espaço de componentes principais se correlacionam com dinâmicas distintas na trajetória ictogênica. Em resumo, nossos dados mostram que o modelo de injeção de ácido caínico foi efetivo em gerar crises inicialmente focais e sugerem, conclusões limitadas devido ao baixo número amostral, que disparos interictais artificialmente aplicados durante o processo ictogênico podem afetar a dinâmica de espalhamento das crises.

Palavras-chave: Epilepsia, Crises focais, DBS, Estimulação elétrica pareada, Redes neurais

Abstract

During ictogenesis, a state of local/focal hyperexcitation may spread to adjacent connected areas due to synaptic connectivity or non-synaptic circuitry modulation. We hypothesize that the spread of this activity to other brain areas is only possible due to the abnormal coupling of oscillators that can be facilitated by synchronizing events. In order to test this hypothesis, we use deep electrical stimulation paired with the seizure as a synchronism promoter - mimetizing artificial interictal events. For the execution of the present work, it was necessary to develop the recording and stimulation apparatus for simultaneous recording in multiple areas, described in chapter 1. Adult wistar rats were implanted bilaterally with a multiple electrode array in the basolateral nucleus of the amygdala complex and in the CA3 region of the hippocampus for recording, as well as guide cannula for the injection of kainic acid in the right hippocampus. The animals were divided into two experimental groups: control group were recorded for a baseline period followed by KA injection without any interference; stimulated group received electrical pulses paired with the crisis. The acquisition system developed showed an excellent signal/noise ratio allowing the extraction of parameters associated with the dynamics of seizure spread in freely-moving animals (chapter 1). A subjective assessment of the onset and termination of the seizure, based on clinical criteria (chapter 2), was used as the gold standard for automatic detection algorithms (correlation with $r^2 > 0.9$) used in chapter 3. The individual seizures of each animal / group were then classified as to their propagation dynamics between areas. Channel similarity analysis (Pearson's correlation coefficient) and signal energy Z-score underwent dimensional signal reduction (Principal Component Analysis) to confirm that different groupings in the principal component space correlate with different dynamics ictogenic trajectory. In summary, our data show that the KA injection model was effective in generating primarily focal crisis and suggest, limited conclusions due to our low sample size, that artificial interictal discharges applied during the ictogenic process can affect the dynamics of seizure propagation.

Keyword: Epilepsy, Focal seizures, DBS, Paired stimulation, Neural networks

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação dos níveis de organização no cérebro.

Figura 2: Representação do espaço-fase em um plano cartesiano composto pelos eixos x e y.

Figura 3: Representação do espaço-fase em um plano cartesiano composto pelos eixos x, y e z de atratores.

Figura 4: Oscilações presentes no córtex cerebral.

Figura 5: Representação dos osciladores envolvidos na geração de sincronia.

Figura 6: A presença de neurônios inibitórios modifica a atividade excitatória.

Figura 7: Representação dos componentes de uma oscilação ao longo do tempo.

Figura 8: Representação de sinais com e sem sincronismo de fase.

Figura 9: Disparos interictais registrados por EEG de escalpo em pacientes.

Figura 10: Material utilizado e detalhes da confecção dos eletrodos de estímulo.

Figura 11: Imagem esquemática da disposição dos componentes para a confecção da cânula guia de injeção.

Figura 12: Molde para a confecção dos eletrodos de registro, observados em lupa.

Figura 13: Material utilizado para a confecção da matriz de eletrodos.

Figura 14: Representação esquemática do sistema de registro.

Figura 15: Circuito utilizado para a programação dos pulsos de estímulo.

Figura 16: Eletrodos desenvolvidos para a execução dos protocolos.

Figura 17: Duração da cirurgia estereotáxica com e sem a utilização da matriz de eletrodos.

Figura 18: Equipamento utilizado para o registro encefalográfico.

Figura 19: Chip Intan com entrada de sinal via conector ffc.

Figura 20: Equipamento desenvolvido para programar os estímulos elétricos utilizados no protocolo.

Figura 21: Pulsos quadráticos bifásicos gerados com Arduino através do estimulador.

Figura 22: Linha do tempo dos experimentos executados.

Figura 23: Coordenadas estereotáxicas utilizadas para a inserção dos eletrodos e da cânula guia.

Figura 24: Procedimento cirúrgico estereotáxico.

Figura 25: Animal com os implantes fixados com acrílico odontológico após recuperação

Figura 26: Representação do protocolo de estimulação e registro dos animais do grupo 0,5Hz

Figura 27: Representação do primeiro protocolo de registro dos animais do grupo controle

Figura 28: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal C1.

Figura 29: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal C2.

Figura 30: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal C3.

Figura 31: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal C4.

Figura 32: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal E1.

Figura 33: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal E2.

Figura 34: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal E3.

Figura 35: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal E4.

Figura 36: Características gerais das crises por grupo experimental.

Figura 37: Primeiro padrão de recrutamento encontrado no animal C1.

Figura 38: Segundo padrão de recrutamento do animal C1.

Figura 39: Padrão de crise encontrado no animal C2.

Figura 40: Registro do animal C3 após a injeção de ácido caínico.

Figura 41: Crise 03 encontrada no animal C4 (C4_03).

Figura 42: O primeiro padrão de crise encontrado no animal E1 (E1_01).

Figura 43: Segundo padrão de crise encontrado no animal E1 (E1_02).

Figura 44: Terceiro padrão de crise encontrado no animal E1 (E1_03).

Figura 45: Quarto padrão de crise encontrado no animal E1.

Figura 46: Exemplo do tipo de crise identificado visualmente no animal E2 (E2_04).

Figura 47: Primeiro padrão de crise encontrado no animal E3 (E3_01).

Figura 48: Segundo padrão de crise identificado visualmente no animal E3 (E3_04).

Figura 49: Padrão de crise identificado no animal E4.

Figura 50: Esquema das etapas de redução do número de pontos para o cálculo da correlação de Pearson ao longo do tempo a partir de uma matriz de 16x16.

Figura 51: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal C1.

Figura 52: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal C2.

Figura 53: Energia normalizada (z-score) ao longo do tempo de registro do animal C3.

Figura 54: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal C4.

Figura 55: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal E1.

Figura 56: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal E2.

Figura 57: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal E3.

Figura 58: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal E4.

Figura 59: Correlação entre os eventos ictais identificados visualmente e utilizando os picos de energia no sinal.

Figura 60: Análise de energia e similaridade durante o primeiro padrão ictal do animal C1.

Figura 61: Análise de correlação inter-áreas do primeiro padrão de crise identificado no animal C1.

Figura 62: Análise de energia e similaridade durante o segundo padrão ictal do animal C1.

Figura 63: Análise de correlação inter-áreas do segundo padrão de crise identificado no animal C1.

Figura 64: Análise de componentes principais do animal C1 durante as crises C1_01 e C1_02.

Figura 65: Análise de energia e similaridade durante o padrão ictal identificado no animal C2.

Figura 66: Análise de correlação inter-áreas no padrão de crise identificado no animal C2.

Figura 67: Análise de energia e similaridade durante o padrão ictal identificado no animal C4.

Figura 68: Análise de correlação inter-áreas do padrão de crise identificado no animal C4.

Figura 69: Análise de energia e similaridade durante o primeiro padrão ictal identificado no animal E1.

Figura 70: Análise de correlação inter-áreas do primeiro padrão de crise identificado no animal E1.

Figura 71: Análise de energia e similaridade durante o segundo padrão ictal identificado no animal E1.

Figura 72: Análise de correlação inter-áreas do segundo padrão de crise identificado no animal E1.

Figura 73: Análise de energia e similaridade durante o terceiro padrão ictal identificado no animal E1.

Figura 74: Análise de correlação inter-áreas do terceiro padrão de crise identificado no animal E1.

Figura 75: Análise de energia e similaridade durante o quarto padrão ictal identificado no animal E1.

Figura 76: Análise de correlação inter-áreas do quarto padrão de crise identificado no animal E1.

Figura 77: Análise de componentes principais do animal E1 durante as crises E1_01, E1_02, E1_03 e E1_06.

Figura 78: Análise de energia e similaridade durante o padrão ictal identificado no animal E2.

Figura 79: Análise de correlação inter-áreas do padrão de crise identificado no animal E2.

Figura 80: Análise de energia e similaridade durante o primeiro padrão ictal identificado no animal E3.

Figura 81: Análise de correlação inter-áreas do primeiro padrão de crise identificado no animal E3.

Figura 82: Análise de energia e similaridade durante o segundo padrão ictal identificado no animal E3.

Figura 83: Análise de correlação inter-áreas do segundo padrão de crise identificado no animal E3.

Figura 84: Análise de componentes principais do animal E3 durante as crises E3_02 e E3_04.

Figura 85: Análise de energia e similaridade durante o padrão ictal identificado no animal E4.

Figura 86: Análise de correlação inter-áreas do padrão de crise identificado no animal E4.

Figura 87: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal C1.

Figura 88: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal C2.

Figura 89: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal C4.

Figura 90: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal E1, antes do primeiro ES.

Figura 91: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal E1, após o ES.

Figura 92: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal E2, antes do ES.

Figura 93: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal E2, após o ES.

Figura 94: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal E3, antes do ES.

Figura 95: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal E3, após o ES.

Figura 96: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal E4, antes do ES.

Figura 97: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal E4, após o ES.

Lista de Abreviaturas

- (AAC) *Amplitude–amplitude coupling*
- (Amy) Complexo amigdalóide
- (AP) Antero-posterior
- (BLA) Núcleo basolateral do complexo amigdalóide
- (CFC) *Cross-frequency coupling*
- (CA3) Corno de Ammon 3
- (DBS) *Deep brain stimulation*
- (DV) Dorso-ventral
- (EE) Estimulação elétrica
- (EEG) Eletroencefalograma
- (Hip) Hipocampo
- (HFO) *High frequency oscillations*
- (KA) *Kainic acid*
- (LFP) *Local field potential*
- (ML) Médio-lateral
- (PAC) *Phase–amplitude coupling*
- (PFC) *Phase–frequency coupling*
- (PPC) *Phase–phase coupling*
- (SE) *Status epilepticus*
- (STDP) *Spike timing-dependent plasticity*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. MAPEANDO O CÉREBRO	20
1.2. ALÉM DA ANATOMIA: O CÉREBRO COMO UM SISTEMA DINÂMICO	22
1.2.1 Osciladores	26
1.2.2 Integração	30
1.2.2.1 Phase-Phase coupling ou Acoplamento de Fase	31
1.3. EPILEPSIA COMO UMA DOENÇA DE SISTEMAS DINÂMICOS	34
1.3.1 Estado interictal e ictogênese	34
1.4. SONDAAGEM DE SISTEMAS DINÂMICOS	37
1.4.1 DBS pareado com a crise para protocolos de sondagem	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. OBJETIVO GERAL	42
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
CAPÍTULO 1 - SOLUÇÕES OPEN-SOURCE PARA REGISTROS ELETROENCEFALOGRÁFICOS	43
3. OBJETIVOS	45
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. CONFECÇÃO DOS IMPLANTES	48
4.1.1. Eletrodos de Estimulação	48
4.1.2. Cânula Guia	48
4.1.3. Eletrodos de Registro	49
4.1.4. Matriz de eletrodos de estimulação e estimulação	51
4.2. EQUIPAMENTO DE AQUISIÇÃO DE SINAIS E ESTIMULAÇÃO	52
4.2.1. Equipamento de Registro	52
4.2.2. Sistema de Estimulação Elétrica	52
5. RESULTADOS	54
5.1. ELETRODOS DE REGISTRO E ESTIMULAÇÃO	55
5.2. MATRIZ DE ELETRODOS DE REGISTRO E ESTIMULAÇÃO	55
5.3. EQUIPAMENTO DE REGISTRO	56
5.4. EQUIPAMENTO PARA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA	57
6. DISCUSSÃO	58

CAPÍTULO 2 - ANÁLISES VISUAIS DOS REGISTROS ENCEFALOGRÁFICOS	60
7. OBJETIVOS	63
7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
8. MATERIAIS E MÉTODOS	65
8.1. DIRETRIZES ÉTICAS	66
8.2. SUJEITOS EXPERIMENTAIS	66
8.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	66
8.4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	67
8.5. PROTOCOLO DE REGISTRO E ESTIMULAÇÃO	70
8.5.1. Grupo Estimulado	71
8.5.2. Grupo Controle	71
8.6. IDENTIFICAÇÃO DOS EVENTOS EPILEPTIFORMES	72
8.6.1. Organização dos Canais	72
8.7. HISTOLOGIA	73
9. RESULTADOS	74
9.1. REGISTRO ELETROENCEFALOGRÁFICO	75
9.1.1 Grupo estimulado	77
9.2. IDENTIFICAÇÃO VISUAL DE EVENTOS EPILEPTIFORMES INDUZIDOS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO CAÍNICO	80
9.3. IDENTIFICAÇÃO VISUAL DA DINÂMICA DE INÍCIO E PROPAGAÇÃO DE EVENTOS ICTAIS	81
9.3.1. Grupo controle	81
9.3.1.1. Animal C1	81
9.3.1.2. Animal 02 - C2	83
9.3.1.3. Animal 03 - C3	84
9.3.1.4. Animal 04 - C4	84
9.3.2. Grupo estimulado	85
9.3.2.1. Animal 01 - E1	85
9.3.2.2. Animal 02 - E2	87
9.3.2.3. Animal 03 - E3	88
9.3.2.4. Animal 04 - E4	89
10. DISCUSSÃO	91
10.2. IDENTIFICAÇÃO VISUAL DE EVENTOS EPILEPTIFORMES INDUZIDOS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO CAÍNICO	92
10.3. IDENTIFICAÇÃO VISUAL DA DINÂMICA DE INÍCIO E PROPAGAÇÃO DE EVENTOS ICTAIS	93
10.3.1 Grupo controle	93
10.3.2 Grupo estimulado	94

CAPÍTULO 3 - PROCESSAMENTO DOS REGISTROS ENCEFALOGRÁFICOS E ANÁLISES DE SIMILARIDADE APLICADAS À DINÂMICA DE PROPAGAÇÃO ICTAL	97
11. OBJETIVOS	99
11.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	100
12. MATERIAIS E MÉTODOS	101
12.1 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO	102
12.2 CÁLCULO DA ENERGIA DO SINAL E Z-SCORE	102
12.2 IDENTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DE EVENTOS EPILEPTIFORMES	102
12.3 ANÁLISE DE SIMILARIDADE	103
12.3.1 Similaridade durante os eventos	105
12.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES ICTAIS	105
13. RESULTADOS	106
13.1 IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS EPILEPTIFORMES	107
13.1.1 Grupo controle	107
13.1.1.1 Animal C1	107
13.1.1.1.2 Animal C2	108
13.1.1.1.3 Animal C3	108
13.1.1.1.4 Animal C4	109
13.1.1.2 Grupo estimulado	110
13.1.1.2.1 Animal E1	110
13.1.1.2.2 Animal E2	110
13.1.1.2.3 Animal E3	111
13.1.1.2.3 Animal E4	112
13.1.2 Identificação dos picos de energia	113
13.2 ANÁLISE DE SIMILARIDADE POR EVENTO	114
13.2.1 Grupo Controle	115
13.2.1.1 Animal C1	115
13.2.2.1 Animal E1	130
13.2.2.3 Animal E3	147
13.2.2.4 Animal E4	154
13.3.1 Grupo Controle	158
13.3.4.1 Animal C1	158
13.3.4.2 Animal C2	159
13.3.4.3 Animal C4	160
13.4.2 Grupo estimulado	161
13.3.4.1 Animal E1	161
13.3.4.1 Animal E2	162

13.3.4.1 Animal E3	164
13.3.4.1 Animal E4	164
14. DISCUSSÃO	166
14.1 IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS EPILEPTIFORMES	167
14.2 ANÁLISE DE SIMILARIDADE	167
14.3 ANÁLISE DE SIMILARIDADE POR EVENTO	168
14.3.1 Grupo Controle	169
14.3.2 Grupo estimulado	169
14.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES ICTAIS	171
14.4.1 Grupo Controle	171
14.4.1 Grupo Estimulado	172
15. CONCLUSÃO	173
16. REFERÊNCIAS	175
17. ANEXOS	187

1. INTRODUÇÃO

1.1. MAPEANDO O CÉREBRO

Como caracterizar um sistema tão complexo como o cérebro? Como cerca de 100 bilhões de neurônios interagem e são responsáveis por toda a miríade de comportamentos humanos que conhecemos?

Essas são algumas das perguntas que movem muitos neurocientistas ao longo da história. Hoje, muito se sabe sobre a macroanatomia cerebral, existindo nomenclaturas e caracterizações detalhadas sobre núcleos, lobos cerebrais e giros da superfície cortical (MACHADO; HAERTEL, 2014). No nível microscópico também é possível encontrar uma vasta literatura que se concentra desde detalhes da morfologia dos neurônios até a descrição de seus receptores e neurotransmissores (JONES, 1986). Apesar de todos os esforços de pesquisa, pouco se sabe sobre como funções cognitivas complexas emergem dessas estruturas (TONONI; KOCH, 2015).

Ramon Y Cajal foi um dos mais proeminentes nessa área de estudo, demonstrando fundamentos da organização neuronal que permanecem até os dias atuais (SWANSON; LICHTMAN, 2016), assim como Korbinian Brodmann, um dos primeiros a sugerir que algumas funções estão localizadas em áreas específicas do córtex. Assim, a idéia de um “mapeamento cerebral” é antiga e as hipóteses sobre o tema se desenvolvem com os avanços de técnicas de microscopia, coloração e imagem (CATANI *et al.*, 2013).

Em 2005, o neuroanatomista computacional Olaf Sporns e seus colaboradores sugeriram que somente será possível uma compreensão completa do cérebro, desde a estrutura até sua função, quando for desenvolvido um modelo estrutural detalhado das unidades neuronais e suas conexões, e cunharam o termo *connectoma* para descrever esse conjunto de dados sobre o cérebro humano. (SPORNS; TONONI; KÖTTER, 2005b). Como uma sugestão, Sporns e colaboradores propuseram definições para essa possível organização hierárquica, dividida em níveis denominados micro, macro e meso escalas (Figura 1) (SPORNS; TONONI; KÖTTER, 2005b). A reconstrução em diferentes escalas é extremamente

importante para a completa compreensão das partes que formam o sistema nervoso central, assim como as interações e funções cognitivas que elas suportam, tanto no cérebro normal quanto no patológico.

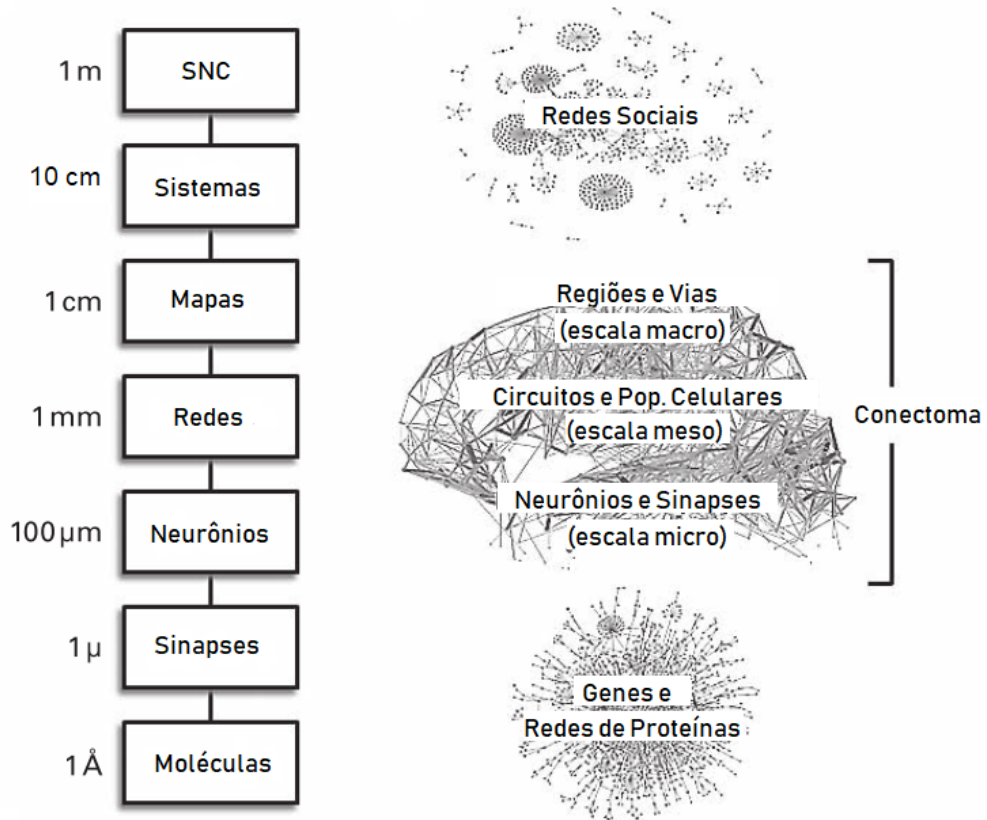


Figura 1 - Representação dos níveis de organização no cérebro. Esquerda: níveis de organização do sistema nervoso central com escalas de magnitude. Direita: localização em escala do conectoma humano que se subdivide em macro, meso e micro. Em escalas menores temos as redes de proteínas e genoma e acima, as organizações sociais. Modificado de (SPORNS, 2012).

A mesoescala descreve conexões a nível celular entre redes neuronais locais ou de diferentes áreas do cérebro (SPORNS; TONONI; KÖTTER, 2005a). Esse nível une informações de micro escala, como a conexão local de neurônios, com a macro ao delinear as interações com agrupamentos neuronais entre áreas do cérebro. Por essas características, é a escala mais utilizada em estudos de circuitos (ZENG, 2018).

No presente trabalho, a dinâmica entre redes neurais de diferentes áreas será avaliada em um modelo de epilepsia. Por definição, a palavra dinâmica engloba movimento e variação, o que faz com que a compreensão somente da

anatomia entre conexões entre as áreas envolvidas não seja suficiente para o entendimento da atividade avaliada.

1.2. ALÉM DA ANATOMIA: O CÉREBRO COMO UM SISTEMA DINÂMICO

Se temos uma arquitetura intrincada de conexões em distintas escalas espaciais, como priorizar aquela que será recrutada em tempos diferentes (organização em escala temporal)? Como a atividade de circuitos é coordenada para gerar a transferência de informação?

Apesar de todas as conexões existentes entre neurônios, redes neuronais e áreas do cérebro, a ativação entre essas partes é feita de forma coordenada e seletiva, resultando em todos os comportamentos e funções cognitivas conhecidas. Ou seja, apesar das inúmeras possibilidades presentes no conectoma estrutural, uma integração sensório-motora específica, que resulta em uma resposta comportamental que traz vantagens adaptativas ao indivíduo, só é possível se houver a ativação de circuitos específicos enquanto outros são "ativamente" silenciados (ISAACSON; SCANZIANI, 2011).

Desde a idealização do projeto conectoma, autores já indicavam a necessidade da inclusão de processos dinâmicos, estruturados de forma tempo-dependente, associados à anatomia (LARSON-PRIOR *et al.*, 2013; SPORNS; TONONI; KÖTTER, 2005a). Apesar de essencial para a compreensão do funcionamento cerebral, o mapeamento anatômico não é suficiente para tal. Assim, se faz necessário adicionar detalhes sobre como essas conexões são feitas e levar em consideração as estruturas temporais que possibilitam as trocas de informações. Em 2014, Kopell e colaboradores sugeriram a criação do *Dynome*, um apanhado de observações experimentais e modelos sobre a estrutura dinâmica cerebral e sua relação com a cognição e os comportamentos (KOPELL *et al.*, 2014).

A atual construção do conectoma apresenta muitos desafios técnicos e teóricos, de modo a tornar possível entendermos as funções e disfunções do sistema nervoso central dentro deste novo conceito. Isso acontece pois se faz necessário estudar o cérebro em uma ampla gama de escalas espaciais,

utilizando-se de ferramentas com altíssima precisão temporal e que abrange grande diversidade de áreas, a fim de compreendermos as dinâmicas de mudanças cerebrais que ocorrem em processos cognitivos e/ou patológicos.

Os conectomas apresentam diferentes abordagens, sendo uma delas sua representação em dois componentes principais: nós e arestas (VAN DEN HEUVEL; SPORNS, 2013).

Os nós são identificados como regiões do cérebro, geralmente por conhecimento da anatomia e função do cérebro, podendo variar em tamanho e especificidade, desde um único neurônio a uma região cerebral macroscópica, porém, tal definição ainda é um ponto de discussão entre os especialistas (STANLEY *et al.*, 2013).

Já as arestas representam uma ou mais conexões entre dois nós, sendo uma conexão anatômica entre dois elementos do cérebro. Em uma rede funcional, uma aresta representa a associação entre atividades registradas a partir de elementos cerebrais separados (PARK; -J. PARK; FRISTON, 2013). Estas conexões anatômicas são descritas como conectomas, enquanto as redes dinâmicas associadas à atividade cerebral durante um estado cerebral específico são denominadas conectomas funcionais (BRESSLER; MENON, 2010; GREICIUS *et al.*, 2003).

Ainda não existe uma teoria matemática amplamente aceita para a descrição dessa atividade coletiva neuronal, mas a ideia de modelar utilizando a teoria de sistemas dinâmicos têm sido cada vez mais empregada (BREAKSPEAR, 2017). Essa teoria foi desenvolvida por Newton e Leibniz para a descrição do movimento de estrelas e planetas, porém é amplamente empregada em outras áreas da biologia, como por exemplo na ecologia (HOUSTON *et al.*, 1988). Ela é utilizada para a descrição do comportamento de “sistemas complexos” e “dinâmicos”, sendo esses os que possuem múltiplas variáveis, com diversas entradas de informação e sua atividade pode ser descrita por um conjunto de equações diferenciais, que expressam as mudanças das variáveis ao longo do tempo. (MILLER, P., 2016), (BREAKSPEAR, 2017). Temos como exemplo o modelo de Hodgkin-Huxley para a descrição do início e propagação de potenciais de membrana (HODGKIN; HUXLEY, 1990). Nele as variáveis são o potencial de membrana e as condutâncias dos canais

iônicos. A dinâmica dessas variáveis pode ser prevista através de equações diferenciais que descrevem a conversão do potencial de membrana em taxa de disparo e as correntes iônicas dos canais voltagem dependente (BREAKSPEAR, 2017; HODGKIN; HUXLEY, 1990).

Uma forma de descrever todas as equações desse tipo de sistema é por uma representação gráfica de um espaço geométrico, denominado espaço-fase (do inglês *phase space*). Nesse tipo de representação, cada variável determina uma dimensão desse espaço (BREAKSPEAR, 2017), desta forma o diagrama de espaço-fase é capaz de representar todos os possíveis estados do sistema dinâmico. Para sistemas neuronais, o espaço-fase pode conter a representação das dinâmicas de taxas de disparo, condutâncias e potenciais de membrana; e um ponto no espaço representa uma combinação única do estado do sistema.

Exemplificando, uma representação do espaço-fase em um plano cartesiano composto pelos eixo x e y, sendo x o potencial de membrana e y a condutância de um canal iônico de despolarização rápido, teríamos a descrição desse sistema dinâmico definido por uma equação diferencial $dX/dt=f(x)$, onde X é composto pelas variáveis x e y (Figura 2). Com um par de valores de cada variável no plano, temos a representação de um vetor com direção e comprimentos definidos pela equação $f(x,y)$ (Figura 2 - A). Ao modificarmos os valores das variáveis, temos um campo de vetores que descrevem o comportamento das mesmas no espaço-fase. Na imagem, temos uma tendência à uma movimentação no sentido horário (Figura 2 - B). Ao conectarmos as tangentes desses vetores, temos a descrição gráfica dessas dinâmicas (Figura 2 - C).

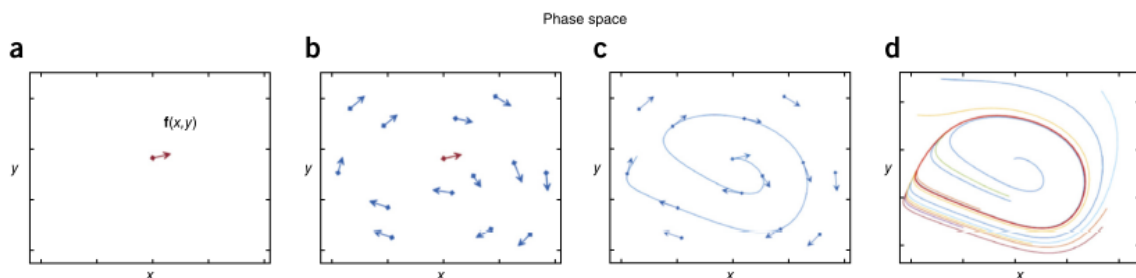


Figura 2 - Representação do espaço-fase em um plano cartesiano composto pelos eixos x e y, sendo x o potencial de membrana e y a condutância de um canal iônico de despolarização rápida. a) Representação gráfica de um vetor com direção e comprimentos definidos pela equação $f(x,y)$ em cada ponto. b) Campo de vetores (vector field ou flow c) órbita: realizando a conexão das tangentes dos vetores, temos a descrição do movimento observado em b. d) atrator simples de ciclo limitado (vermelho) e órbitas diferentes convergindo no mesmo atrator (outras cores) (BREAKSPEAR, 2017).

Uma representação interessante no espaço-fase é a chamada “atrator” (AMIT; AMIT, 1992). Se um neurônio ou grupo de neurônios apresentam um disparo regular e periódico, sua representação corresponde a um atrator de ciclo limitado (Figura 2 -D e Figura 3 - A). Se a representação desse disparo possui seu traçado no espaço-fase pouco alterado mesmo com variações nos parâmetros, ele é considerado estável. Porém, se as variações geram mudanças muito grandes no formato da representação, temos que o atrator é instável e o valor da variável responsável por essa mudança é denominado “ponto de bifurcação” (WANG, 2009). Existem sistemas nos quais coexistem dois ou mais atratores estáveis dentro do mesmo espaço-fase (WANG, 2009). Assim, mudanças nos valores de algum dos parâmetros podem ser capazes de mudar o padrão de oscilação, porém essa nova forma se mantém estável. Esses tipos de sistema são denominados “multi estáveis” (BREAKSPEAR, 2017). Considerando sistemas biológicos estáveis, seria esperado que atratores que descrevem comportamentos cíclicos - sejam eles os encontrados na atividade do sistema cardiovascular, nervoso, respiratório ou endócrino - apresentem uma robustez suficiente para a manutenção da atividade fisiológica mesmo com variações estruturais e perturbações moderadas no sistema. Assim, matematicamente, seriam descritos por atratores de ciclos limitados (GLASS, 2015).

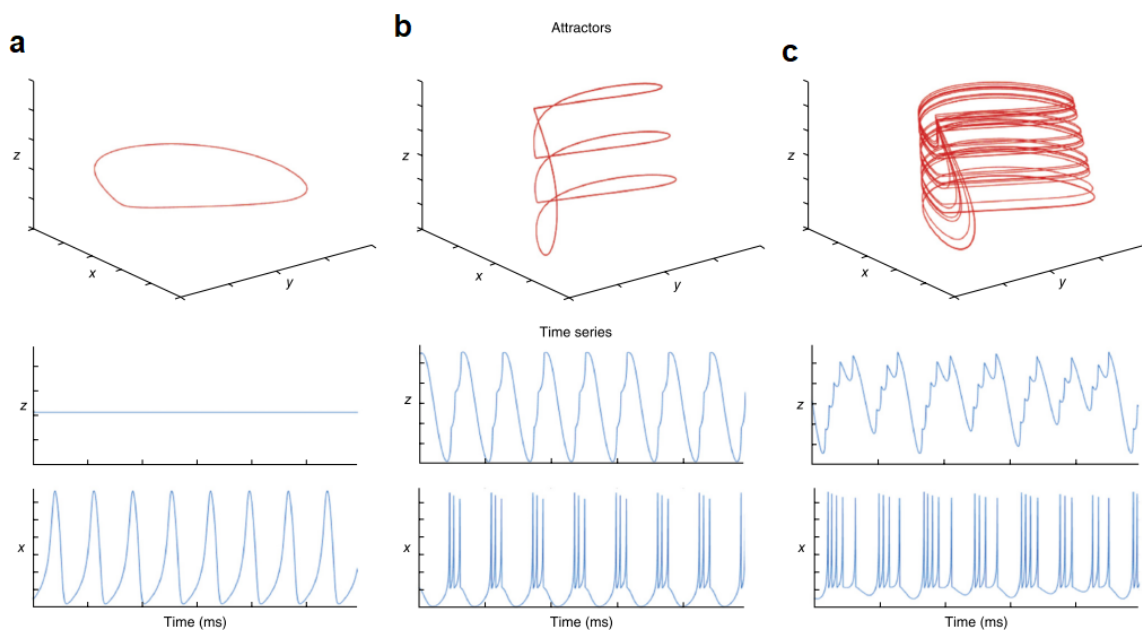


Figura 3 - Representação do espaço-fase em um plano cartesiano composto pelos eixos x, y e z de atratores. Adicionando uma variável z que apresenta comportamento de variação lenta, temos a construção de um espaço-fase com três dimensões, e a função $dX/dt=f(X)$ com X sendo composto pelas 3 variáveis. a-c) acima, temos a representação no espaço-fase de diferentes comportamentos das variáveis. No centro, o traçado do comportamento da variável z e abaixo o traçado do spike. Em e (topo), temos o comportamento de um ciclo simples limitado, sem a atividade da variável z (a, centro), enquanto em b (topo) um ciclo também limitado com comportamento mais complexo, modificado pela ação de z. Em c (topo) temos uma representação de uma oscilação denominada caótica com oscilações aperiódicas (BREAKSPEAR, 2017).

Em 1994, o grupo de pesquisa do professor Lopes da Silva inicia a discussão sobre a hipótese de que em patologias como a epilepsia, temos o desenvolvimento um sistema multi estável que sustenta a ocorrência de crises (LOPES DA SILVA, F. H.; PIJN; WALDMAN, 1994). Modificações no controle de excitação e inibição seriam responsáveis alterações no estado basal de funcionamento da circuitaria neuronal, fazendo com que perturbações no sistema gerem uma progressiva aproximação em um ponto de bifurcação entre dois atratores, sendo um deles o estado fisiológico e o outro a crise (LOPES DA SILVA, F. et al., 2003). Assim, compreender as bases teóricas desses conceitos se faz necessário nos estudos de início e espalhamento de crises.

1.2.1 Osciladores

Os ritmos oscilatórios neuronais são flutuações da excitabilidade de grupos de neurônios que ocorrem de forma periódica e podem ser representadas no espaço-fase por um atrator (BREAKSPEAR, 2017). A atividade conjunta e coerente das flutuações do potencial de membrana desses agrupamentos celulares gera correntes extracelulares, que são identificáveis com o uso de eletrodos (BUZSÁKI; WATSON, 2012). O primeiro registro de ritmos oscilatórios cerebrais foi feito em 1890 por Adolf Beck em sapos (COENEN; ZAYACHKIVSKA, 2013). Já em 1929, Hans Berger apresenta um trabalho demonstrando a existência de ritmos cerebrais também em humanos. Neste, descreve o comportamento eletroencefalográfico induzido quando o indivíduo estava acordado e de olhos fechados. A oscilação observada possuía uma grande amplitude, ciclava 10 vezes por segundo (10Hz) e foi denominada ritmo alfa (BUZSAKI, 2006). Após a primeira descrição, outros ritmos foram identificados em cérebros de humanos e mamíferos (Figura 4) (BUZSÁKI; LOGOTHETIS; SINGER, 2013).

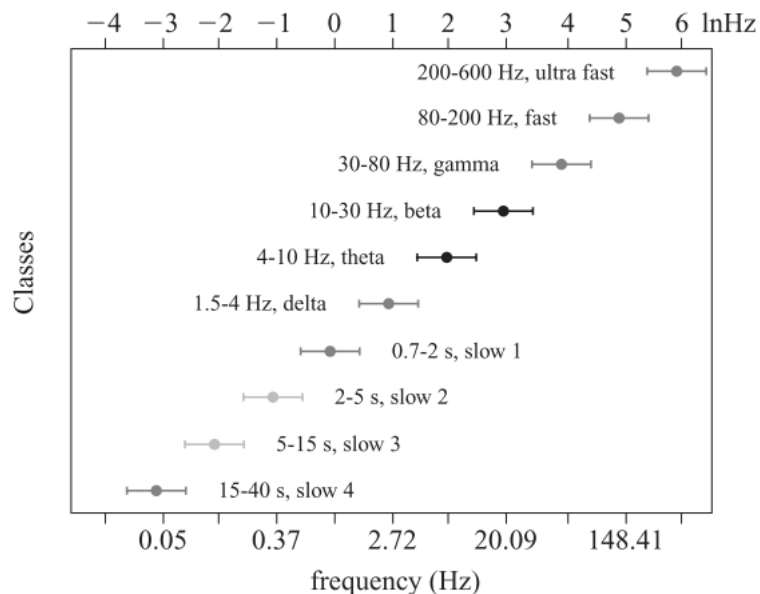


Figura 4 - Oscilações presentes no córtex cerebral. As bandas oscilatórias estão representadas pelas faixas de alcance e os nomes comumente utilizados. As oscilações lentas são agrupadas em quatro: as que ocorrem em períodos maiores que 15s (lenta 4 - <0,07 Hz), 5-15s (lenta 3 - 0,07-0,2Hz), 2-5s (lenta 2 - 0,2-0,5 Hz) e 0,7-2s (lenta 1 - 0,5-1,5Hz). As frequências entre 1,5 e 80 Hz foram cunhadas com letras em latim: delta (1,5-4Hz), theta (4-10Hz), beta (10-30 Hz) e gamma (30-80Hz). Já as ondas rápidas são divididas em duas bandas: 80-200 Hz, denominada rápida e 200-600 Hz chamadas ultra rápidas (PENTTONEN; BUZSÁKI, 2003) .

Se analisamos a atividade cerebral, para algumas funções observa-se a necessidade de excitar concomitantemente centenas de neurônios para gerar a ativação pós-sináptica de interesse. Assim, somente se os potenciais de ação dos mesmos estiverem coordenados no tempo é observado esse resultado (BUZSAKI, 2006). Dessa forma, cada ciclo de uma oscilação funcionaria como uma janela temporal de processamento e entrega de informação de um grupo neuronal para outro (ISAACSON; SCANZIANI, 2011). Caso essa transferência seja realizada entre grandes redes de neurônios, por questões físicas de condução axônica das partes da rede, observamos ritmos de oscilações lentas, enquanto as oscilações rápidas ocorrem na interações de redes locais, com menos neurônios (BUZSAKI, 2006; STEIN, ASTRID VON; VON STEIN; SARNTHEIN, 2000). Apesar dessa relação entre tamanho da rede de neurônios e frequência de oscilação ser a mais observada, existem exceções. Uma delas é descrita por Engel em 1991 onde oscilações com frequências entre 40Hz e 50Hz eram presentes na sincronização inter-hemisférica (ENGEL, A. K. *et al.*, 1991). Uma interpretação desses dados é a de que a ocorrência de comunicação em alta frequência é mais dependente do

número de sinapses do que da distância absoluta entre as áreas (VON STEIN, A.; CHIANG; KÖNIG, 2000).

Existem pelos menos dois mecanismos capazes de gerar essa sincronização local. O primeiro, mais simples, pode ser através da existência de uma entrada de informações comum entre as células do agrupamento neuronal. Esse ditador de ritmo pode estar situado tanto local (GRAY; MCCORMICK, 1996), quanto remoto à área de registro (MACDONALD *et al.*, 1998) (Figura 5). Esse tipo de sincronismo é visto nos inputs para o sistema locomotor, originados dos sistemas geradores de padrões (GRILLNER, 2006)

Outro mecanismo para geração de sincronismo é independente de uma entrada de informação comum e acontece devido às interações da rede como um todo (SIK *et al.*, 1995) (Figura 5 - C).

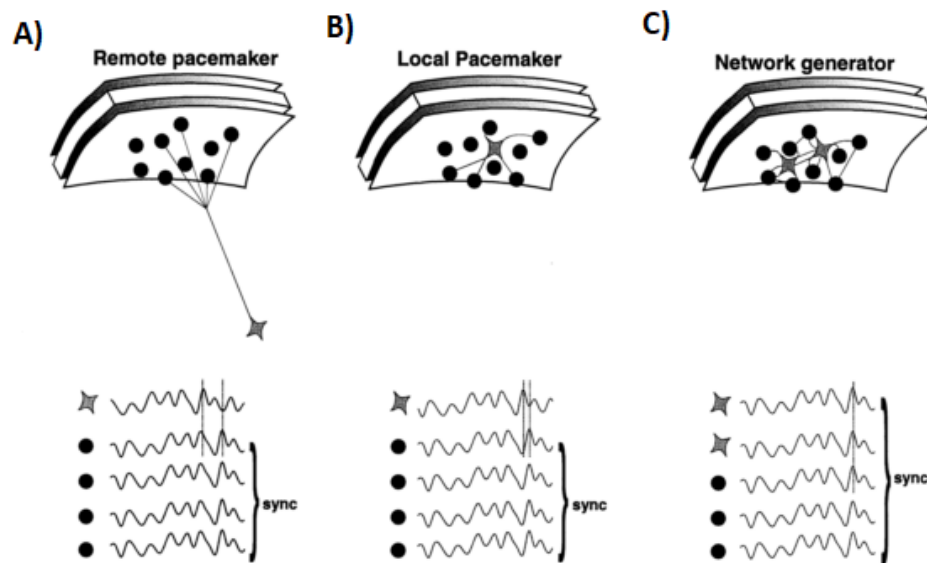


Figura 5 - Representação dos osciladores envolvidos na geração de sincronia. Círculos escuros ilustram os neurônios excitatórios, estrelas cinzas são os interneurônios inibitórios e as linhas são as conexões entre as células. Em A, temos um *pacemaker* distante, conectado a um grande número de neurônios e sua atividade resulta na ativação sincrônica dos neurônios excitatórios. Em B, o mecanismo de geração de sincronismo é semelhante a A, com a diferença do *pacemaker* estar localizado no mesmo substrato que as células excitatórias. Em C temos a geração sincronismo local pela atividade dos componentes da rede, sem a presença de um *pacemaker*. Abaixo, as representações dos padrões de sincronismo gerados por cada tipo de mecanismo. Modificado de (WHITTINGTON *et al.*, 2000).

O sincronismo gerado na própria rede é altamente dependente da atividade de neurônios inibitórios. Em um circuito composto somente por neurônios

excitatórios, a propagação da atividade é extremamente simples, com ativação gerando a despolarização dos neurônios subsequentes, independente de outros fatores e resultando em uma atividade em cadeia com pouca estabilidade (Figura 6 superior). Em contraste, em um circuito formado por neurônios inibitórios conectados em série, a ativação do primeiro da cadeia resultaria na inibição da atividade dos neurônios conectados a ele, “desinibindo” o terceiro neurônio na cadeia. A possibilidade de atividade do último neurônio ocasionaria em uma redução da atividade das células conectadas a ele (Figura 6 centro). Porém, redes que possuem tanto excitação quanto inibição passam a apresentar propriedades complexas, altamente dependentes dos padrões espaciais de conexão entre eles (Figura 6). (BUZSAKI, 2006; WHITTINGTON *et al.*, 2000).

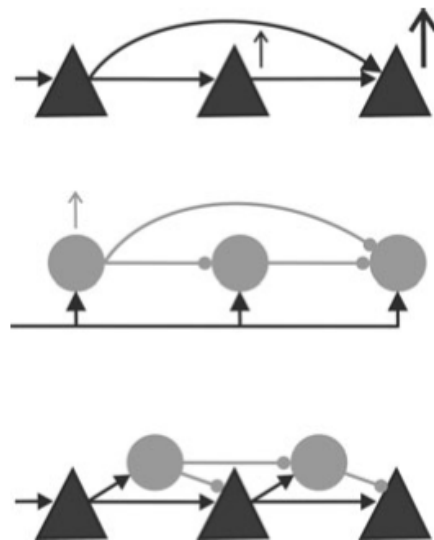


Figura 6 - A presença de neurônios inibitórios modifica a atividade excitatória. Superior: cadeia de neurônios excitatórios conectados em série. Meio: cadeia de neurônios inibitórios conectados em série. Inferior: Representação de uma rede de neurônios mista. Retirado de (BUZSAKI, 2006).

Circuitos com conexões mistas apresentam características de sistemas complexos como a não-linearidade¹. A atividade de neurônios individuais se torna difícil de prever, já que é fortemente dependente dos detalhes das conexões, além do estado inicial dos componentes da rede (BUZSAKI, 2006; LACKMY-VALLEE;

¹ Não linearidade: sistemas com características não lineares são aqueles nos quais a saída do sistema não é proporcional à combinação linear das entradas do sistema (variáveis de entrada vezes pesos de proporcionalidade). Assim, uma variação pequena em uma das variáveis não necessariamente resulta em uma pequena modificação no sistema e o mesmo vale para variações grandes (RICKLES; HAWES; SHIELL, 2007).

GIBOIN; MARCHAND-PAUVERT, 2012). Os padrões de ativação das células excitatórias nesse tipo de circuito são dependentes da distribuição temporal e física dos neurônios inibitórios (ISAACSON; SCANZIANI, 2011). Assim, mudanças pequenas em parâmetros podem gerar modificações muito expressivas na dinâmica de ativação da rede e o mesmo estímulo pode gerar diferentes respostas, dependendo do estado da inibição (BUZSAKI, 2006; LACKMY-VALLEE; GIBOIN; MARCHAND-PAUVERT, 2012).

Os conectomas que suportam a geração dos diferentes ritmos são altamente conservados na evolução e os padrões de potenciais de campo locais (do inglês *local field potential* - LFP) encontrados em humanos são vistos nos outros mamíferos investigados até então. Isso sugere que as oscilações e seus acoplamentos são partes essenciais para o funcionamento dos processos cerebrais e integração da informação (CANNON, J. *et al.*, 2014).

1.2.2 Integração

Um dos grandes problemas no estudo das neurociências pode ser denominado “problema de integração em larga-escala”. Apesar de também ser conhecido por outros nomes (e.g. *binding problem*) as perguntas centrais são as mesmas: como ocorre a coordenação e seleção dos diversos processos neurais em áreas distintas do cérebro resultando nas atividades cognitivas? Como ocorre a integração de atividades neurais fisicamente distribuídas no cérebro?

Uma das hipóteses que propõe uma resposta a esse questionamento é denominada acoplamento entre frequências (do inglês, *cross-frequency coupling* - CFC) e postula que a associação entre osciladores neurais de múltiplas frequências através de interações dinâmicas pode ser uma forma de coordenar a atividade de diferentes áreas do cérebro para a formação de um *momentum* cognitivo ou comportamental (HYAFIL *et al.*, 2015).

Para que o CFC ocorra, é necessária a existência de redes com oscilações em diferentes bandas de frequência e que os circuitos geradores dos ritmos estejam conectados sinapticamente. Existem 4 principais tipos de acoplamento entre frequências, sendo eles: o fase-frequência (*phase-frequency coupling* - PFC),

fase-fase (*phase–phase coupling* - PPC), fase-amplitude (*phase–amplitude coupling* - PAC), e amplitude–amplitude (*amplitude–amplitude coupling* - AAC) (HYAFIL *et al.*, 2015).

1.2.2.1 *Phase-Phase coupling ou Acoplamento de Fase*

O acoplamento de fase é baseado na interação entre grupos neuronais, que acontece por conexões dinâmicas mediadas por sincronismo entre múltiplas bandas de frequência de oscilação (HYAFIL *et al.*, 2015; VARELA *et al.*, 2001). Tenhamos como exemplo uma assembleia de neurônios (do inglês, *neural assemblies*), que pode ser definida como redes locais de neurônios distribuídas espacialmente e unidas por conexões recíprocas polissinápticas ou monossinápticas (MESULAM, 1990). De acordo com Varela e colaboradores, a coordenação de assembleias seria responsável pela propagação da atividade neural que produz um ato cognitivo e o mecanismo que propicia isso seria o sincronismo em fase entre os grupos neuronais que participam da atividade (VARELA *et al.*, 2001).

Como discutido anteriormente, as oscilações neuronais são flutuações rítmicas da atividade de neurônios unitários ou redes neuronais, porém também são encontradas em escalas maiores, como resultado da ação conjunta de assembleias neuronais. Essas oscilações podem ser descritas por sua frequência de ciclo por segundo (Hz - hertz), pela amplitude dos picos (energia do sinal = amplitude ao quadrado) e pela fase (MATHALON; SOHAL, 2015). A fase do sinal pode ser descrita por um ponto específico na onda em relação à origem ou a outro referencial para comparação, sendo um ciclo dividido em 360° (Figura 7). Uma outra forma de descrever as relações de fase entre sinais é como sendo a medida da relação temporal entre estes sinais normalizada pelo período total da oscilação, desta forma podemos ter relações de fase semelhante para oscilações com períodos de tempo diferentes.

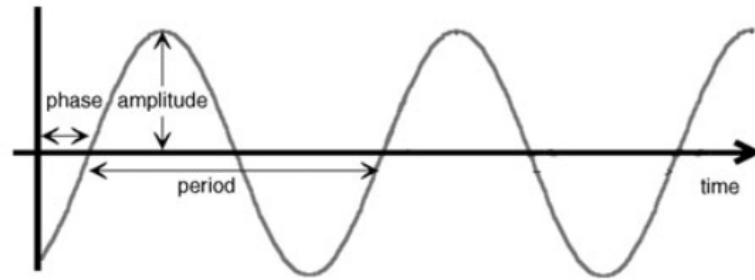


Figura 7: Representação dos componentes de uma oscilação ao longo do tempo. A fase representa a distância de um ponto da onda de um referência, no caso o eixo y (BUZSAKI, 2006).

Em um sincronismo de fase perfeito, a diferença entre as fases de dois sinais é igual a zero, indicando que os pontos referenciais de ambos coincidem no tempo em todos os ciclos (Figura 8), ocorrendo de forma absolutamente síncrona. Porém, nas análises de sincronismo de sinais eletrofisiológicos, geralmente os casos estudados são os que a fase entre os dois sinais se mantém constante dentro de uma janela temporal específica (BUZSAKI, 2006; VARELA *et al.*, 2001). Ou seja, mesmo que não sejam coincidentes no tempo, a distância temporal entre eles se mantêm a mesma, o que indica a existência de uma interação entre os osciladores geradores de cada sinal (BUZSAKI, 2006; VARELA *et al.*, 2001). Esse período de tempo de fase constante é denominado acoplamento de fase (do inglês, *phase-locking*) e possui relação com o acoplamento dinâmico entre circuitos neurais responsáveis pela geração de cada uma das oscilações.

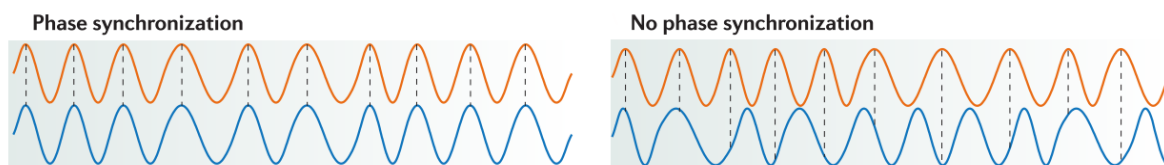


Figura 8: Representação de sinais com e sem sincronismo de fase. Na imagem à esquerda, temos dois sinais apresentando sincronismo perfeito de fase. em todas as amostragens ao longo do tempo, os picos das duas ondas coincidem. Já na figura à direita, temos que os picos de cada uma não estão alinhados ao longo do tempo, o que indica a ausência de sincronismo.

Em momentos cognitivos e comportamentos em geral, se faz necessária a integração entre agrupamentos neuronais que comumente se encontram em regiões distantes do encéfalo e o acoplamento da fase de atividade rítmica entre esses grupos parece ser um excelente marcador deste processo. Isso pois a fase de

oscilação define o grau de excitabilidade dos neurônios, criando janelas específicas temporais em que a informação pode ser mais facilmente transmitida entre eles (FELL; AXMACHER, 2011; FRÖHLICH; MCCORMICK, 2010), uma forma de multiplexação temporal de canais comuns de transmissão de uma área para outra. Esta multiplexação temporal poderia recrutar circuitos locais específicos e distintos de uma área alvo, utilizando um mesmo canal físico de comunicação oriundo das assembleias neurais de uma região de origem.

Um exemplo de integração de larga-escala via sincronismo de fase pode ser visto no trabalho de Roelfsema e colaboradores de 1997 sobre integração visual e motora. O grupo observou a atividade entre áreas do córtex visual com parietal e entre parietal e córtex motor em uma atividade de reconhecimento visual utilizando gatos. Durante a tarefa, foi encontrada uma relação de tempo entre o sinal de uma área e outra de aproximadamente 0s (ou 0 lag), indicando sincronismo de fase perfeito. Esses resultados parecem refletir uma relação funcional entre as áreas corticais, com acoplamento bidirecional entre osciladores, necessárias para a correta execução do protocolo comportamental (ROELFSEMA *et al.*, 1997).

Existem fortes evidências da correlação entre o sincronismo de agrupamentos neuronais e a emergência de atividades cognitivas. Um exemplo dessa correlação foi apontada no trabalho de Pena e colaboradores em 2017. Utilizando uma tarefa de odor espacial, foi demonstrado a ocorrência de acoplamento da fase de gamma no bulbo olfatório com a amplitude de theta no hipocampo dorsal somente durante a exploração dos odores apresentados.

Se esse mecanismo apresenta um papel tão proeminente, seria esperado que a ocorrência de disfunções nesse processo causasse de anormalidades na função cerebral e isso é sugerido para doenças como a epilepsia. Ou seja, um acoplamento anormal e exacerbado poderia criar conectomas funcionais indevidos e pouquíssimo específicos, resultando em respostas comportamentais sem nenhuma vantagem fisiológica.

1.3. EPILEPSIA COMO UMA DOENÇA DE SISTEMAS DINÂMICOS

O reconhecimento da importância de incluir processos dinâmicos nos estudos em fisiologia cerebral também ocorreu nas pesquisas das suas patologias. A mudança de uma compreensão baseada primariamente na anatomia para outra que engloba as complexidades de um sistema dinâmico possibilita um melhor entendimento de algumas doenças, entre elas a epilepsia (BERTRAM, 2013; GLASS, 2015; MEDEIROS, D. DE C.; MORAES, 2014)

A epilepsia é um distúrbio crônico caracterizado por uma predisposição à ocorrência de crises epiléticas recorrentes e imprevisíveis. As crises são resultantes de um excesso de excitabilidade e sincronismo e, durante sua ocorrência, funções normais do cérebro são interrompidas, podendo resultar em consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (FISHER *et al.*, 2005). Apesar de ser uma desordem amplamente estudada e com registros tão antigos quanto a história humana, existem muitas lacunas no entendimento de como a mesma maquinaria celular utilizada para as funções fisiológicas rapidamente transita desse estado para a crise (RICHARDSON, M. P., 2012).

1.3.1 Estado interictal e ictogênese

A atividade de um cérebro epilético entre crises aparenta funcionar da mesma forma que um não epilético, porém apresenta peculiaridades que o torna distinto de um órgão saudável (DE CURTIS; AVANZINI, 2001)

Durante a epileptogênese, o processo de tornar o sistema capaz de gerar crises espontâneas e recorrentes, ocorrem alterações moleculares, estruturais e funcionais nos tecidos acometidos. Tais alterações são causadas por problemas genéticos no caso das epilepsias hereditárias ou insultos e traumas cerebrais nas epilepsias adquiridas (PITKÄNEN *et al.*, 2007). O somatório dessas alterações gera padrões de atividade distintos de um indivíduo saudável, mesmo quando as crises não estão acontecendo, como a existência de disparos patológicos denominados disparos interictais. Nas epilepsias focais, como as de lobo temporal, esses disparos anormais são comumente divididas em *spikes/sharp waves* e as oscilações de alta

frequência (do inglês *high frequency oscillations* - HFO) (DE CURTIS; AVANZINI, 2001)

As HFO são oscilações com frequências superiores à 100 Hz (JEFFERYS *et al.*, 2012). Fisiologicamente, oscilações com frequências entre 100-250 Hz são encontradas no hipocampo e são denominadas *ripples* (CHROBAK; BUZSÁKI, 1996). Porém, elas também são vistas em cérebros epilépticos, tanto em pacientes quanto em modelos animais (BRAGIN *et al.*, 1999). Diferenças entre as HFO fisiológicas das patológicas foram observadas em modelos animais utilizando ácido caínico, um agonista glutamatérgico utilizado em modelos agudos e crônicos de epilepsia. Frequências entre 250-500 Hz foram encontradas no giro denteado de animais que receberam injeção intrahipocampal do ácido, sendo as frequências mais altas registradas nesse local são de 100 Hz, em cérebros não epilépticos (BRAGIN *et al.*, 1995). Apesar da sua relação com o local gerador de crises nas epilepsias de lobo temporal, a ocorrência de HFO não fornece muitas informações sobre a ictogênese (DÜMPELMANN; JACOBS; SCHULZE-BONHAGE, 2015).

Os *spikes* são disparos de amplitudes maiores que 50 μ V que geralmente são seguidos por uma onda lenta de duração de centenas de milissegundos (Figura 9) (DE CURTIS; AVANZINI, 2001). Experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que esse tipo de disparo apresenta grande similaridade com disparos que ocorrem durante a crise, o que indica que ambos podem possuir mecanismos celulares comuns (AVOLI; DE CURTIS; KÖHLING, 2013).

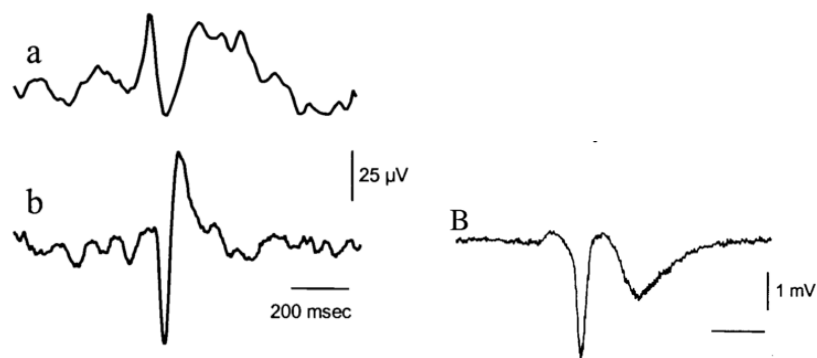


Figura 9: Disparos interictais registrados por EEG de escalpo em pacientes. a. disparos interictais registrados por EEG de escalpo em um paciente com epilepsia focal lesional e b. de um paciente com epilepsia focal idipática. B) disparo registrado extracelularmente em um modelo experimental *in vitro* de epileptogênese focal (DE CURTIS; AVANZINI, 2001).

Apesar da similaridade entre os disparos interictais e ictais, ainda não se sabe exatamente a relação entre eles. Porém, em um trabalho de 2013, Avoli e colaboradores discutem que tipos de disparos interictais diferentes podem atuar de forma antagônica, alguns agindo de forma a prevenir sua ocorrência enquanto outros promovem a sincronização necessária para a ictogênese (AVOLI; DE CURTIS; KÖHLING, 2013).

A dificuldade em se caracterizar essa fase de transição se encontra no fato de a mesma maquinaria neuronal e molecular utilizada para as funções fisiológicas durante o período interictal ser capaz de gerar crises caracterizadas por um alto sincronismo e excitabilidade. Assim, sugere-se que o conjunto de sintomas da epilepsia emerge de problemas nas propriedades dinâmicas cerebrais (RICHARDSON, M. P., 2012).

Um dos primeiros grupos de pesquisa a sugerir a observação das dinâmicas de *networks* nos estudos de epilepsia é o do professor Lopes da Silva. Em uma revisão de 1994, uma coletânea de dados experimentais e de modelagem foram utilizados para evidenciar que redes neuronais locais apresentam dinâmicas de funcionamento semelhante às de sistemas dinâmicos não-lineares. Isso significa que o comportamento geral da rede seria definido por parâmetros de controle, entre eles estaria o balanço entre processos excitatórios e inibitórios, representados por um sistema com múltiplos atratores. Cérebros epiléticos apresentam um desbalanço no equilíbrio dos processos de excitação e inibição, fazendo com que o estado basal se encontre mais próximo do ponto de bifurcação entre o estado fisiológico para o ictal do que um cérebro saudável (LOPES DA SILVA, F. H.; PIJN; WADMAN, 1994).

Em um trabalho posterior, o grupo discute possíveis rotas para o surgimento de uma desordem paroximal, definidas por disparos sincrônicos desencadeados por mudanças nos parâmetros de controle do sistema. Utilizando modelos computacionais, são indicados três possíveis rotas de transição de um estado interictal para o ictal. No caso das epilepsias límbicas, que são o foco do nosso trabalho, modificações celulares e moleculares são responsáveis pelas alterações dos parâmetros de controle. De acordo com o modelo, a distância encontrada entre os osciladores interictal e ictal geralmente é grande o suficiente para que a crise não

ocorra durante todo o tempo, porém perturbações são capazes de gerar essa transição (LOPES DA SILVA, FERNANDO H. *et al.*, 2003).

Como observar esse processo de transição? Esse foi um desafio nos estudos em epilepsia durante anos, especialmente como forma de intervenção das crises. Sendo possível identificar a priori quando o ictus irá iniciar, seria possível desenvolver formas de evitar seu estabelecimento. Muitos trabalhos foram desenvolvidos com esse intuito, porém ainda não existe um padrão ouro amplamente utilizado (MORMANN *et al.*, 2007; STALEY, 2015). Uma possível solução para esse problema seria através da realização de uma sondagem ativa das redes envolvidas na ictogênese.

1.4. SONDAGEM DE SISTEMAS DINÂMICOS

Em 2005, o grupo de pesquisa de Lopes da Silva sugere o uso de estimulação elétrica profunda, do inglês *deep brain stimulation* (DBS), como ferramenta na predição de crises ao demonstrar estimativas da probabilidade de transição entre o estado interictal para ictal (KALITZIN *et al.*, 2005). Diferentemente de uma análise passiva da atividade neuronal, ao realizar a estimulação teria-se a ativação induzida de um agrupamento neuronal e as mudanças decorrentes na dinâmica de estados do sistema devido ao insulto. Desta forma, por meio desta manobra, poderíamos identificar respostas evocadas associadas ao desbalanço entre excitação e inibição (LOPES DA SILVA, FERNANDO H. *et al.*, 2003).

A DBS consiste no implante cirúrgico de eletrodos no encéfalo, utilizados para a entrega de uma corrente elétrica diretamente à área de interesse. Para isso, os eletrodos são conectados ao um gerador de pulsos programáveis, de acordo com o objetivo da estimulação (LOZANO; LIPSMAN, 2013). A técnica foi e é amplamente utilizada em pesquisas voltadas à terapia de distúrbios neuropsiquiátricos como esquizofrenia (HEATH; MONROE; MICKLE, 1955); (GAULT *et al.*, 2018), dor crônica (RICHARDSON, D. E.; AKIL, 1977a, b) e parkinson (BENABID *et al.*, 1987; HARTMANN *et al.*, 2019).

A premissa da sondagem ativa consiste no fato de ser difícil perceber essas modificações analisando o eletroencefalograma de forma passiva. Ao estimular o

cérebro, teríamos a atividade da área para aquele estímulo, sendo mais perceptível modificações do estado basal observando-se as variações nos padrões evocados (SUFFCZYNSKI *et al.*, 2008). Porém, algumas críticas foram feitas ao trabalho de Kalitzin justamente pela estimulação estar causando uma perturbação a um sistema já alterado, como é visto nas epilepsias.

Em 2006, o Dr. Ivan Osório enviou uma carta ao editor, levantando seus questionamentos sobre o método utilizado nas sondagens feitas por Kalitzin e seus colaboradores. Entre as ressalvas feitas estava o questionamento se o estímulo aplicado não estaria modificando a atividade neuronal local, por facilitação ou inibição, sendo visualmente imperceptível, mas poderiam modificar o limiar das crises (OSORIO; BHAVARAJU; FREI, 2006). No mesmo ano, a carta foi respondida pelo grupo de pesquisa, afirmando que, apesar de não ser possível identificar se existe ou não a indução de facilitação/inibição, a estimulação estava presente em momentos em que os pacientes não apresentavam crises e alguns não tiveram nenhuma crise durante o protocolo e por isso não foram incluídos no artigo (KALITZIN *et al.*, 2006).

Outros trabalhos foram publicados em anos seguintes, utilizando variações do mesmo protocolo para a sondagem de circuitos ictais (FREESTONE *et al.*, 2011; VALENTÍN *et al.*, 2005). Porém, o problema apontado por Osorio ainda estava presente. Como realizar a sondagem evitando as interferências causadas por estimular diretamente a área alvo?

Um outro problema da sondagem *in locu* seria na utilização como diagnóstico na clínica. Existem casos clínicos em que a zona epileptogênica não é facilmente identificada, tornando difícil e imprecisa a escolha do local de implante dos eletrodos para a DBS. Sendo assim, como obter informações do local de início das crises com precisão e sem aumentar a probabilidade de ocorrência de uma crise?

1.4.1 DBS pareado com a crise para protocolos de sondagem

Uma solução alternativa para os problemas de sondagem foi sugerida pelo Núcleo de Neurociências da UFMG utilizando os próprios mecanismos geradores da condição epiléptica.

As síndromes epilépticas possuem como característica comum a predisposição dos circuitos envolvidos na ictogênese a gerar os padrões aumentados de excitabilidade e sincronismo. Além disso, a repetição de eventos ictais modificam a severidade e incidência de outros desses eventos, aumentando a frequência de crises (MAIA *et al.*, 2017). É possível que essas modificações nos circuitos geradores sejam em decorrência de processos plásticos e que cada ativação da rede acarrete uma maior facilidade de recrutamento ictal (SCHARFMAN, 2002).

O mecanismos desses processos plásticos podem ser explicados de acordo com os postulados de Donald Hebb, esses descrevem a associação entre os disparos de neurônios pré e pós-sinápticos como agentes de modificação das suas conexões (HEBB, 2002). Estudos posteriores *in vitro* demonstraram a importância temporal do que foi denominado *Spike Timing-Dependent Plasticity* (STDP), onde a janela específica entre os disparos sinápticos determina a ocorrência de reforço ou enfraquecimento das conexões (BI; POO, 1998). Foi evidenciado que se um neurônio pós-sináptico B dispara em um espaço de tempo curto depois de receber um *input* do neurônio pré-sináptico A, a conexão entre eles é fortalecida. Entretanto, se B dispara antes do *input* de A, a conexão é enfraquecida. Outros tipos de STDP foram descritos e o elucidado por Bi e Poo foi denominado Hebbian STDP, por estar de acordo com o postulado Hebbiano. Além da importância temporal, outros fatores foram descobertos como essenciais na plasticidade, como localização dendrítica, convergência de inputs e tempo relativo entre as sequências de disparo (FELDMAN, 2012). Efeitos de circuito e comportamentais consistentes com STDP foram demonstrados em estudos *in vivo*, através de protocolos de pareamento de estímulos sensoriais e elétrico que resultam em mudanças nas conexões (FELDMAN, 2012). Essas modificações podem ser avaliadas através de análises do potencial de campo evocado por DBS.

Em 2014, o grupo de pesquisa do Núcleo de Neurociências da UFMG demonstrou que ao realizar um estímulo elétrico durante a crise, processos plásticos similares aos exemplificados aumentam a força de conexão entre o local de estímulo e a zona epileptogênica. A estimulação foi aplicada na amígdala, área que diversos trabalhos indicam possuir influência nos processos plásticos hipocampais,

além de apresentar conexões recíprocas com o hipocampo (MEDEIROS, D. C. *et al.*, 2014). Posteriormente, utilizando um modelo crônico de crises com pentilenotetrazol, foi observado que o pareamento do estímulo com a crise pode ser utilizado como ferramenta de predição das crises futuras (DE CASTRO MEDEIROS *et al.*, 2018). Assim, ao realizar a estimulação em um circuito do complexo amigdalóide, este se incorporaria ao local da crise por processos de STDP, e a resposta avaliada nos eletrodos de registro poderia oferecer informações sobre a atividade ictogênica, evitando os problemas encontrados tanto na clínica quanto na modelagem experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Partindo da premissa de que durante a ictogênese existe a ocorrência de um estado hiperexcitado local, nossa hipótese é de que o espalhamento dessa atividade para outras áreas do cérebro ocorre devido ao acoplamento anormal de osciladores e eventos sincronizantes característicos da doença e que disparos interictais agiriam como facilitadores desse processo.

Assim, o objetivo central do presente trabalho é investigar o processo de conexão temporal entre o hipocampo (HIP), foco induzido dos eventos ictais, com o complexo basolateral da amígdala (BLA) ipsilateral e HIP/BLA contralaterais. No intuito de mimetizar o efeito de disparos interictais como promotores de sincronismo, utilizamos estímulos elétricos na BLA ipsilateral pareados com a crise.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de um estímulo periódico realizado no núcleo basolateral do complexo amigdalóide na atividade fisiológica cerebral.
- Investigar se o estímulo é capaz de modificar os padrões de comunicação entre áreas durante o período basal.
- Gerar atividade ictal local através da injeção de ácido caínico intra hipocampal unilateral na porção CA3 dorsal.
- Avaliar a influência de um estímulo periódico realizado no núcleo basolateral do complexo amigdalóide durante a crise na atividade ictal.
- Investigar se o estímulo pareado é capaz de modificar os padrões de comunicação entre áreas durante a atividade ictal.

**CAPÍTULO 1 - SOLUÇÕES OPEN-SOURCE PARA REGISTROS
ELETROENCEFALOGRÁFICOS**

Estudos em eletrofisiologia são amplamente realizados desde o descobrimento da bioeletricidade em 1780 (VERKHRATSKY; PARPURA, 2014). Do início da década de 90 até o presente, são publicados mais de 2.000 artigos por ano com essa temática (dados via PubMed - NCBI). Juntamente com o interesse nessa área de estudo, diversos avanços tecnológicos transcorreram e uma gama de novas metodologias possibilitam a avaliação de atividade elétrica em escala micro, meso e macro (VERKHRATSKY; PARPURA, 2014).

De forma simplificada, para o registro de atividade encefalográfica de campo é necessário um sensor capaz de captar o potencial elétrico, amplificador, filtros para selecionar somente as frequências de interesse, digitalizador do sinal e um equipamento que permita a visualização e o armazenamento dos dados. Existem diversas empresas que produzem os equipamentos necessário, porém os preços são elevados e tem-se pouca flexibilidade na modificação e controle de parâmetros.

Esses problemas são presentes em diversos campos de estudo, o que aumenta a busca por soluções *open-source* e torna cada vez mais comum a publicação de artigos de métodos com informações completas que oferecem mais independência para os grupos de pesquisa, além de democratizar o conhecimento (DENNIS, 2004).

Para a execução dos experimentos realizados neste trabalho utilizamos soluções *open-source* associado à diversos aparatos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa. Todos os procedimentos e protocolos serão descritos nos próximos tópicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver eletrodos de registro com múltiplos pontos de amostragem por área de interesse.
- Desenvolver eletrodos de estimulação bipolares.
- Construir cânulas guia para a injeção intrahipocampal de ácido caínico.
- Desenvolver uma solução para a inserção simultânea de todos os eletrodos.
- Implementar um sistema de registro de 16 canais em animais acordados e em livre movimento.
- Implementar um sistema de estimulação elétrica profunda com entrega de pulsos bipolares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CONFECÇÃO DOS IMPLANTES

4.1.1. Eletrodos de Estimulação

Os eletrodos de estimulação utilizados neste trabalho foram desenvolvidos manualmente utilizando fio de aço inoxidável revestido por teflon (Modelo: 791400, A-M Systems®) (Figura 10 - esquerda). Para a confecção, utilizou-se um fragmento do fio dobrado ao meio, preso por uma das extremidades e tracionado utilizando um peso (Figura 10 - centro). Ao girar o peso, os fios se entrecruzam, resultando em um par de fios trançados com uma distância de 0,5mm entre os nós (Figura 10 - direita superior). Posteriormente os pares trançados foram cortados em segmentos de aproximadamente 4 cm, permitindo um comprimento suficiente para a solda dos conectores que foram utilizados para realizar os estímulos (Figura 10 - direita inferior). As pontas a serem soldadas foram descascadas, retirando o teflon que encobre a área.



Figura 10: Material utilizado e detalhes da confecção do eletrodos de estímulo. Esquerda: Modelo de fio de aço inoxidável. Centro: Fio dobrado ao meio e tracionado para trançar. Direita: Resultado final distâncias de 0,5mm entre os nós.

4.1.2. Cânula Guia

As cânulas utilizadas para a injeção de ácido cáínico intrahipocampal foram feitas a partir de agulhas 24G cortadas com tamanho de 1,5cm a partir do bisel. A

ponta foi lixada para evitar que o animal se machuque ao realizar a auto limpeza. Um pequeno filamento de aço foi anexado perpendicularmente à 0,5cm do bisel para aumentar a aderência da cânula ao acrílico utilizado para fechar o implante no crânio do animal, evitando assim que ela se mova. (Figura 11)

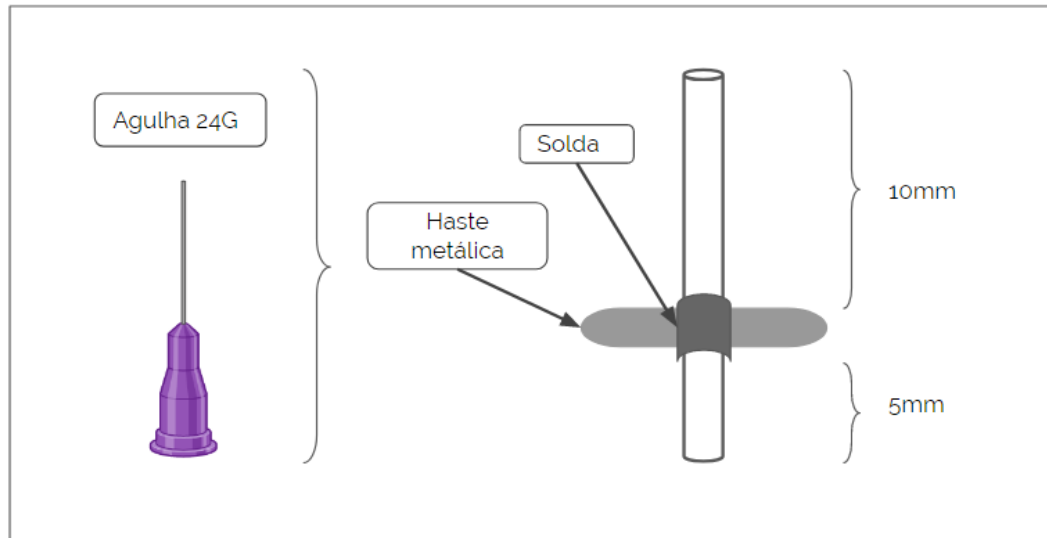


Figura 11: Imagem esquemática da disposição dos componentes para a confecção da cânula guia de injeção.

4.1.3. Eletrodos de Registro

Para a confecção dos conjuntos de eletrodos para registro utilizamos microfios de tungstênio de 50 μ m de espessura. A escolha de fios desse material ao invés dos de aço comumente utilizados foi devido às suas propriedades. Os fios de tungstênio são firmes porém semiflexíveis, fazendo com que mesmo em uma espessura tão diminuta, não se quebrem (VALLBO, 2018). Além disso, garantem uma menor lesão ao tecido cerebral.

Cada área alvo de registro recebeu um conjunto de 4 fios agrupados de forma helicoidal com distâncias entre as extremidades de 100 μ m para os localizados no núcleo basolateral do complexo amigdalóide ou 400 μ m nos implantados em CA3 hipocampal. Para garantir as distâncias com a precisão necessária, desenvolvemos um molde a partir de micro capilares de sílica (modelo: TSP075150 75-3,150-6, Polymicro Technologies®).

Na elaboração dos moldes, cortamos os microcapilares em comprimentos de aproximadamente 4 milímetros e os alinhamos em conjuntos de 16 em uma

superfície quadriculada de 0,1mm. Após o posicionamento ordenado, os fragmentos foram colados com epoxy (Devcon®), mantendo as duas extremidades livres (Figura 12 - A). Uma das extremidades foi então cortada, mantendo uma distância de 100µm entre um microtubo e o imediatamente seguinte, formando um padrão em escada (Figura 12 - B e C).

Posteriormente, os fios foram inseridos individualmente em cada microcapilar do molde. O posicionamento foi de forma sequencial nos eletrodos utilizados no complexo amigdalóide (resultando em uma distância de 100µm entre as pontas dos fios (Figura 12 - C) ou em um a cada 4 para os eletrodos utilizados no hipocampo (obtendo uma distância de 400µm entre os fios) (Figura 12 - B). Após a inserção de todos os fios, um microcapilar de diâmetro interno maior (modelo: TSP 200350, Polymicro Technologies®) foi inserido na porção terminal alinhada, mantendo todos os filamentos unidos. O conjunto de fios foi retirado do molde, ainda dentro do microcapilar externo para garantir o formato helicoidal, colado com epoxy (Devcon®) e então retirado do microcapilar.

Os eletrodos de registro destinados ao núcleo basolateral do complexo amigdalóide direito foram então colados ao de estímulo utilizando epoxy (Devcon®) e os do hipocampo direito colados à cânula guia.

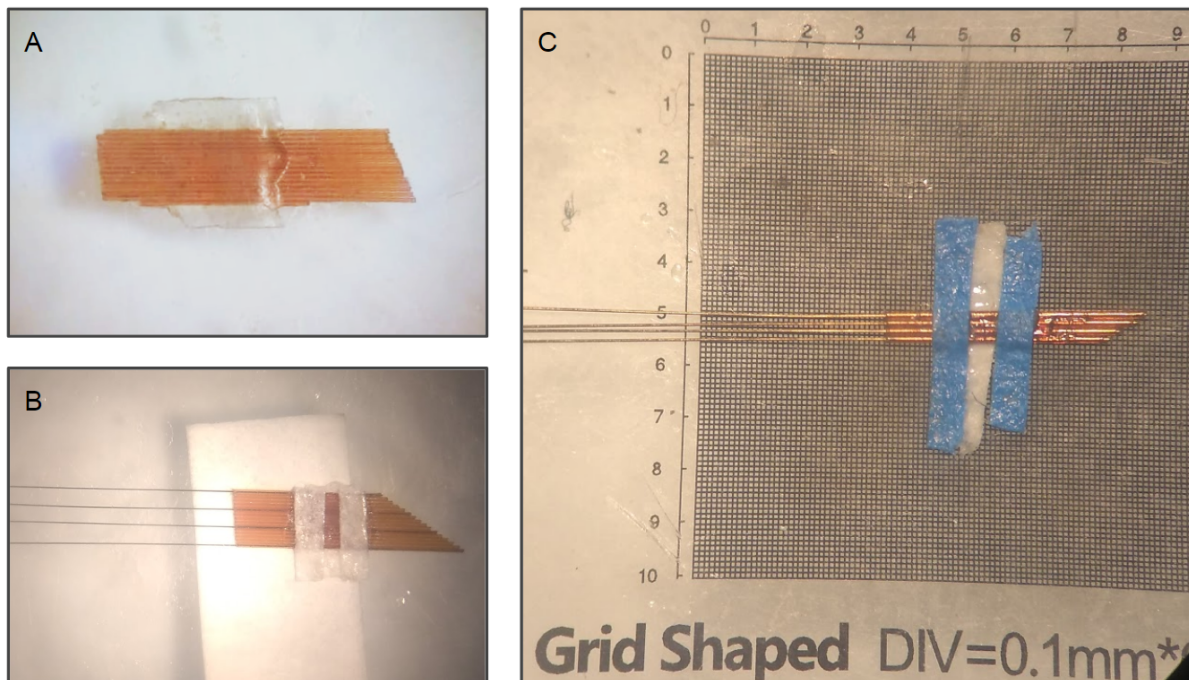


Figura 12: Molde para a confecção dos eletrodos de registro, observados em lupa. Esquerda superior: microcapilares de sílica utilizados para o molde antes de uma das extremidades ser cortada

com distâncias de 100µm. Esquerda inferior: Confeção dos eletrodos utilizados no hipocampo. Note que os fios estão inseridos a cada 4 microtubos, resultando em uma distância de 400µm entre eles. Direita: Confeção dos eletrodos utilizados no complexo amigdalóide.

4.1.4. Matriz de eletrodos de estimulação e estimulação

Foi criada uma matriz para a introdução dos eletrodos de forma mais rápida e precisa, garantindo um menor tempo intra operatório. Para isso, foi utilizada uma placa de fibra de vidro (1,4x1,2x0,1cm) com orifícios correspondentes às coordenadas antero-posterior e médio-lateral das áreas de interesse (amígdala basolateral: AP -2,52, ML ±4,8 e CA3 dorsal do hipocampo: AP -5,3, ML ±4,3, à partir do bregma) (PAXINOS; WATSON, 2013) (Figura 13).

Os conjuntos de eletrodos de cada área foram introduzidos nos orifícios de acordo com os valores de dorso-ventral da área de interesse (+3mm, correspondentes ao somatório da espessura da base e espessura e distância do crânio) utilizando um estereotático para ratos (Stoelting Co.) (Figura 13). Os eletrodos foram fixados com epoxy (Devcon®) à base, juntamente com uma placa de circuito impresso com orifícios para o contato com os fios de tungstênio. Após a fixação de todas as partes, os fios foram soldados aos seus respectivos locais na placa, de acordo com um mapeamento prévio. Somente a cânula para a injeção de ácido caínico (CA3) e os eletrodos dessa área não foram anexados à placa. Após diversos testes, foi padronizado a inserção de ambos independentemente e a solda dos fios durante a cirurgia.

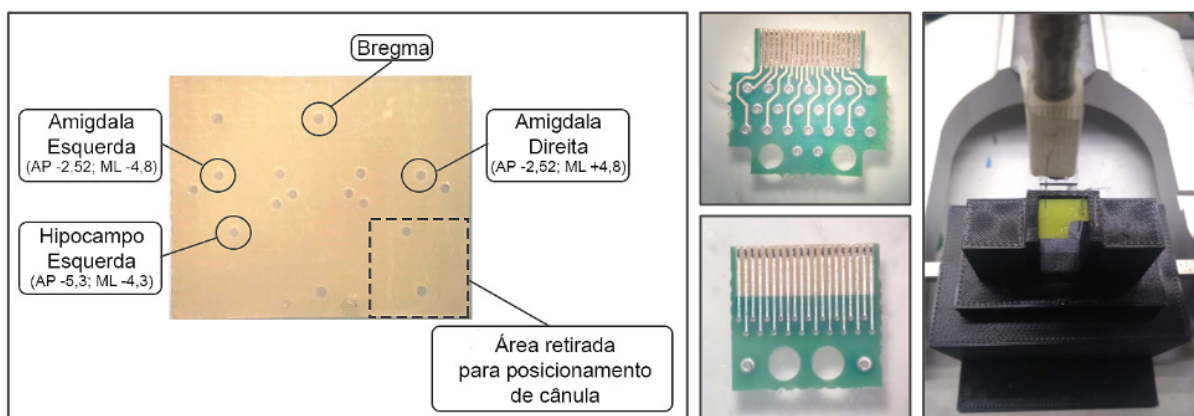


Figura 13: Material utilizado para a confecção da matriz de eletrodos. Esquerda: Esquema de localização da inserção dos eletrodos das áreas alvo. Centro superior: Placa de circuito impresso utilizado nos primeiros animais do trabalho. Posteriormente o padrão de utilização foi modificado (centro inferior) devido ao seu menor tamanho e mapa de canais mais simples. Direita: Base feita em impressora 3D para a fixação dos eletrodos na placa utilizando um estereotático.

4.2 EQUIPAMENTO DE AQUISIÇÃO DE SINAIS E ESTIMULAÇÃO

4.2.1. Equipamento de Registro

Para realizar os registros eletrofisiológicos se faz necessário um aparato composto por um amplificadores, filtros, digitalizadores de sinal e o sistema de registro. Devido aos elevados preços de sistemas comerciais, optamos por utilizar equipamentos e ferramentas open-source que, além de reduzir significativamente os custos, permitem uma maior liberdade de configurações.

Utilizamos como amplificador e digitalizador de sinais o chip RHD2132 (*Intan Technologies* ®) e o sistema de registro Open Ephys ®. O aparato completo possui um conector ffc de 20 contatos, utilizado para conectar o circuito impresso utilizado na matriz de eletrodos (seção 4.1.4) e transmitir as informações eletrofisiológicas para o Intan. A saída do sinal digitalizado e amplificado do chip e a entrada no sistema Open Ephys foi feita por cabeamento SPI (SHD 2000 SPI - *Intan Technologies* ®). Para a visualização em tempo real dos registros utilizamos a interface GUI do próprio sistema de aquisição (Figura 14).

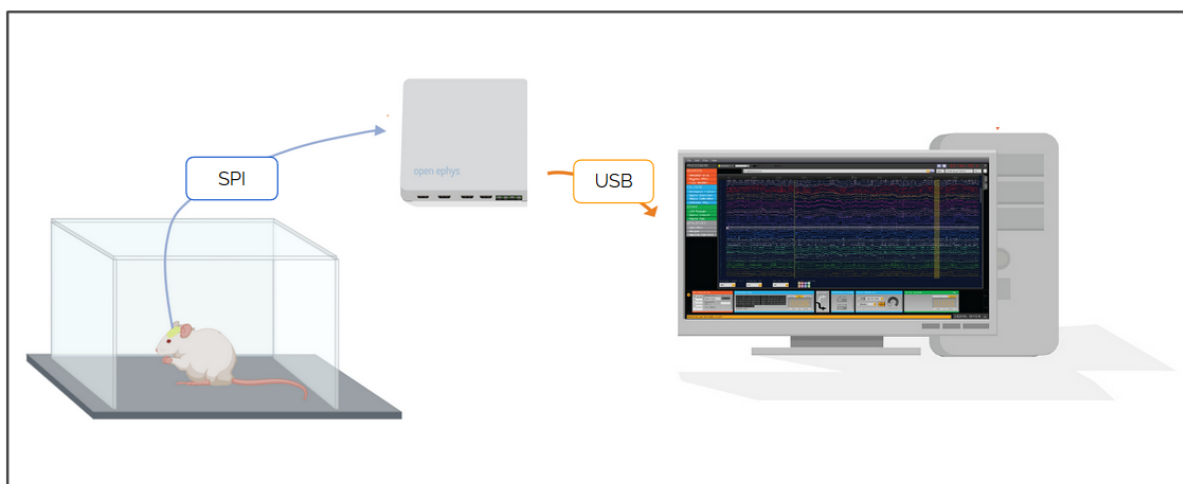


Figura 14: Representação esquemática do sistema de registro.

4.2.2. Sistema de Estimulação Elétrica

Desenvolvemos em nosso laboratório um sistema eletrônico utilizando Arduino para a geração de padrões de estimulação programáveis (Figura 15). O circuito utiliza somente as portas digitais 9, 10, 11 e 12 do Arduino. A porta 9 é responsável pela saída de uma sinalização para o registro eletroencefalográfico,

marcando o momento exato do estímulo. A porta 10 ativa um led quando um sinal é disparado pelo sistema, permitindo que o experimentador acompanhe a saída dos pulsos. Já as portas 11 e 12 estão associadas à um desacoplador óptico e um varistor, permitindo assim a saída de dois pulsos quadráticos, um com sinal positivo e outro negativo, com o delay entre eles programável.

Os sinais gerados por esse dispositivo foram direcionados para um gerador de corrente elétrica que resulta em pulsos quadrados bifásicos com amplitude e comprimento de onda programáveis.

Foi construído também uma caixa em impressora 3D para a acomodação do circuito, além de uma interface para o controle da voltagem de saída do sinal e o LED para a informação visual dos *outputs*.

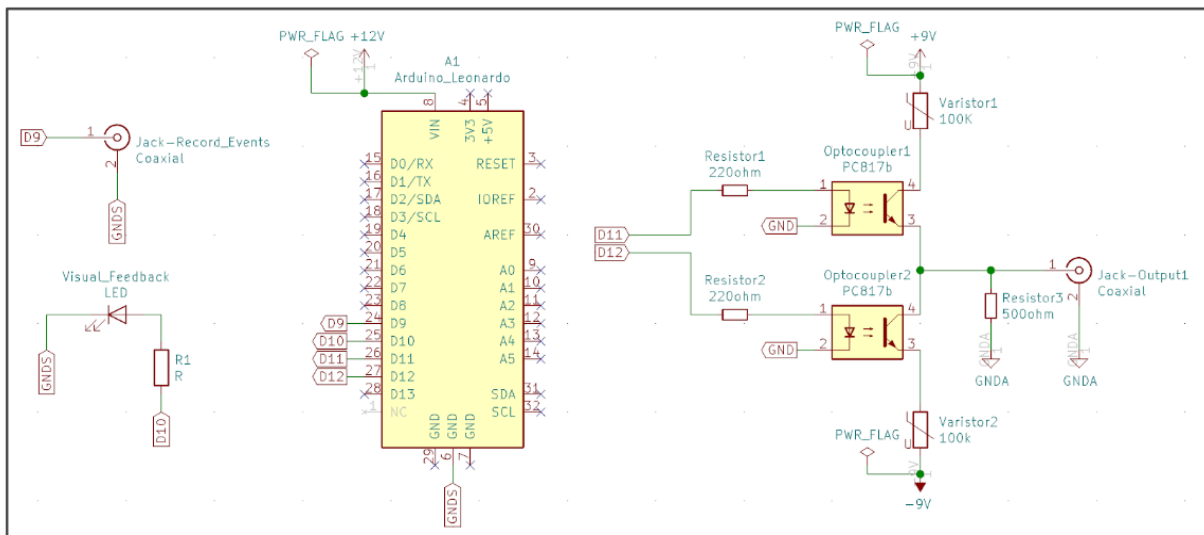


Figura 15: Circuito utilizado para a programação dos pulsos de estímulo. O circuito é composto por pelo Arduino, desacopladores óticos e um potenciômetro para a modulação da saída do sinal (0 - 9V) (GitHub - fgmourao).

5. RESULTADOS

5.1. ELETRODOS DE REGISTRO E ESTIMULAÇÃO

Todos os eletrodos utilizados no presente trabalho foram produzidos de acordo com os protocolos descritos na metodologia (Figura 16). Obtivemos sensores de alta qualidade capazes de registrar os potenciais elétricos extracelulares nas áreas amostrada e condutores eficientes na entrega dos pulsos elétricos na região de interesse.

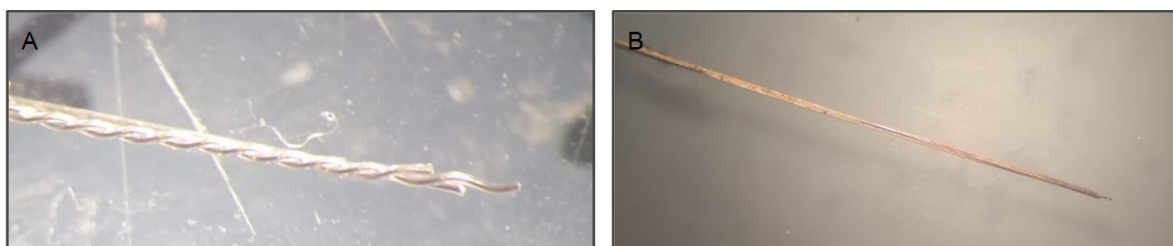


Figura 16: Eletrodos desenvolvidos para a execução dos protocolos. A: Eletrodo de estimulação. B: Eletrodo de registro.

5.2. MATRIZ DE ELETRODOS DE REGISTRO E ESTIMULAÇÃO

A utilização da matriz de eletrodos ao invés da inserção individual, diferentemente do esperado, não diminuiu significativamente o tempo intra operatório (t test, $p=0,3929$; sem matriz: $116,8 \pm 7,379$ N=11; com matriz: $108,3 \pm 5,102$ N=33) (Figura 17).

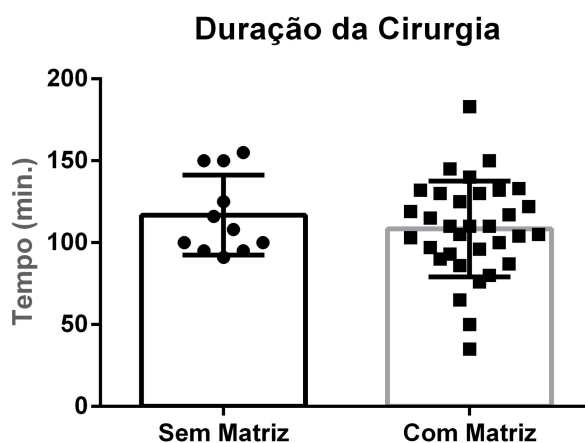


Figura 17: Duração da cirurgia estereotáxica com e sem a utilização da matriz de eletrodos. Não foi encontrada diferença significativa na duração média da operação entre os dois grupos. Dados representados por média \pm erro padrão da média.

5.3. EQUIPAMENTO DE REGISTRO

Fomos capazes de construir um aparato de registro utilizando soluções desenvolvidas no laboratório, associado à um sistema *open source* Open Ephys (Figuras 18 e 19).

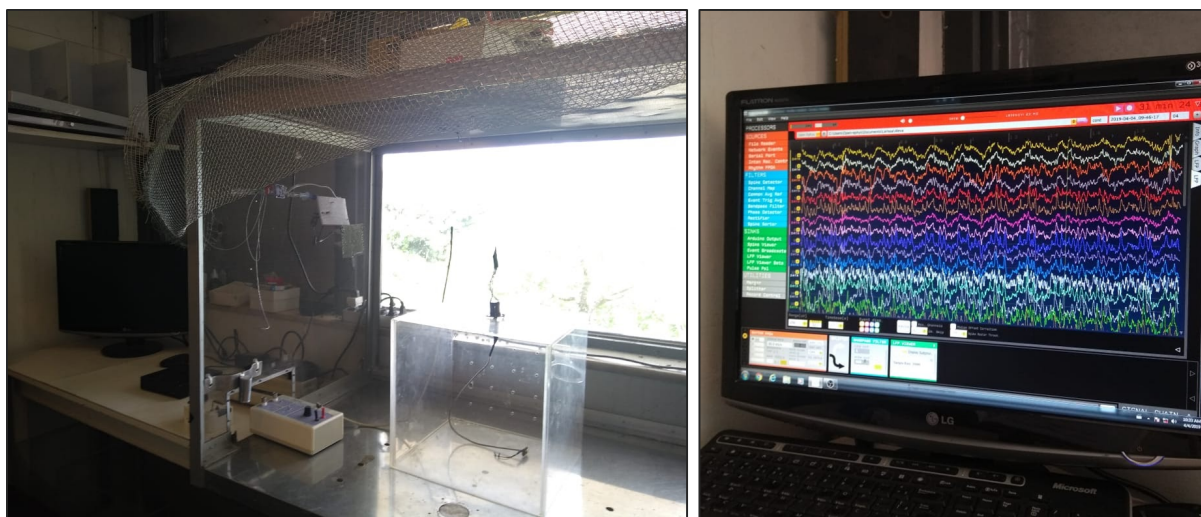


Figura 18: Equipamento utilizado para o registro encefalográfico. Visualização em tempo real de um registro encefalográfico utilizando a plataforma GUI Open Ephys®.

A base para o chip intan possibilitou o registro de 16 canais, com aderência ao *headstage* dos animais suficiente para suportar as crises. Além disso, a utilização de dois conectores ffc garante para os futuros trabalhos a oportunidade de registrar até 32 canais.

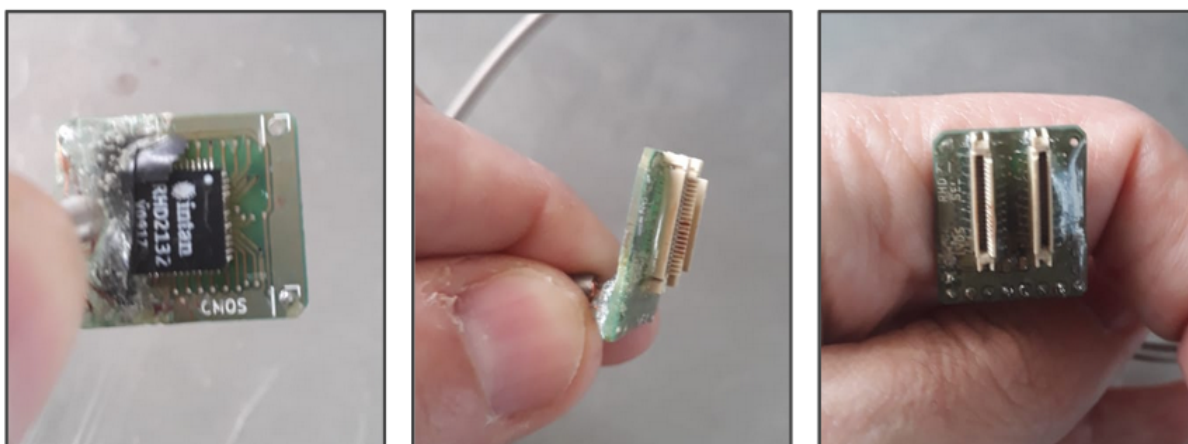


Figura 19 - Chip Intan com entrada de sinal via conector ffc.

5.4. EQUIPAMENTO PARA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

O resultado final foi o desenvolvimento de um dispositivo eficaz na programação de pulsos elétricos com interface de fácil manuseio (Figura 19).

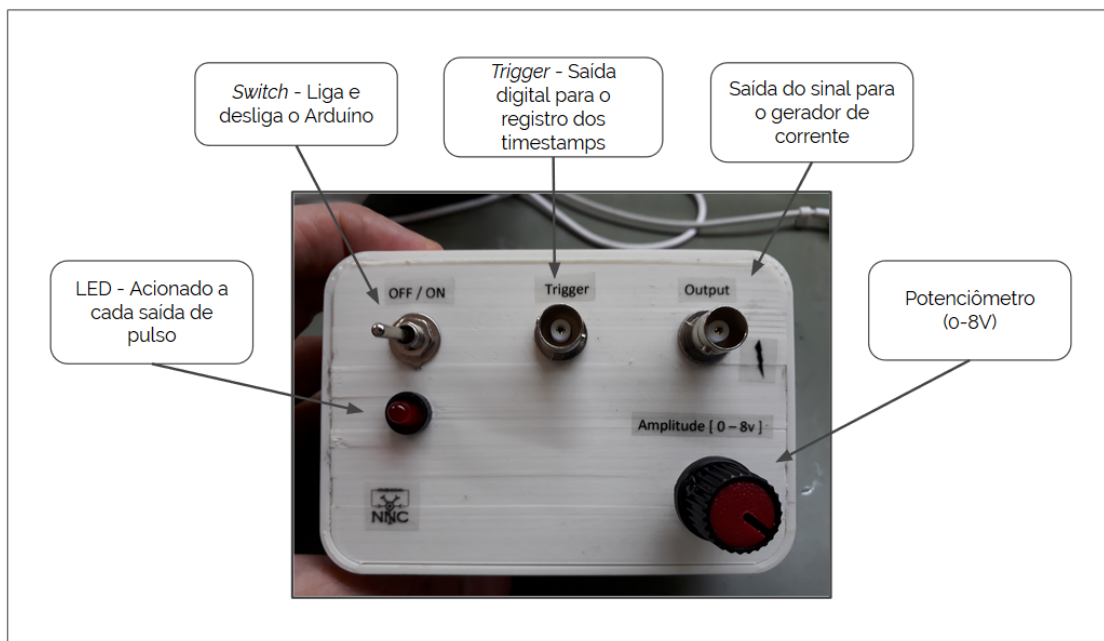


Figura 20: Equipamento desenvolvido para programar os estímulos elétricos utilizados no protocolo.

Com sua utilização, fomos capazes de gerar pulsos quadrados bifásicos com $0,1\mu\text{s}$ de largura de pulso, $0,035\mu\text{s}$ de delay entre o pulso positivo e negativo, $0,8\text{mA}$ de intensidade e uma frequência de $0,5\text{ Hz}$ (Figura 20).

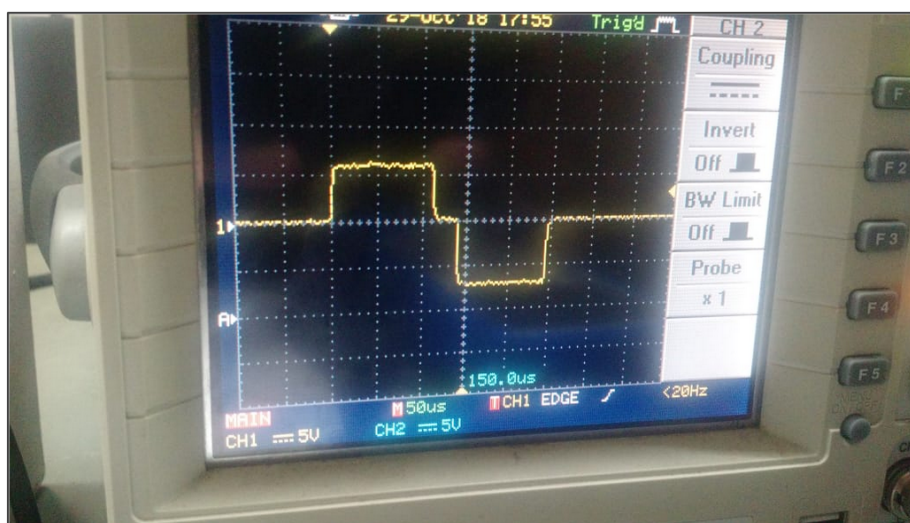


Figura 21: Pulsos quadráticos bifásicos gerados com Arduino através do estimulador.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de materiais e equipamentos necessário para técnicas em eletrofisiologia, apesar de trabalhoso, garante uma maior independência financeira para o laboratório, além de possibilitar adaptações específicas para o tipo de protocolo utilizado.

A utilização da matriz de inserção não modificou significativamente a média do tempo intra operatório, porém possibilitou uma maior ocorrência de cirurgias mais rápidas, como pode ser observado na dispersão dos dados na Figura 17. Além disso, obtivemos outras vantagens de seu uso. A primeira delas é a possibilidade de soldar os eletrodos com precisão, utilizando para isso uma lupa de mesa. Quando os inserimos individualmente na cirurgia, a solda deve ser feita durante a operação, o que dificulta a inspeção dos contatos. Outra vantagem é poder testar a impedância de cada eletrodo antes de serem implantados. Isso garante que somente as matrizes em perfeito funcionamento serão utilizadas, aumentando o sucesso dos registros.

As soluções desenvolvidas para registro e estimulação elétrica profunda cumpriram seus propósitos de aquisição de sinal de qualidade e entrega de pulsos elétricos com parâmetros bem definidos. Além disso, a redução do custo assegurou que pudéssemos desenvolver o presente trabalho, bem como a aplicação de tais soluções em projetos futuros.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISES VISUAIS DOS REGISTROS ENCEFALOGRÁFICOS
Processo subjetivo

Epilepsia é um conceito “guarda-chuva” que engloba diversas síndromes que possuem a ocorrência de crises como característica comum. As síndromes epiléticas são discriminadas de acordo com o tipo de crise (ex: tônica, clônica, ausência, etc.), idade em que os sintomas iniciam, as causas das crises, local do foco epileptogênico, além da severidade e frequência dos surtos (STAFSTROM; CARMANT, 2015). Dentre as distintas patologias, a epilepsia de lobo temporal (TLE) é a mais comum, ocorrendo em cerca de 60% dos pacientes com o distúrbio (TÉLLEZ-ZENTENO; HERNÁNDEZ-RONQUILLO, 2012).

A TLE é caracterizada por possuir o local de início das crises em estruturas do lobo temporal, geralmente associadas à ocorrência de esclerose hipocampal, uma alteração celular e molecular que pode ocasionar a emergência de crises espontâneas e recorrentes (ENGEL, J., 2001; THOM, 2014). O padrão de EEG típico encontrado em pacientes durante o *ictus* consiste em disparos rítmicos com frequência entre 5-8 Hz iniciados em uma região temporal que podem ou não se propagar para regiões adjacentes (ENGEL, J., 2001). Porém, para a compreensão dos mecanismos dessa patologia, se faz necessário o uso de modelos animais que mimetizam os padrões encontrados em pacientes e permitem manipulações experimentais.

Existem diversos modelos animais para os distintos tipos de síndromes epiléticas. Dentre os comumente utilizados, há modelos de desenvolvimento espontâneo de crises como os de ratos GEPR-9 e WAR, espécies em que foram criados ao longo de várias gerações com o objetivo de selecionar um fenótipo em que os animais apresentam crises epiléticas ao receber um estímulo auditivo específico (DECHANDT *et al.*, 2019; MERRILL *et al.*, 2007; MORAES; CHAVALI; *et al.*, 2005; MORAES; MISHRA; *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2019). Há também modelos desenvolvidos a partir da exposição do animal a estímulos químicos que mimetizam crises epiléticas, como o PTZ (pentilenotetrazol), um antagonista GABAérgico capaz de gerar crises convulsivas agudas (DE CASTRO MEDEIROS *et al.*, 2018; NEHLIG; PEREIRA DE VASCONCELOS, 1996; VILELA *et al.*, 2017) ou a pilocarpina, um agonista muscarínico que administrado de forma sistêmica induz um quadro de crises epiléticas recorrentes (DE OLIVEIRA, JASIARA CARLA *et al.*, 2014; GUIDINE *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2016).

Para a epilepsia de lobo temporal, um dos mais utilizados é o baseado na injeção de ácido caínico (KA), originalmente descrito por Ben-Ari em 1978 (BEN-ARI; LAGOWSKA, 1978). O ácido caínico (ácido 2-carboxi-4(1-metiletênil)-3-pirrolidiacético) é uma molécula análoga ao L-glutamato e possui ação agonista em receptores glutamatérgicos, sendo centenas de vezes mais potente que seu análogo em receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato (SHARMA *et al.*, 2007) e quando administrado na região CA3 hipocampal ou sistemicamente, resulta em um quadro agudo de *status epilepticus* límbico, seguido por um período silente e posteriormente a esta fase são observadas as crises espontâneas recorrentes (CAVALHEIRO; RICHE; LE GAL LA SALLE, 1982; RATTKA; BRANDT; LÖSCHER, 2013).

O receptor cainato apresenta mais alta densidade no hipocampo, principalmente na sub-região CA3, bem como amígdala, córtex entorrinal e córtex perirrinal (MILLER, L. P. *et al.*, 1990), tendo funções na transmissão sináptica. Em um nível pós-sináptico, gera parte da corrente de resposta sináptica, similar ao demais receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA. No entanto, também agem de forma pré-sináptica, regulando a liberação de neurotransmissores tanto inibitórios como excitatórios, influenciando dessa forma a excitabilidade neuronal e a transmissão de informação (CLARKE *et al.*, 1997; KAMIYA; OZAWA, 2000; RODRÍGUEZ-MORENO; HERRERAS; LERMA, 1997).

No hipocampo, os receptores cainato estão amplamente distribuídos nos botões pré e pós-sinápticos e podem regular de forma bidirecional a liberação do glutamato nas sinapses das fibras musgosas para o CA3 (RODRIGUEZ-MORENO; LOPEZ-GARCIA; LERMA, 2000). Os receptores pré-sinápticos também controlam a liberação do neurotransmissor inibitório GABA no hipocampo. Em conexões entre interneurônios e células piramidais, tal ativação inibe a liberação do GABA, reduzindo a eficiência da inibição recorrente, produzindo um estado de hiperexcitabilidade.

As vantagens de sua utilização intrahipocampal consiste na certeza da localização do foco epileptogênico, baixa mortalidade, alta porcentagem de animais que desenvolvem status, além alterações morfológicas similares às encontradas em pacientes (NADLER; VICTOR NADLER, 1981).

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reproduzir o modelo de ictogênese com injeção de ácido caínico intra hipocampal unilateralmente.
- Avaliar o desenvolvimento e espalhamento de disparos ictais em 4 pontos de amostragem, em cada uma das 4 diferentes áreas de interesse.
- Avaliar o perfil de crises nas diferentes áreas registradas e sua progressão ao longo do tempo em animais submetidos ou não à estimulação elétrica na amígdala.
- Caracterizar as crises de animais estimulados e não estimulados ao longo do tempo.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. DIRETRIZES ÉTICAS

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob o número de processo 381/2017. Os procedimentos sempre transcorreram com o cuidado de minimizar a dor e o desconforto para os sujeitos experimentais.

8.2. SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar Hannover com o peso entre 250-350g, equivalente à aproximadamente 08 semanas de idade. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. No período anterior aos experimentos, os animais foram mantidos agrupados em 04 ou 05 ratos por caixa grande (41x34x17,8 cm) forrada com maravalha (~3cm), com acesso à ração balanceada padrão (Nuvilab - Quimtia) e água *ad libidum*, submetidos à um ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura ambiente de 22°C±1.

8.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais utilizados no trabalho seguiram a ordem de procedimentos descrita na linha do tempo abaixo (Figura 21). Ao atingirem o peso ideal (250-350g), os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante dos eletrodos de registro e estimulação, além da cânula para a injeção do ácido caínico. Após 7 dias, foram submetidos ao protocolo experimental, onde ocorreu a injeção do ácido caínico (0.4µg/0.2µl em uma velocidade de 2,4µl/h) (RAEDT *et al.*, 2009) e estimulação elétrica, dependente do grupo experimental. Ao fim dos protocolos de registro, os animais foram anestesiados e perfundidos e os cérebros conservados para as análises histológicas. Os detalhes de cada processo citado será descrito nos tópicos seguintes da metodologia.

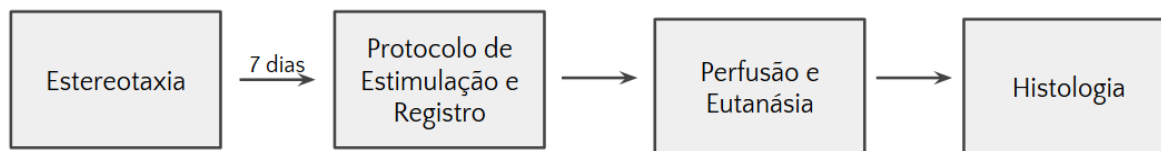


Figura 22: Linha do tempo dos experimentos executados. Todos os animais, independente do grupo experimental, passaram por todas essas etapas, com variações somente no protocolo de registro e estimulação.

8.4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com Isoflurano (2-3%) (ALBRECHT *et al.*, 2014) e localmente na região do escalpo com uma solução de Lidocaína + Epinefrina (2%). Foram mantidos em decúbito ventral em um estereotáxico para ratos (Stoelting Co.) sob uma manta térmica como profilaxia para a hipotermia comumente associada à anestesia com isoflurano (ZHANG; KNIGHT; PANG, 2017). Após a fixação por meio de barras auriculares, foi feita uma incisão elíptica na pele, remoção do tecido subcutâneo e limpeza do crânio com salina para a exposição das suturas cranianas. Foi feito o nivelamento dorso ventral das suturas lambda e bregma, utilizadas como referência para as coordenadas e realizadas as perfurações do crânio para o acesso ao encéfalo.

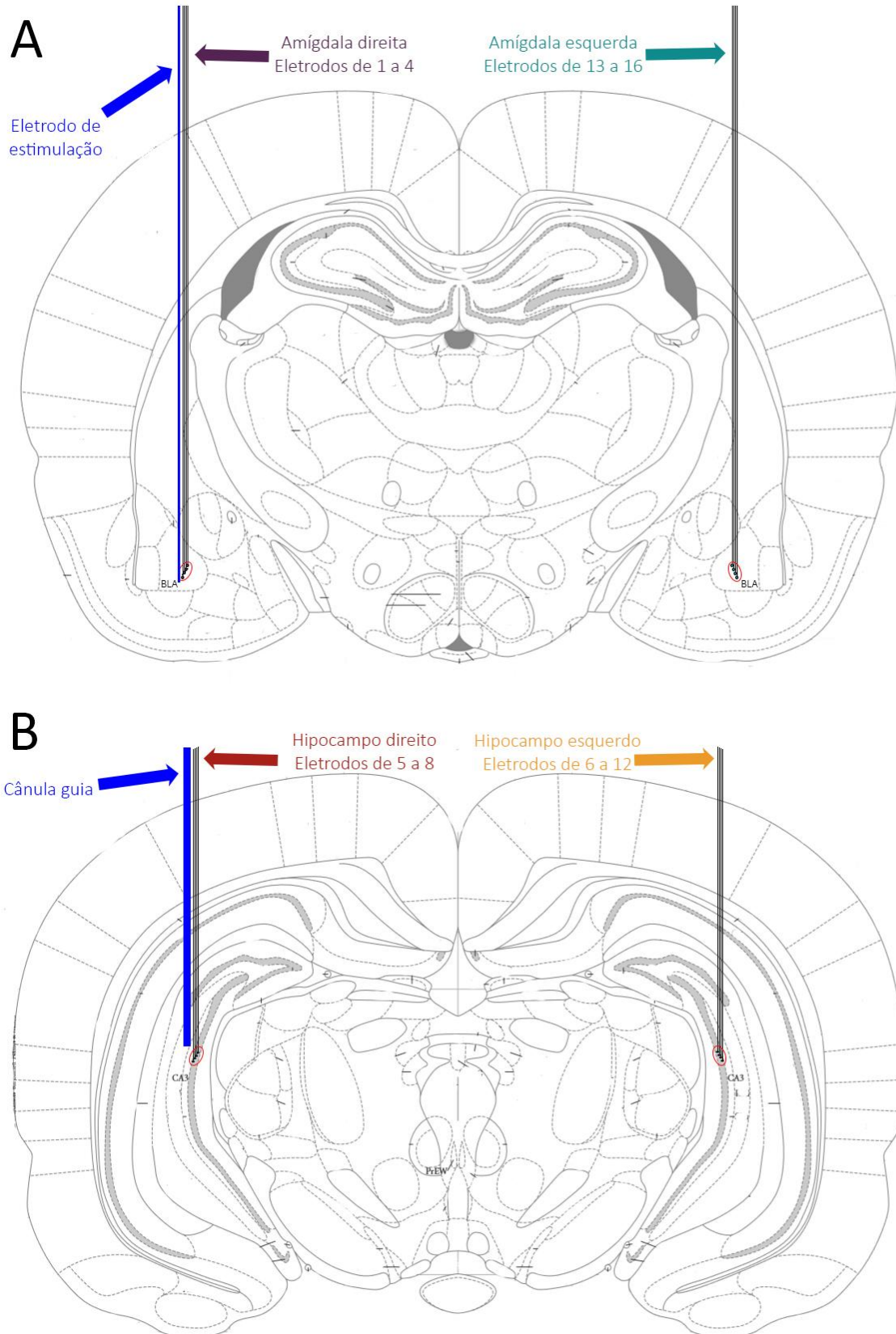


Figura 23: Coordenadas estereotáxicas utilizadas para a inserção dos eletrodos e da cânula guia (modificado de (PAXINOS; WATSON, 2013) A: Posição de inserção das matrizes de eletrodos na Amígdala Direita e Amígdala Esquerda (AP -2,52, ML \pm 4,8, DV -8.8). Juntamente com os eletrodos de registro na amígdala direita, foi inserido eletrodo de estimulação (AP -2,52, ML \pm 4,8, DV -8.3). B:

Posição de inserção das matrizes de eletrodos no Hipocampo Direito e Hipocampo Esquerdo (AP -5,3, ML \pm 4,3, DV -6,0). Com com os eletrodos de registro no hipocampo direito, foi inserido cânula guia para injeção de ácido caínico (AP -5,3, ML -4,3, DV -5.5).

Dois parafusos foram fixados ao crânio, um no osso frontal esquerdo e outro no parietal direito, para aterrar e referenciar o sinal. Em seguida a cânula guia para a posterior injeção de ácido caínico foi introduzida na região CA3 dorsal do hipocampo direito (AP -5,3, ML -4,3, DV -5.5, à partir do bregma) e fixada com cimento de zinco (Figura 23).

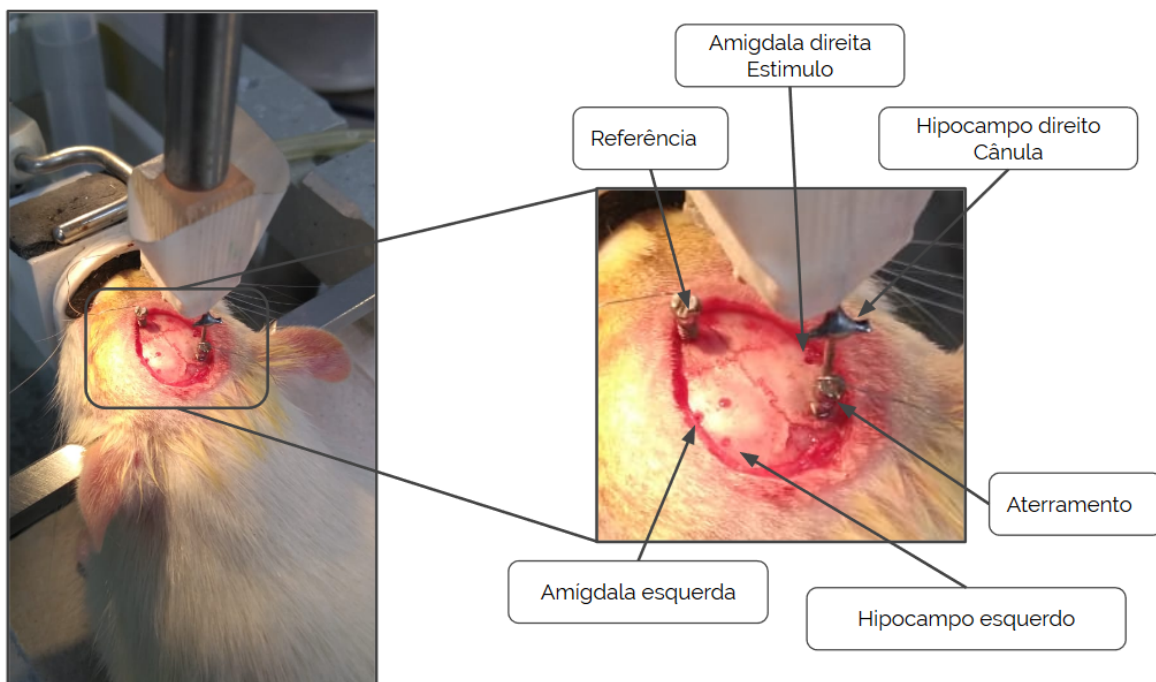


Figura 24: Procedimento cirúrgico estereotáxico. Localização dos locais de inserção dos eletrodos e cânula, além dos parafusos utilizados para aterramento e referenciamento do sinal.

Após esse processo a matriz com o restante dos eletrodos foi inserida e fixada com cimento de zinco e os eletrodos que acompanham a cânula guia, juntamente com os fios de terra e referência foram soldados à placa de circuito impresso. Após o implante, o crânio foi coberto com acrílico odontológico para fechar a ferida cirúrgica e fixar a matriz e a cânula (Figura 24).



Figura 25: Animal com os implantes fixados comacrílico odontológico após recuperação

Ao fim do procedimento, os animais receberam uma dose de Tramadol (12.5 mg/kg) para analgesia (CANNON, C. Z. *et al.*, 2010), pentabiótico veterinário (Zoetis®) e foram mantidos na manta térmica até o retorno da anestesia. Após a cirurgia os animais foram mantidos em caixas individuais por um período de 7 dias para total recuperação do procedimento de implante, antes do início dos experimentos.

8.5. PROTOCOLO DE REGISTRO E ESTIMULAÇÃO

Para o registro eletroencefalográfico, os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico quadrada e transparente (30x30x30cm). Durante o protocolo, a caixa foi mantida em uma gaiola de *Faraday* como medida de eliminação de artefatos no registro. O animal foi conectado ao chip amplificador e digitalizador de sinais RHD 2132 (Intan Technologies®), acoplado à um cabo de cobre revestido por uma espiral de metal que por sua vez se conectava à uma base de fios giratória (swivel - slip ring), o que possibilitou ao animal mobilidade na caixa, sem que o fio fosse tracionado ou danificado. O segmento após o swivel era conectado à uma placa de aquisição (Open Ephys®) e os sinais dos eletrodos foram adquiridos, monitorados em tempo real e armazenados para posterior análise utilizando o software modular Open Ephys GUI (Open Ephys®). A taxa de amostragem utilizada foi de 20K.

A estimulação elétrica utilizada neste trabalho consistiu de pulsos quadrados bifásicos com 0,1 μ s de largura de pulso, 0,8mA de intensidade e uma frequência de 0,5Hz (DE CASTRO MEDEIROS *et al.*, 2018). Diferentemente dos trabalhos anteriormente realizados em nosso laboratório com protocolo de estimulação similar, escolhemos fazer a estimulação bifásica ao invés de monofásica. Com essa alteração, pouca ou nenhuma carga é entregue ao tecido cerebral, reduzindo assim o dano eletrolítico local (TEHOVNIK, 1996). Os animais foram divididos em dois grupos experimentais:

8.5.1. Grupo Estimulado

Os animais do grupo estimulado foram registrados durante 10 minutos, denominado período basal, em que nenhum tipo de interferência é feita na atividade cerebral dos sujeitos experimentais. Posteriormente, eles foram estimulados por dois minutos (0,1 ms, 0,8 mA, 0,5 hz), seguido por mais 10 minutos de registro pós estímulo. Os animais então receberam uma injeção de ácido caínico (0.4 μ g/0.2 μ l, tempo total de infusão: 5 min) intracerebral na região CA3 do hipocampo direito (AP -5,3, ML -4,3, DV -5.5, à partir do bregma) e foram registrados até o início da crise. Foi realizado o registro do basal da crise, que durou 10 minutos, seguidos por dois minutos de estimulação durante a crise e registro dos 10 minutos após estímulo (Figura 25).

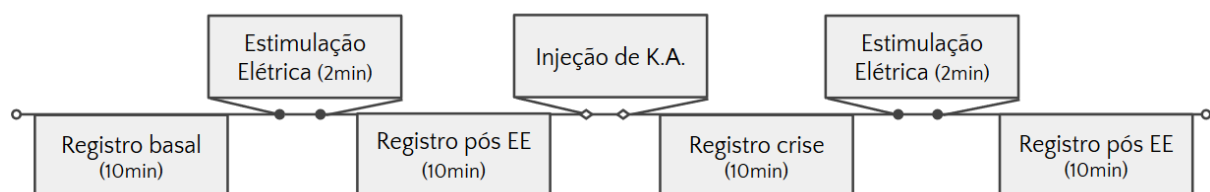


Figura 26: Representação do protocolo de estimulação e registro dos animais do grupo 0,5Hz

8.5.2. Grupo Controle

Os animais do grupo controle não receberam estimulação elétrica durante os experimentos. O protocolo de registro consistiu em 10 minutos de linha de base, seguido pela injeção de ácido caínico (0.4 μ g/0.2 μ l, tempo total de infusão: 5 min) intracerebral na região CA3 do hipocampo direito (AP -5,3, ML -4,3, DV -5.5, à partir

do bregma) e o registro até o início da crise. Após identificado o início da atividade ictal, os animais foram registrados por mais 10 minutos (Figura 26).

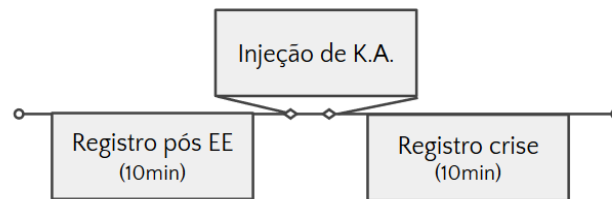


Figura 27: Representação do protocolo de registro dos animais do grupo controle

8.6. IDENTIFICAÇÃO DOS EVENTOS EPILEPTIFORMES

Na clínica, o eletroencefalograma é uma das ferramentas utilizadas no diagnóstico e classificação de síndrome epilépticas (SMITH, 2005). Para a confirmação de epilepsia de lobo temporal geralmente é utilizada a presença de disparos interictais durante os registros, já que raramente as crises ocorrem durante exames clínicos de curta duração (SMITH, 2005). Porém, em exames pré-cirúrgicos para retirada de foco epiléptico, o eeg durante a crise é essencial, tanto de escalpo para estudos preliminares, quanto os utilizando eletrodos profundos (JAN; SADLER; RAHEY, 2010). Comumente a identificação de padrões epileptiformes é realizada visualmente por indivíduos treinados, capazes de distinguir os comportamentos eletroencefalográficos encontrados na TLE (JAN; SADLER; RAHEY, 2010).

As características que utilizamos para a identificação dos eventos ictais foram o aumento substancial de energia (+ 3 desvio-padrão da média), padrões de disparos claramente distinguíveis dos observados no basal e duração mínima de 10s.

8.6.1. Organização dos Canais

Os canais foram organizados de forma que eletrodos localizados em uma mesma região ficassem próximos para uma melhor visualização e facilidade nas análises. Devido a problemas com o mapeamento dos primeiros animais amostrados, realizamos uma análise de correlação do sinal, energia em bandas de frequência e caracterização visual para a identificação de canais pertencentes à uma mesma área.

Os canais foram organizados serialmente de 1-16, sendo 1-4 correspondentes aos eletrodos da amígdala direita, 5-8 hipocampo direito, 9-12 hipocampo esquerdo e 13-16 amígdala esquerda.

8.7. HISTOLOGIA

Todos os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) intraperitoneal. A posição dos eletrodos foi confirmada por uma lesão eletrolítica (0,5 mA por 2 s) e em seguida os objetos experimentais foram submetidos a um protocolo de perfusão cardíaca.

Esse protocolo consiste na fixação do animal em decúbito dorsal, seguida de uma incisão no processo xifóide para a completa exposição do coração. Após a remoção do pericárdio, uma agulha (18G) foi introduzida no ventrículo esquerdo em direção à aorta ascendente, onde foi infundido uma solução tampão fosfato salina [PBS 0,1M (0,387M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,612M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4 M NaCl); pH=7,4; 4° C; pK \approx 7,21], seguido por solução de paraformaldeído solubilizado em PBS (PFA/PBS; 4% p/v; pH=7,4). Uma pequena incisão foi feita no átrio direito para a saída do sangue e das soluções infundidas. Os cérebros foram então removidos, pós fixados em PFA/PBS 4% p/v e mantidos a 4 °C por 24 hs. Após esse período, foram transferidos para solução de sacarose solubilizada em PBS (30% p/v) e mantidos a 4° C por 72 hs.

Os cérebros foram posteriormente fatiados (40 μm) em um criostato (Leica®) e algumas fatias, de acordo com as coordenadas estereotáticas referentes ao implante dos eletrodos de registro e da cânula, foram selecionadas e coradas para confirmação do implante, seguindo protocolo de marcação com solução de vermelho neutro [Vermelho neutro (1% p/v); acetato de sódio anidro (0,3% p/v); ácido acético glacial (0,12% v/v)].

9. RESULTADOS

Foram utilizados para as análises os indivíduos que apresentaram crises eletrográficas claramente distinguíveis durante a observação do EEG e que o protocolo de estimulação foi realizado de acordo com os padrões definidos no delineamento experimental. Após a triagem, foram utilizados oito animais, quatro pertencentes ao grupo **estimulado** e os outros quatro do grupo **controle**.

Durante a apresentação dos dados, os canais sempre estarão organizados da mesma forma, numerados serialmente de 1-16 com os registros do núcleo basolateral do complexo amigdalóide (BLA) direito no topo (canais de 1 a 4) com coloração **roxa**, seguido pelos registros de CA3 direito em **vermelho** (canais 5 a 8), CA3 esquerdo em **amarelo** (canais 9 a 12) e BLA esquerda em **verde** (canais 13 a 16). As crises serão listadas serialmente a partir de **01** por animal.

9.1. REGISTRO ELETROENCEFALOGRÁFICO

Foram obtidos no total 24.539s (~7hrs) de registro eletroencefalográfico de quatro pontos de amostragem em cada uma das áreas de interesse (**AmyD**, **HipD**, **HipE** e **AmyE**), distribuídos entre os animais pertencentes a cada grupo experimental.

9.1.1 Grupo controle

O registro do primeiro animal do grupo controle (**C1**) teve duração total de 3165s sendo os primeiros 620s correspondidos ao período basal, seguido por um período de 945s que não foi registrado e início do período pós injeção em 1565s (Figura 28). O fragmento de tempo não registrado corresponde ao período de manuseio do animal e injeção do ácido caínico.

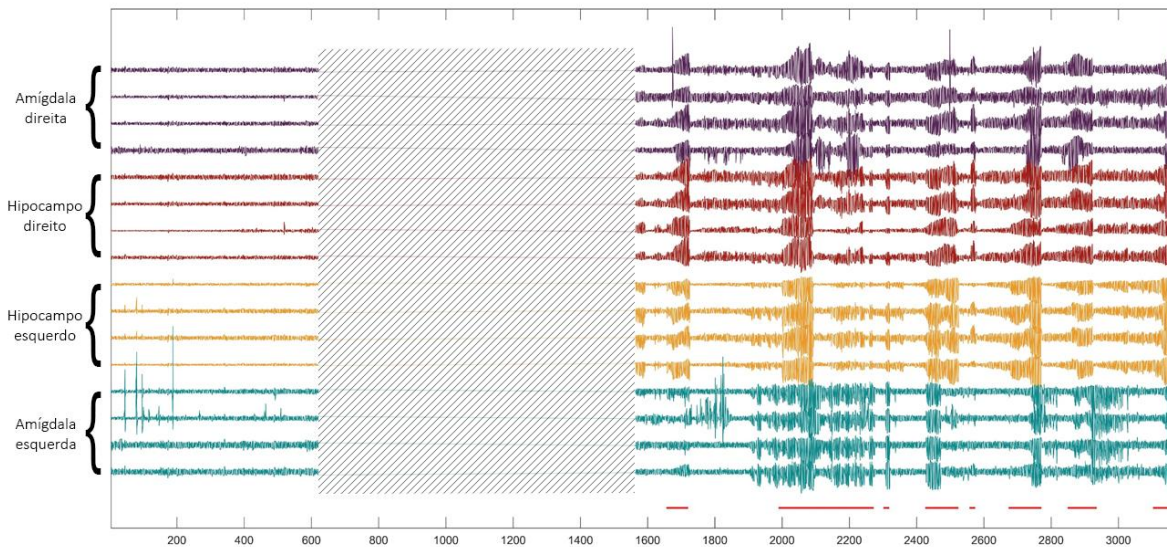


Figura 28: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal C1. No eixo x temos o tempo total de registro e em y os 16 canais de registro ordenados em amígdala direita (1-4 em roxo), hipocampo direito (5-8 em vermelho), hipocampo esquerdo (9-12 em amarelo) e amígdala esquerda (13-16 em verde). A área hachurada corresponde ao período de tempo em que o sistema de registro foi desligado para o protocolo de injeção. Assim, à sua esquerda temos o período de registro basal e a esquerda o período pós injeção de ácido caínico. As linhas em vermelho próximas ao eixo x correspondem aos eventos ictais identificados.

O segundo animal pertencente ao grupo controle (**C2**) foi registrado por 2227s, com 603s de período basal e um período silente de 887s (Figura 29).

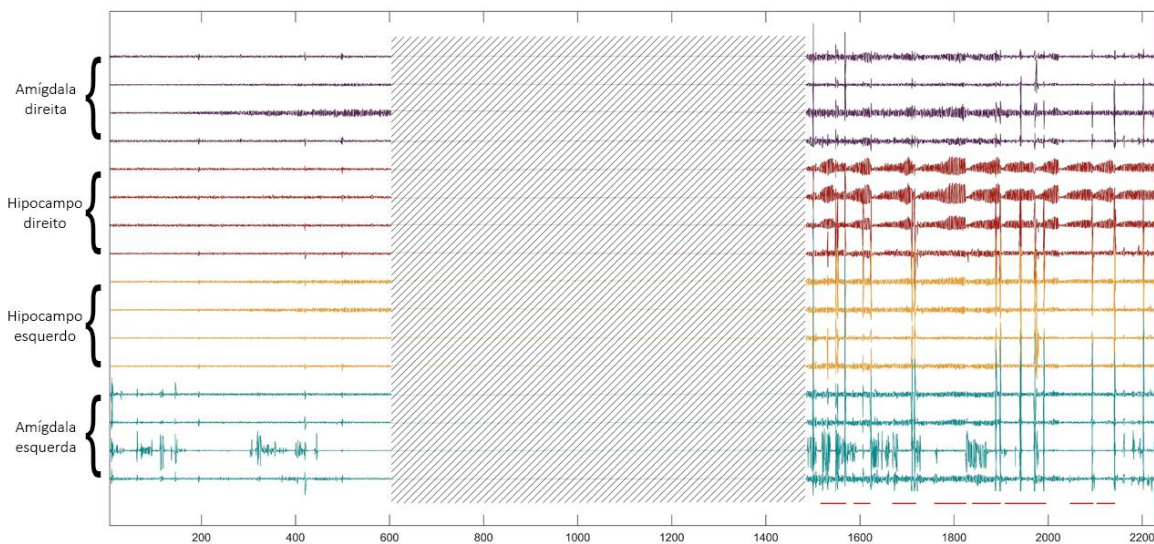


Figura 29: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal C2. Detalhes da imagem iguais aos da figura 28.

O terceiro animal do grupo controle (**C3**) foi registrado no total por 3508s. O período basal teve compreende os primeiros 1125s (Figura 30).

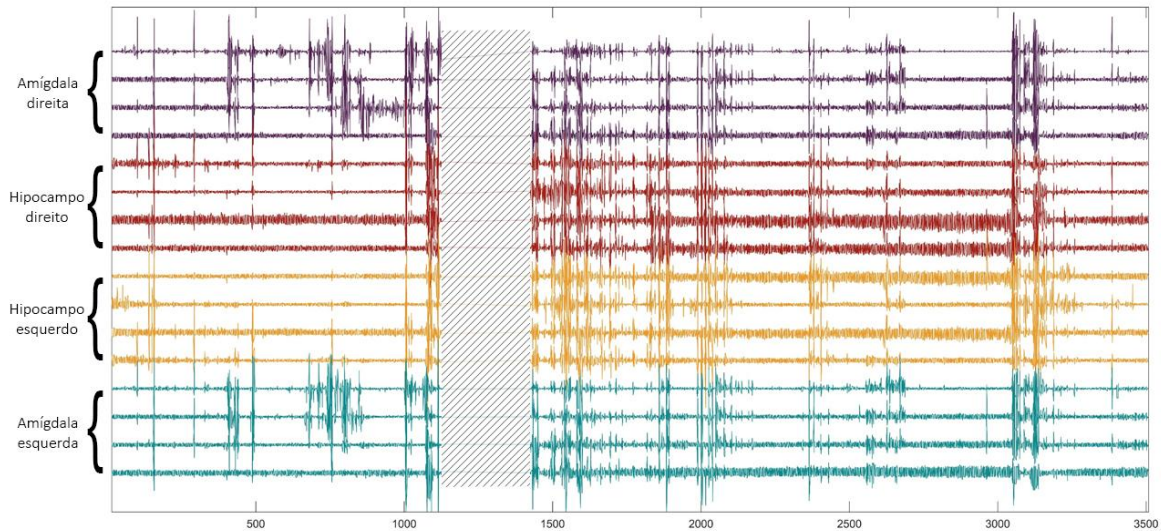


Figura 30: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal C3. Detalhes da imagem iguais aos da figura 28.

O último animal pertencente ao grupo controle (C4) foi registrado no total por 2665s com um período basal pré-injeção de 670s. O período silente correspondente ao manuseio do animal e injeção da droga teve duração de 625s (Figura 31).

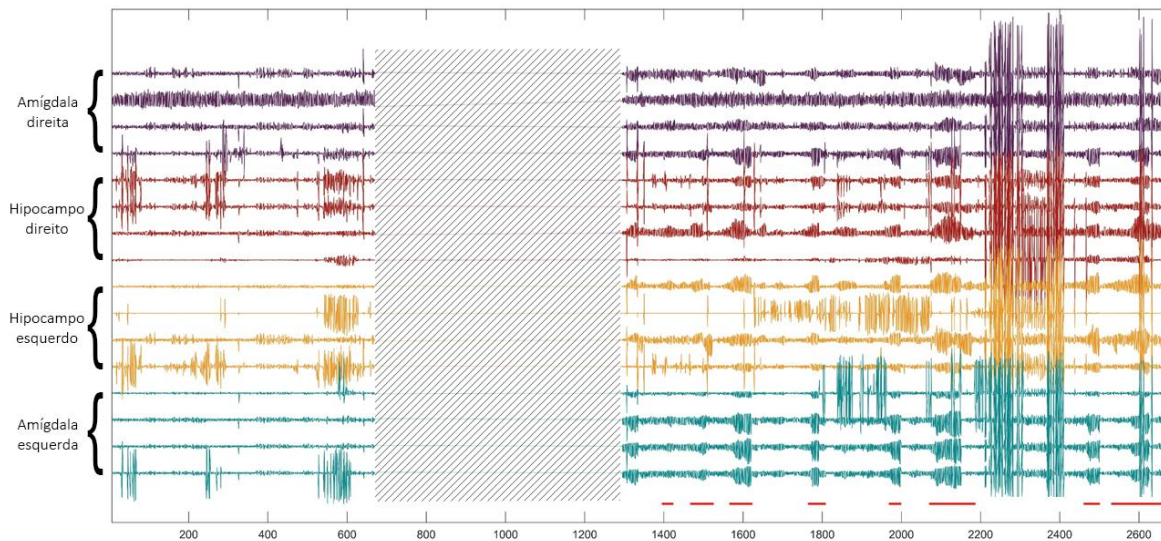


Figura 31: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal C4. Detalhes da imagem iguais aos da figura 28.

9.1.1 Grupo estimulado

O primeiro animal do grupo estimulado (**E1**) teve registro com duração total de 4439s. O período basal compreende os primeiros 1269s, sendo os 648s iniciais período basal antes do primeiro estímulo elétrico. Assim como nos animais do grupo

controle, o tempo não registrado corresponde ao período de injeção e teve duração de 632s (Figura 32). Os períodos de estímulo estão sinalizados em cinza na figura.

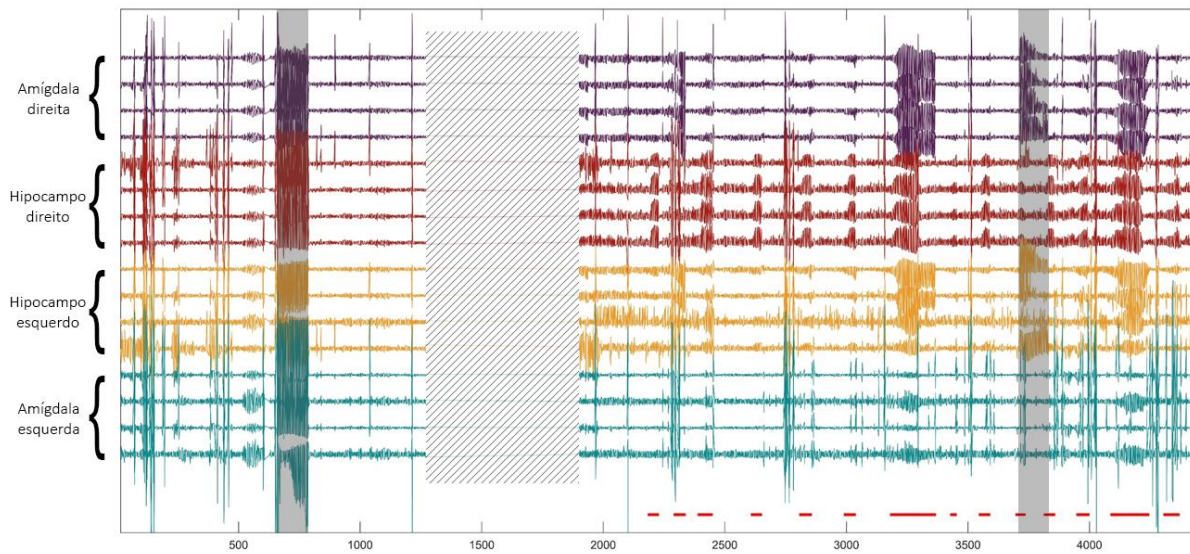


Figura 32: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal E1. No eixo x temos o tempo total de registro e em y os 16 canais de registro ordenados em amígdala direita (1-4 em roxo), hipocampo direito (5-8 em vermelho), hipocampo esquerdo (9-12 em amarelo) e amígdala esquerda (13-16 em verde). A área hachurada corresponde ao período de tempo em que o sistema de registro foi desligado para o protocolo de injeção. Assim, à sua esquerda temos o período de registro basal e a esquerda o período pós injeção de ácido caínico. As linhas em vermelho próximas ao eixo x correspondem aos eventos ictais identificados e em cinza temos os períodos de estimulação.

O segundo animal do grupo estimulado (**E2**) teve registro com duração total de 3455s (Figura 33). O período basal pré estimulação corresponde aos primeiros 595s. Os períodos de estímulo durante o basal e pós injeção estão sinalizados em cinza na figura.

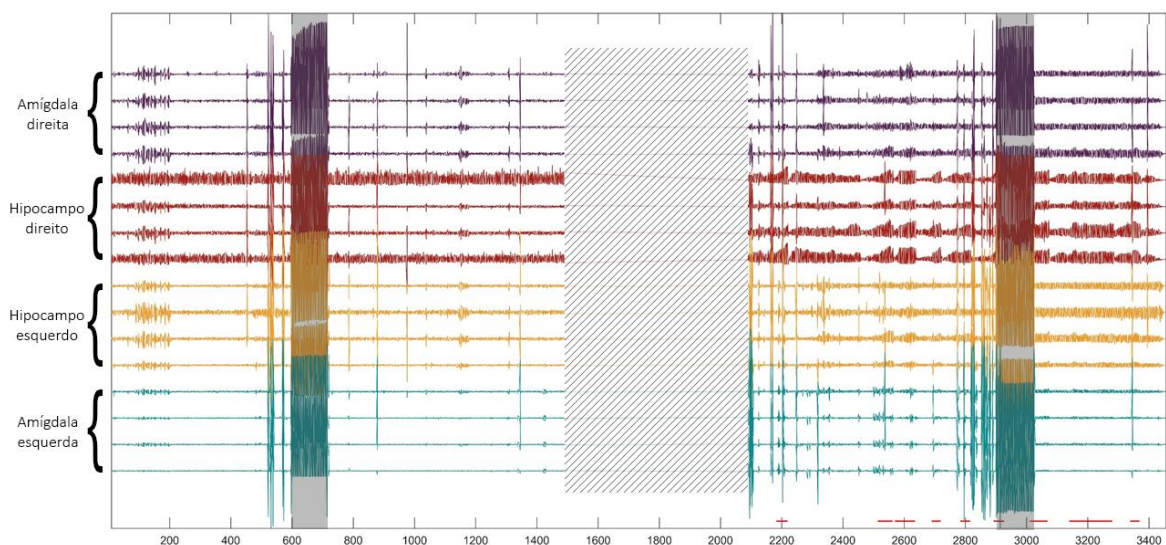


Figura 33: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal E2. Detalhes da imagem iguais aos da figura 32.

O terceiro animal pertencente ao grupo estimulado (**E3**) teve registro com duração total de 3455s (Figura 34). O período basal pré estimulação corresponde aos primeiros 595s. Os períodos de estímulo durante o basal e pós injeção estão sinalizados em cinza na figura

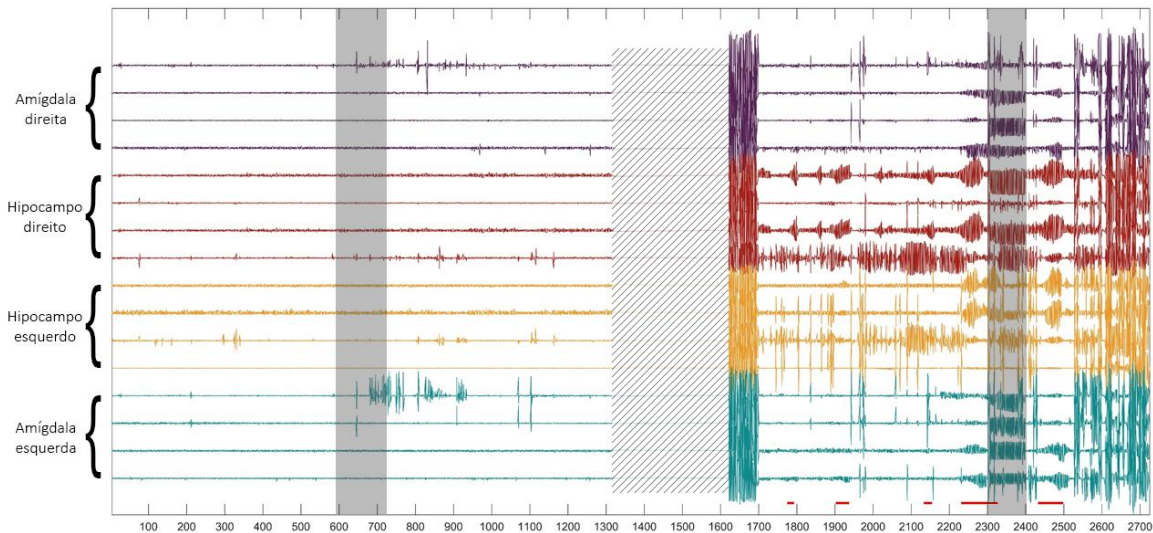


Figura 34: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal E3. Detalhes da imagem iguais aos da figura 32.

O último animal do grupo estimulado (**E4**) foi registrado durante 4359s (Figura 35). O período basal corresponde aos primeiros 1334s, sendo os 600s iniciais o basal antes da primeira estimulação. Os estímulos estão sinalizados em cinza na figura

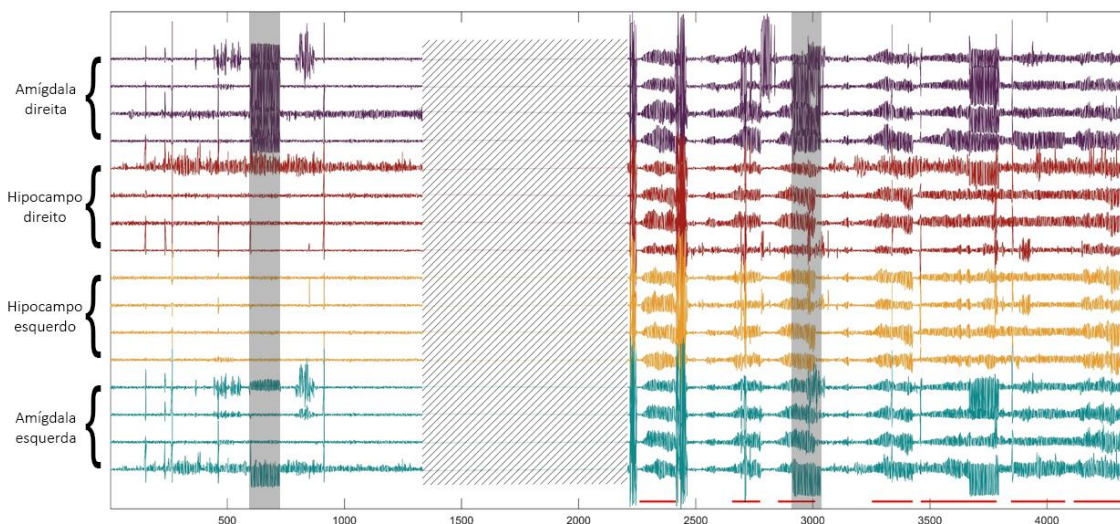


Figura 35: Registro dos 16 canais ao longo do tempo do animal E4. Detalhes da imagem iguais aos da figura 32.

9.2. IDENTIFICAÇÃO VISUAL DE EVENTOS EPILEPTIFORMES INDUZIDOS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO CAÍNICO

Foram identificados visualmente 62 eventos epileptiformes, com uma média de 6,750 crises por animal do grupo controle ($\pm 2,250$, $n=4$) e 8,750 para o grupo estimulado ($\pm 1,931$, $n=4$) sem diferença estatística entre os grupos (t test, $p=0,5251$). As crises apresentaram duração média de 60,62s no grupo controle ($\pm 7,259$, $n=26$) e 100,5s nos animais do grupo estimulado ($\pm 22,51$, $n=35$), sem diferença estatística entre os grupos (t test, $p=0,1432$). Os intervalos de crise também foram semelhantes entre os grupos, com duração média de 78,83s nos animais do grupo controle ($\pm 16,76$, $n=23$) e 113,1 ($\pm 12,69$, $n=31$) para o grupo 0,5 Hz, sem diferença estatística entre eles (t test, $p=0,1026$) (Figura 36).

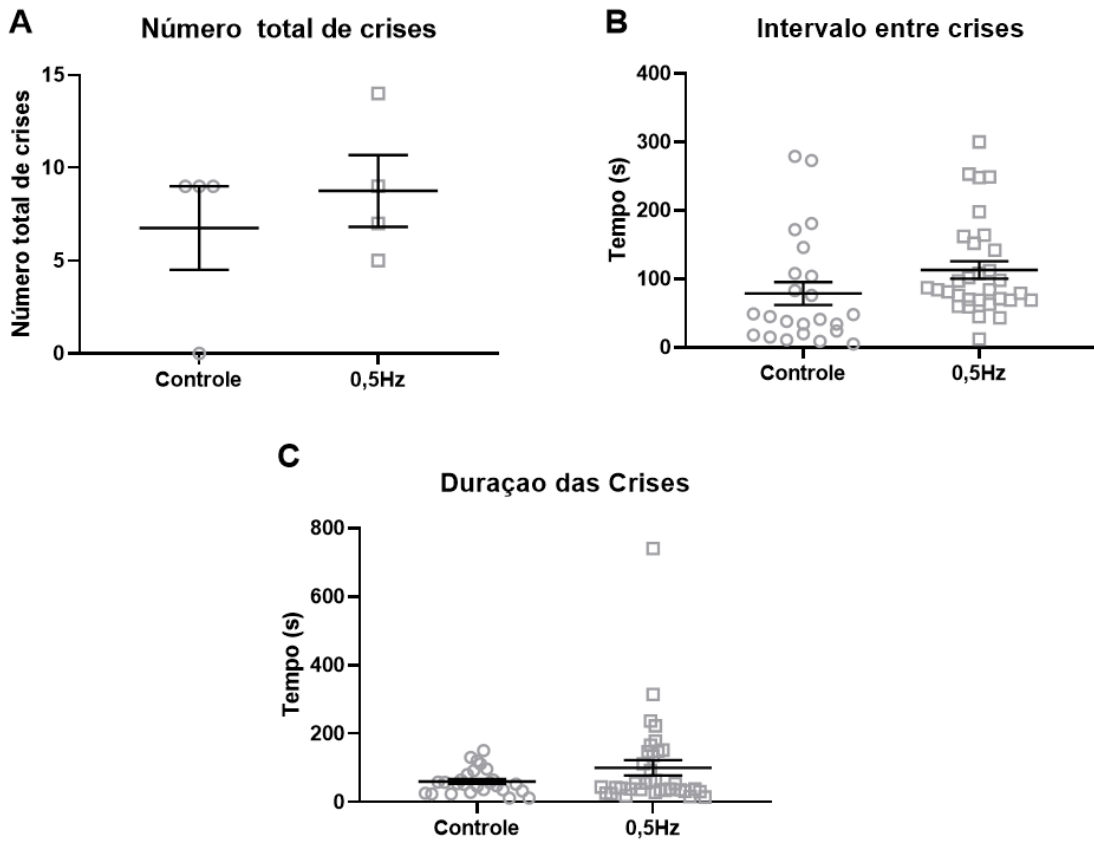


Figura 36: Características gerais das crises por grupo experimental. A: Número total de crises. B: Duração das crises. C Intervalo entre crises. Os gráficos estão representados pela média \pm erro padrão da média. Os símbolos em cinza representam os valores individuais avaliados.

9.3. IDENTIFICAÇÃO VISUAL DA DINÂMICA DE INÍCIO E PROPAGAÇÃO DE EVENTOS ICTAIS

Para a melhor compreensão e acompanhamento dos dados apresentados, as crises serão representadas com a seguinte nomenclatura: X1_01 em que X é o grupo ao qual o animal pertence (C - controle; E - Estimulado) seguido pelo número de identificação do animal e posteriormente o número de identificação da crise.

9.3.1. Grupo controle

9.3.1.1. Animal C1

Foram identificados no primeiro animal do grupo controle (**C1**) 09 eventos ictais (Figura 28).

Todas as crises registradas no animal 01 (C1) iniciaram-se no **hipocampo direito**, local da injeção. É possível observar dois principais padrões de comportamento de crise.

O primeiro tipo são as crises que se iniciam no **Hip direito** (injeção) e são observadas alguns segundos depois atividades epileptiformes no **Hip contralateral** e na **Amy ipsilateral**, porém sem recrutamento da **Amy contralateral**. Esse padrão é o que ocorre na crise 1 (Figura 37) .

O segundo tipo de crise acomete todos as áreas registradas, sempre iniciando no local de injeção. Um exemplo deste tipo de crise é a crise C1_02 representada na figura 38.

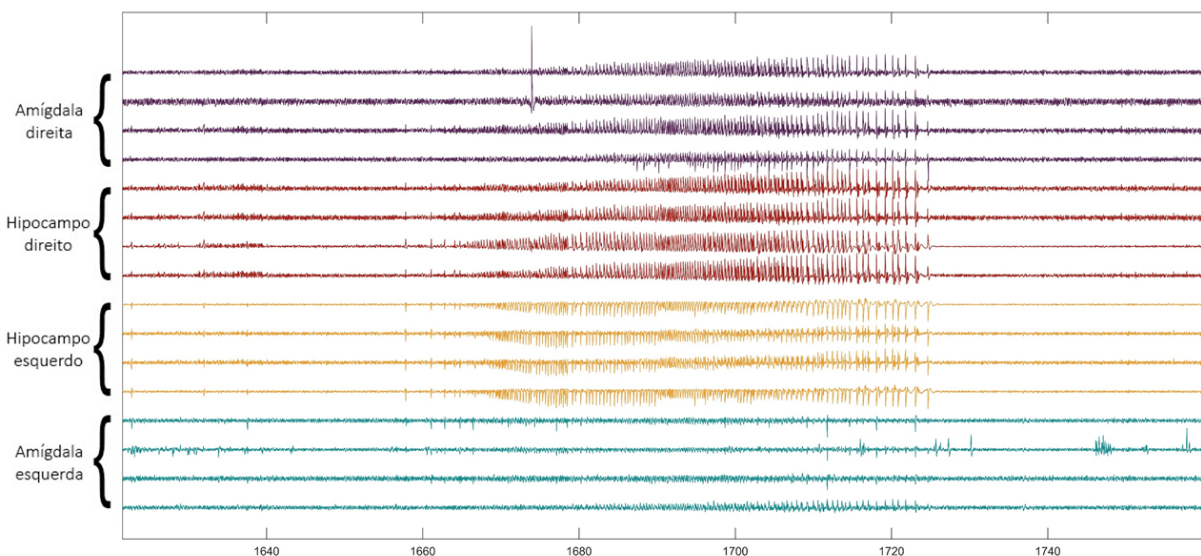


Figura 37: Primeiro padrão de recrutamento encontrado no animal C1. No eixo x temos o tempo e em y o os canais de registro. O padrão de cores para a representação dos canais e suas respectivas áreas seguem o utilizado nas figuras anteriores. Os disparos ictais desta crise (C1_01) foram encontrados na amígdala direita, hipocampo direito e hipocampo esquerdo, sem recrutamento da amígdala contralateral à injeção.

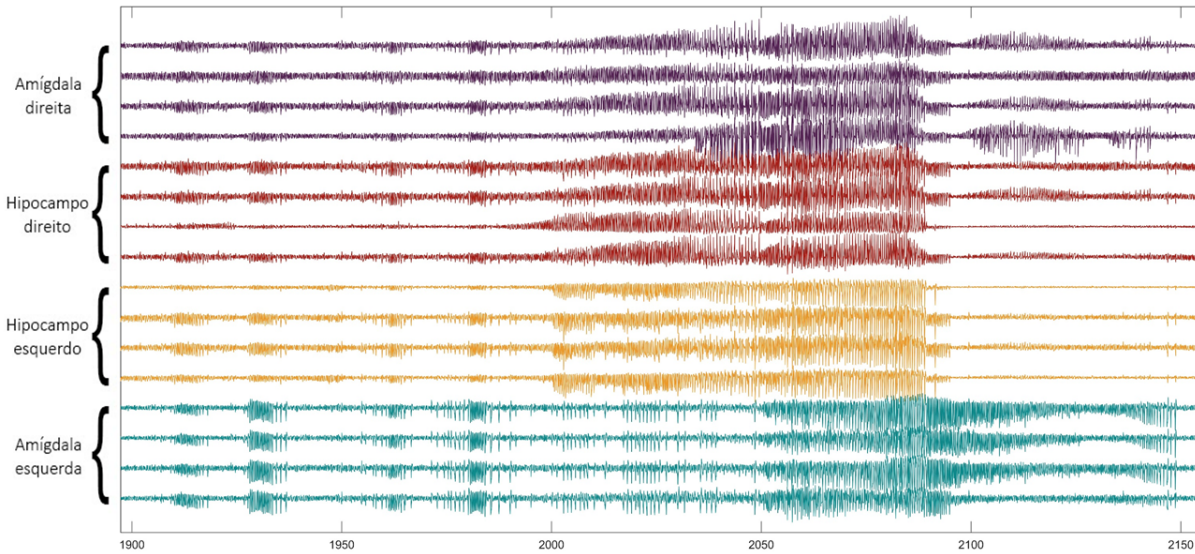


Figura 38: Segundo padrão de recrutamento do animal C1. Nessa crise (C1_02), os disparos ictais são encontrados em todos os canais registrados.

9.3.1.2. Animal 02 - C2

O segundo animal do grupo controle (**C2**) também apresentou 09 eventos ictais durante o protocolo de registro (Figura 29).

Foi observado somente um tipo de comportamento de crise, com todas iniciando no local de injeção (**HipD**) e atividade ficou contida nessa área, não sendo encontrados disparos elegíveis para a classificação como epileptiformes em nenhuma das outras regiões. Na Figuras 39 temos a representação da C2_04 que ilustra o padrão encontrado.

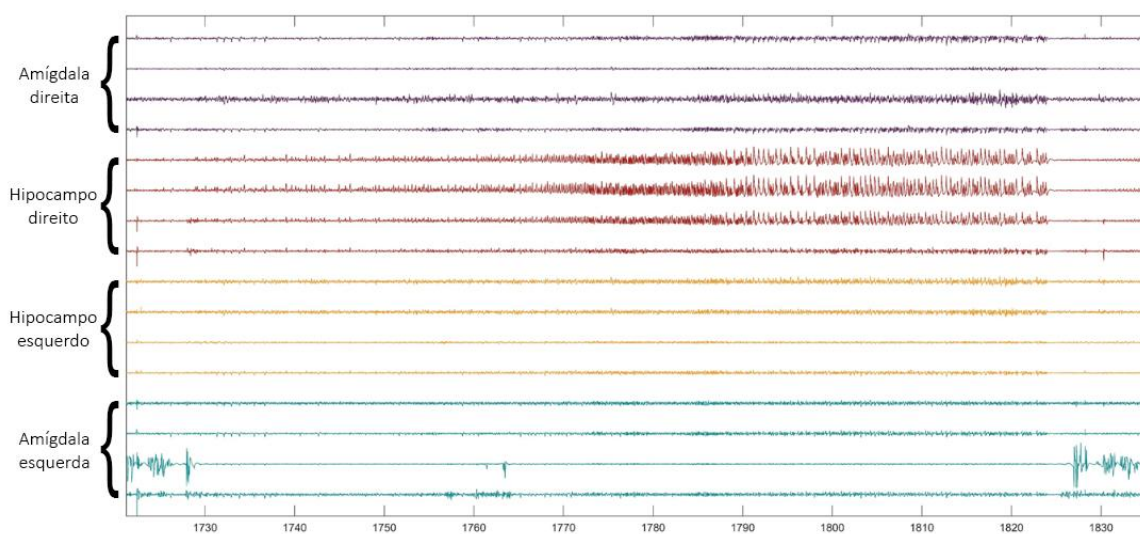


Figura 39: Padrão de crise encontrado no animal C2. Somente foi observada atividade epileptiforme nos canais correspondentes ao hipocampo direito (vermelho), que corresponde ao local da injeção. A crise representada é a C2_04.

9.3.1.3. Animal 03 - C3

O animal 03 (C3) não apresentou crises que atingiram os critérios classificatórios na identificação visual por não apresentar aumento de energia significativa durante os paroxismos, como pode ser observado na figura 40.

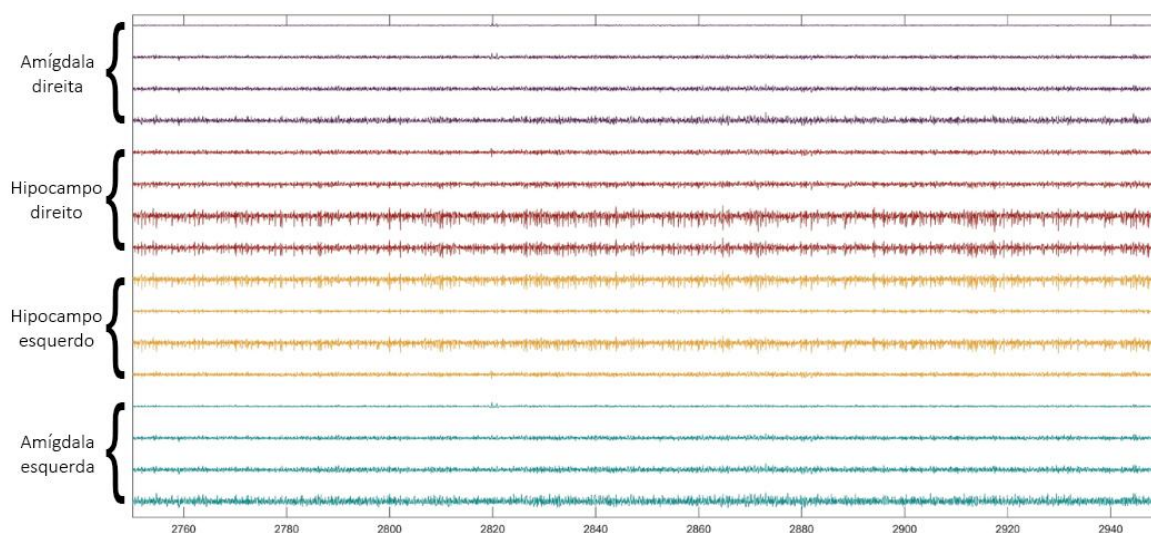


Figura 40: Registro do animal C3 após a injeção de ácido caínico. Não foi perceptível alterações no eletroencefalograma correspondentes aos encontrados nos demais animais.

9.3.1.4. Animal 04 - C4

O último animal controle apresentou 9 crises identificadas visualmente (Figura 31)

Todos os eventos ictais identificados ocorreram em todas as áreas amostradas, como pode ser observado na figura 41, na crise C4_03.

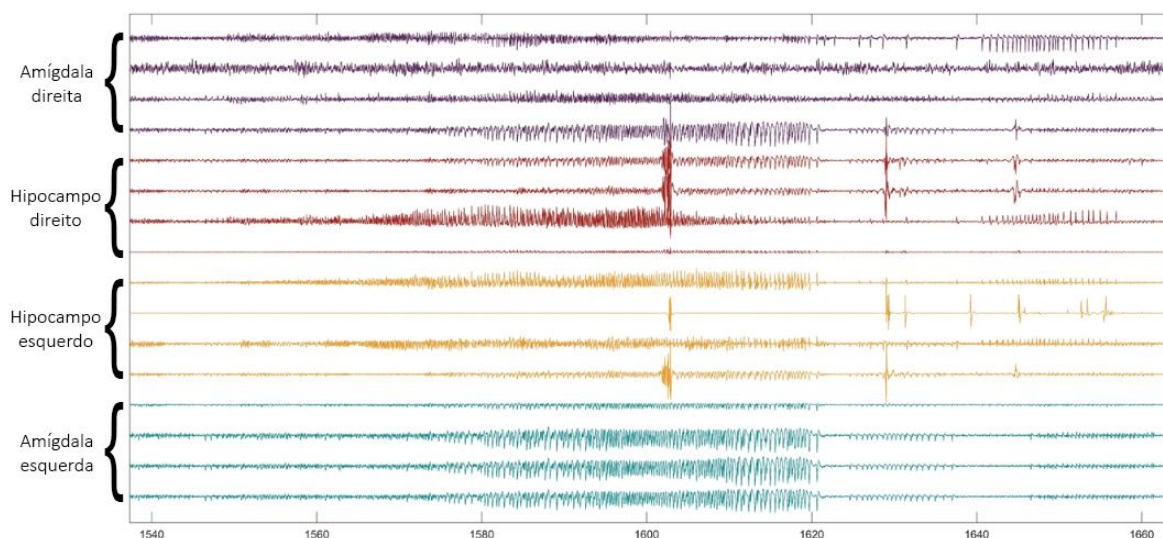


Figura 41: Crise 03 encontrada no animal C4 (C4_03). Os disparos ictais são vistos em todas as áreas amostradas.

9.3.2. Grupo estimulado

9.3.2.1. Animal 01 - E1

O primeiro animal do grupo experimental (**E1**) teve 20 crises ao longo do período de registro. Foram observados quatro tipos de comportamento ictal (Figura 32).

O primeiro tipo de crise inicia-se no **hipocampo direito** e em seguida é observado disparos no **hipocampo esquerdo** e na **amígdala direita** (Figura 42 - Crise E1_01). Outro padrão de crise consiste na ocorrência de disparos ictais somente nos hipocampo **direito**, sem atividade epileptiforme nas demais áreas (Figura 43 - Crise E1_02). Foram observadas também crises que englobam todas as áreas amostradas (Figura 44 - Crise E1_03). O último tipo de padrão ocorreu somente na crise 2, onde o início da atividade epileptiforme foi simultaneamente na **amígdala direita** e no **hipocampo esquerdo**, com uma atividade semelhante à disparos interictais no local da injeção - **Hip D** (Figura 45 - Crise E1_06).

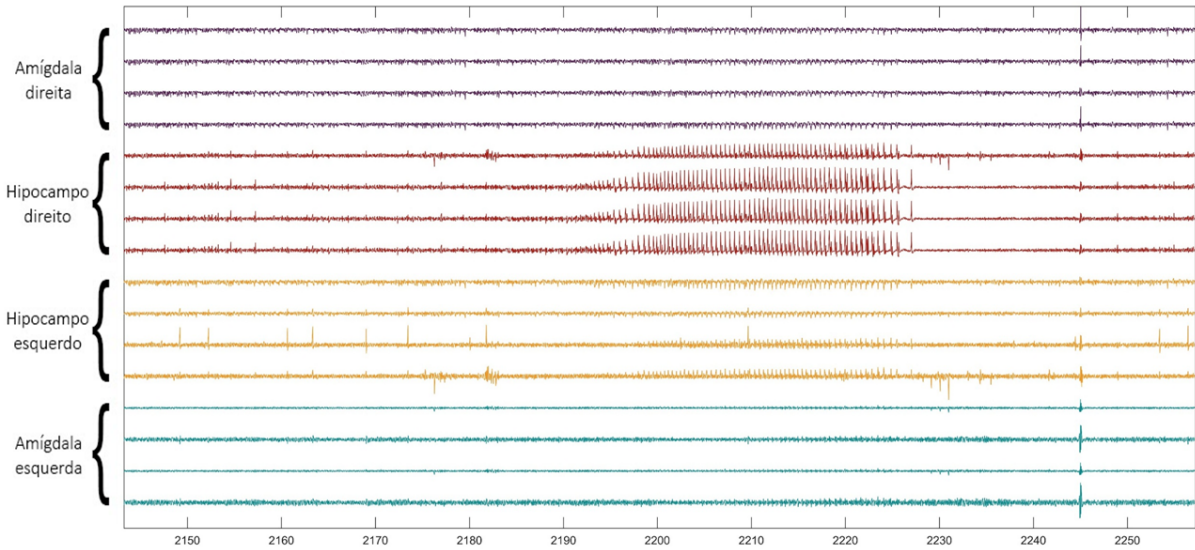


Fig 42: O primeiro padrão de crise encontrado no animal E1 (E1_01). No eixo x temos o tempo de registro e y os canais referentes às áreas amostradas durante a crise 01. Note que somente são encontrados disparos ictais no hipocampo direito, local da injeção.

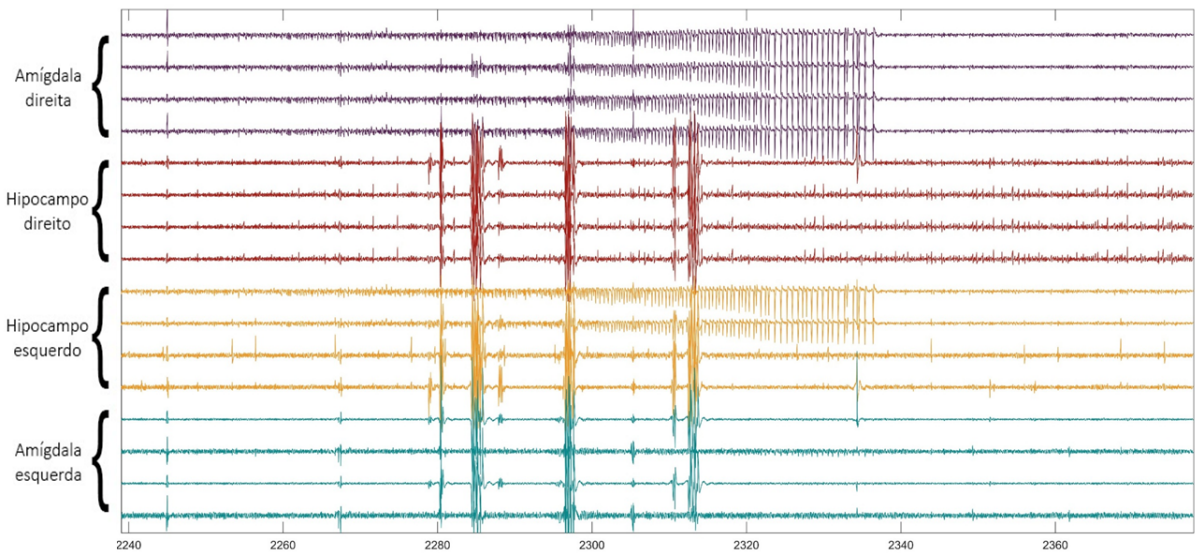


Figura 43: Segundo padrão de crise encontrado no animal E1 (E1_02). Os disparos ictais na crise 02 foram observados a amígdala direita e no hipocampo esquerdo, sem atividade epileptiforme na amígdala esquerda. No hipocampo direito foram vistos disparos semelhantes a interictais.

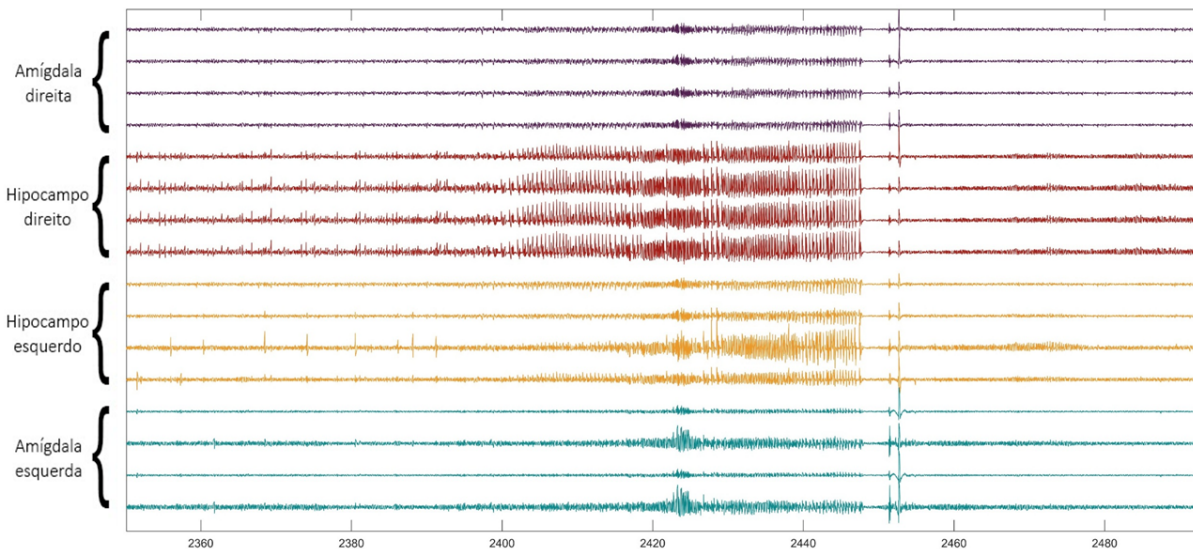


Figura 44: Terceiro padrão de crise encontrado no animal E1 (E1_03). Os disparos nesse tipo de crise acometeu todos os canais registrados. Na imagem temos a representação da crise 03.

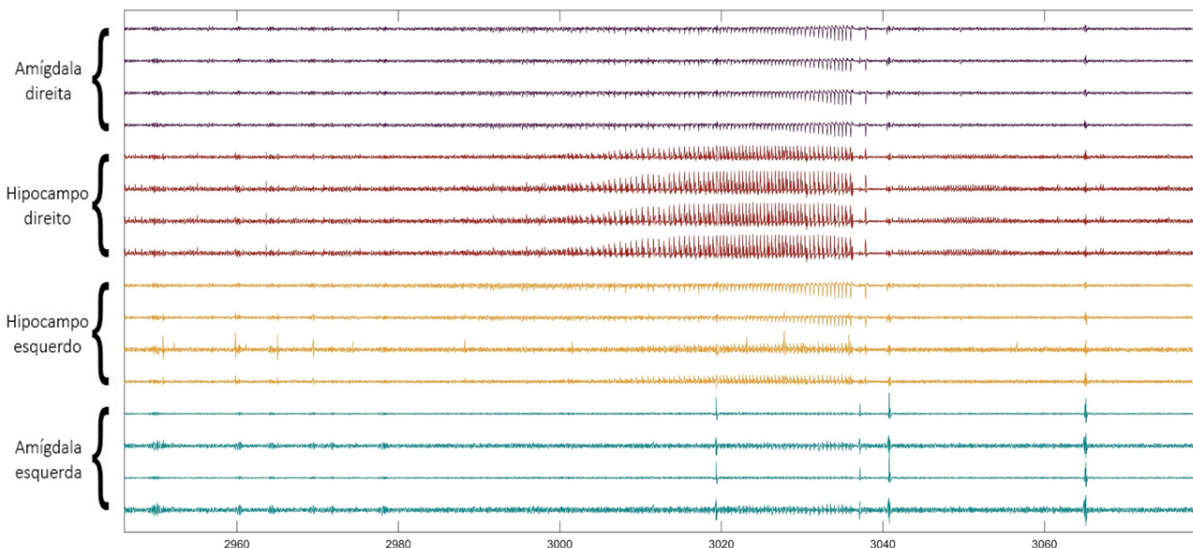


Fig 45: Quarto padrão de crise encontrado no animal E1: Nesta crise (E1_06) os disparos são vistos nos canais correspondentes à amígdala direita, hipocampo direito e hipocampo esquerdo, sem recrutamento da amígdala contralateral.

9.3.2.2. Animal 02 - E2

O segundo animal do grupo estimulado apresentou 9 crises (Figura 33). Todos os eventos ictais identificados tiveram seu início no **hipocampo direito** e é encontrada atividade epileptiforme também na **amígdala direita** e no **hipocampo esquerdo**. A amígdala contralateral não foi recrutada ao longo do período de registro (Figura 46).

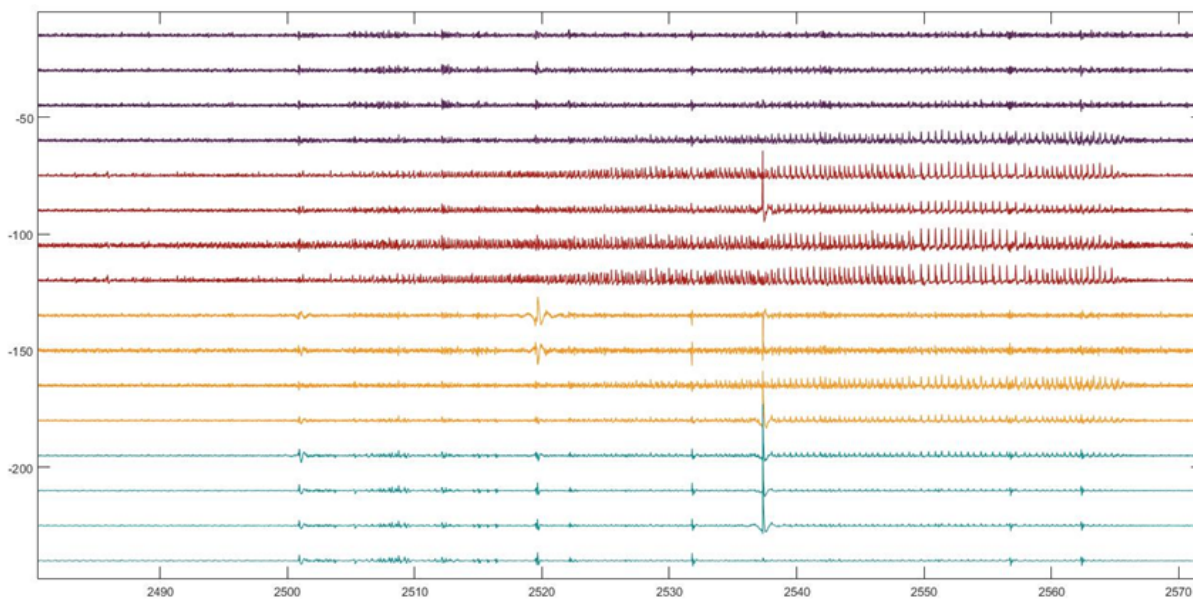


Figura 46: Exemplo do tipo de crise identificado visualmente no animal E2 (E2_04). Os disparos ictais iniciam no hipocampo direito e são vistos segundos depois no hipocampo contralateral e na amígdala direita. A crise utilizada como exemplo foi a 04.

9.3.2.3. Animal 03 - E3

O terceiro animal pertencente ao grupo estimulado apresentou somente cinco eventos ictais divididos em dois padrões distintos (Figura 34).

O primeiro tipo de crise acomete somente o **hipocampus direito** e ocorreu antes da segunda estimulação (Figura 47). As crises imediatamente antes e após o estímulo tiveram seu início no hipocampo direito, com atividade observada em todas as áreas amostradas (Figuras 48).

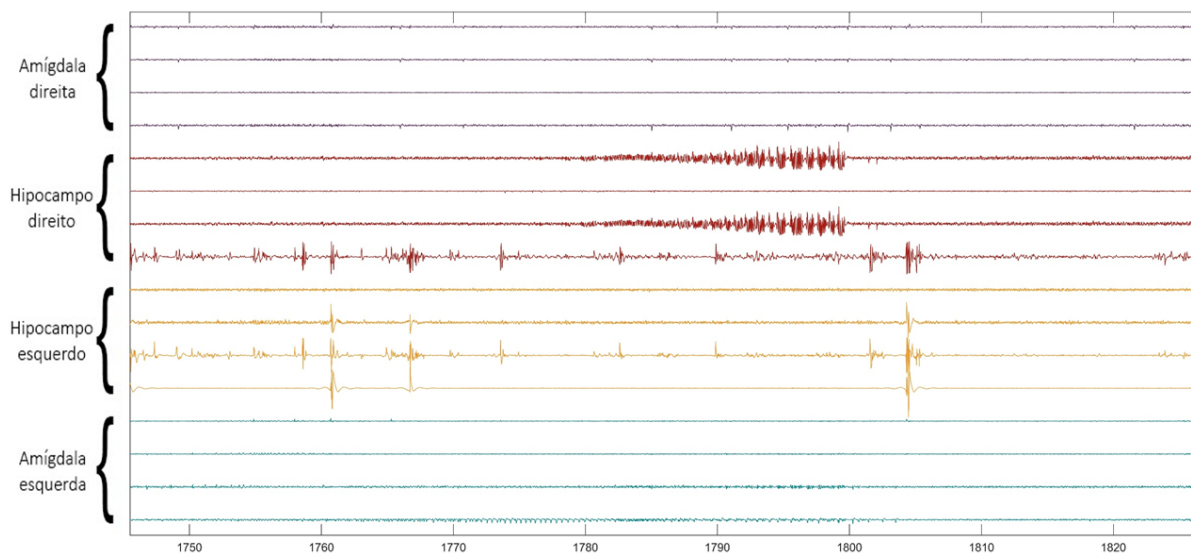


Figura 47: Primeiro padrão de crise encontrado no animal E3 (E3_01). Nas primeiras crises, somente foram encontrados disparos ictais no hipocampo direito, local da injeção, sem atividade epileptiforme nas demais áreas. A figura é correspondente a segunda crise desse animal.

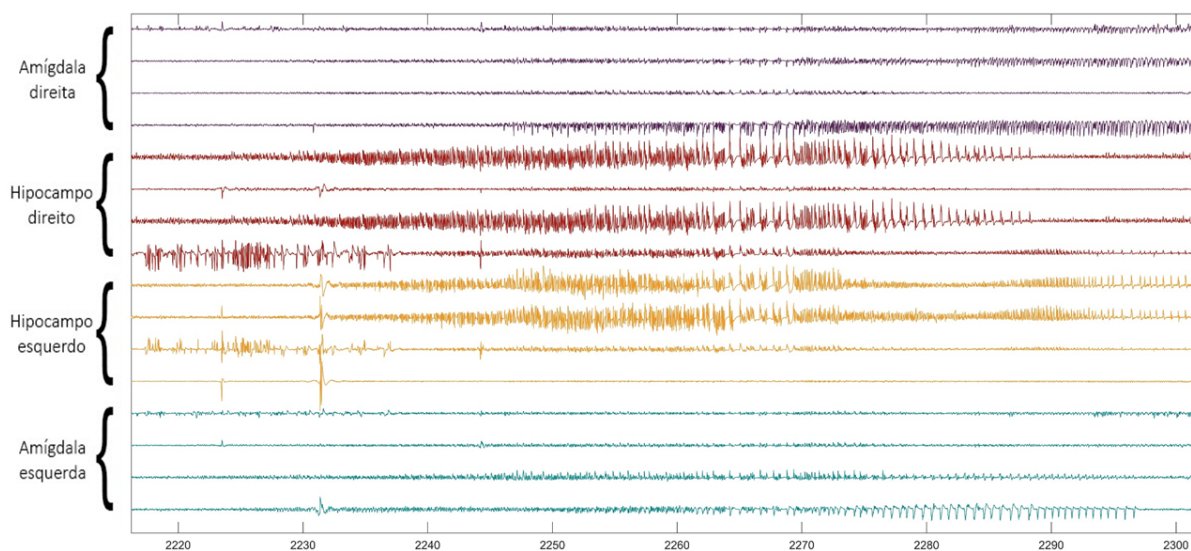


Figura 48: Segundo padrão de crise identificado visualmente no animal E3 (E3_04). Como exemplificado pela crise 04, os disparos são encontrados em canais de todas as áreas amostradas.

9.3.2.4. Animal 04 - E4

O último animal que pertence ao grupo estimulado teve 7 crises ao longo do registro (Figura 35).

Todas as crises observadas iniciaram no **hipocampo direito** e alastraram para as outras 3 áreas amostradas (Figura 49).

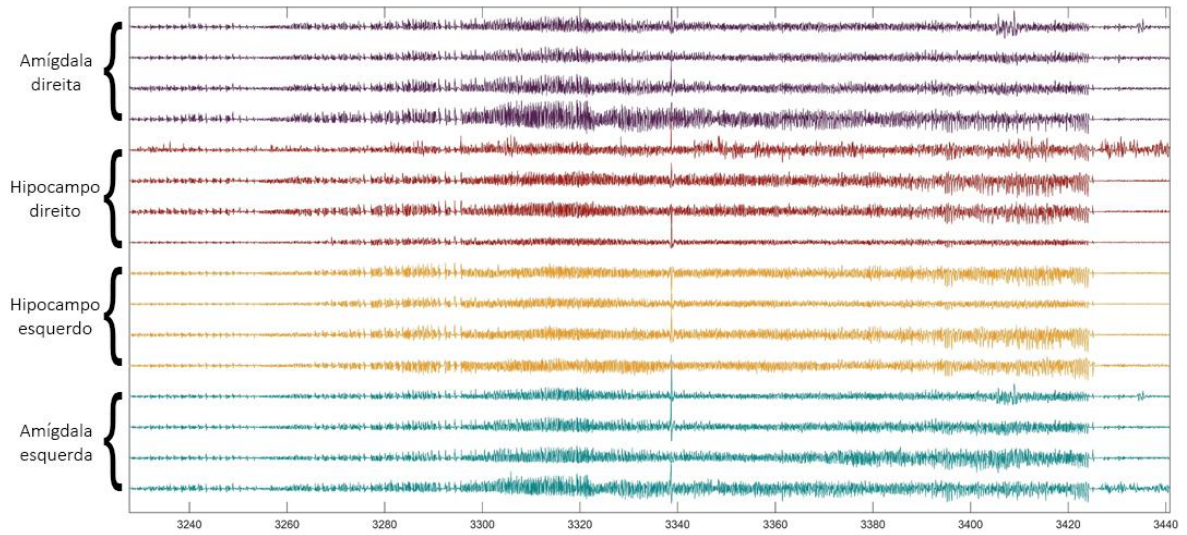


Figura 49: Padrão de crise identificado no animal **E4** (E4_04). Os disparos são vistos em todas as áreas amostradas.

10. DISCUSSÃO

10.1. REGISTRO ELETROENCEFALOGRÁFICO

Pela primeira vez em nosso grupo de pesquisa, obtivemos registros de longa duração com múltiplos pontos de amostragem em áreas distintas do cérebro. Esse feito somente foi possível devido às soluções desenvolvidas durante esse trabalho, extensamente descritos no primeiro capítulo.

É possível observar grande variação nos tempos de registro entre os animais. Esse fato é decorrente de dois fatores principais. O primeiro pode ser atribuído à inexperiência de manuseio do aparato e dos animais. Nos primeiros registros (ex: **E1** e **E2**) mais tempo foi despendido em imobilizar os sujeitos experimentais, conectar ao aparato de registro e também durante a realização da injeção. O segundo fator também está associado à falta de experiência, porém em relação à identificação dos eventos eletrográficos em tempo real. Como descrito no protocolo, os animais pertencentes ao grupo estimulado deveriam ser registrados por 10 minutos depois da identificação dos primeiros disparos epileptiformes. Dificuldades iniciais nesse processo acarretaram em um maior tempo decorrido antes da segunda estimulação nos primeiros animais pertencentes à esse grupo.

10.2. IDENTIFICAÇÃO VISUAL DE EVENTOS EPILEPTIFORMES INDUZIDOS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO CAÍNICO

No presente trabalho, fomos capazes de reproduzir o modelo agudo de crises epiléticas utilizando injeção intrahipocampal de ácido caínico.

Não foram observadas diferenças estatísticas nos comportamentos gerais das crises entre os grupos experimentais (figura 36), o que pode indicar que o estímulo aplicado durante o período basal não é capaz de alterar a propensão de crises, nem o seu comportamento.

O animal **E1**, pertencente ao grupo estimulado, apresentou o maior número de eventos ictais quando comparado com os demais (n=14) e hipotetizamos que isso ocorreu pois ele foi registrado por mais tempo que os demais animais (4419s). Uma possível solução para esse problema seria estipular janelas de tempo definidas após a injeção para todos os indivíduos, independente do protocolo submetido.

Um dos animais a pertencentes ao grupo controle (**C3**), diferentemente dos demais, não desenvolveu alterações eletrográficas elegíveis para a classificação de evento epileptiforme. Apesar de apresentar modificações claras no eeg após a injeção de ácido caínico (Figura 40), não foi observado um aumento significativo na amplitude do sinal, o que pode indicar que o animal apresenta um maior limiar para o desenvolvimento de crises após ação de um agonista glutamatérgico, ou a dose não foi capaz de excitar suficientemente os circuitos locais a ponto de gerar os sinais clássicos de um *status epilepticus* (SE).

Apesar de em muitos artigos os autores apontarem que com a mesma dose utilizada no presente trabalho, 100% dos animais desenvolvem SE (RAEDT *et al.*, 2009; RATTKA; BRANDT; LÖSCHER, 2013), outros não apresentaram a mesma porcentagem de ocorrência de *status* (DREXEL; PREIDT; SPERK, 2012; KLEE *et al.*, 2017).

10.3. IDENTIFICAÇÃO VISUAL DA DINÂMICA DE INÍCIO E PROPAGAÇÃO DE EVENTOS ICTAIS

10.3.1 Grupo controle

Todos as crises dos animais do grupo controle tiveram início no local de injeção, como seria o esperado, porém o recrutamento das demais áreas variou entre os sujeitos amostrais.

O animal **C1** apresentou 2 padrões de recrutamento. O primeiro engloba os hipocampos e a amígdala ipsilateral à injeção e ocorreu nas primeiras crises identificadas. Em seguida, as demais crises tiveram disparos ictais ocorrendo em todas as áreas amostradas.

O animal **C2** somente apresentou disparos epileptiformes com aumento de energia substancial no local da injeção. Mesmo após repetidos eventos de ictais, não ocorreu o acoplamento das demais áreas amostradas. Esse comportamento de crise só foi encontrado neste animal, dentre todos os objetos experimentais de ambos os grupos.

Os animais **C1** e **C4** apresentam recrutamento das demais áreas amostradas, com as crises sempre iniciando no local de injeção e segundos depois

os disparos são perceptíveis nas outras regiões. O animal **C1** inicialmente (primeira e segunda crise) não apresenta disparos epileptiformes na amígdala contralateral, local mais distante do ponto de injeção (hipD). Porém a partir da terceira crise, a atividade é encontrada em todas as áreas amostradas (com exceção da crise 6, que não tem participação da amígdala contralateral).

Sabe-se que diferentes partes do hipocampo apresentam comportamentos distintos durante as crises geradas por injeção intrahipocampal de ácido caínico e que crises iniciadas na porção dorsal tendem a propagarem para a amígdala (AKAIKE *et al.*, 2001). Assim, fomos capazes de gerar crises na porção temporal com espalhamento condizente com os encontrados na literatura.

10.3.2 Grupo estimulado

Semelhante ao observado no grupo controle, os animais apresentaram padrões de comportamento de crise distintos entre si.

A primeira crise registrada do sujeito experimental **E1** acomete os dois hipocampos e a amígdala ipsilateral à injeção. Assim como no outro grupo, acreditamos que essa não é a primeira crise gerada pela ação do ácido caínico e que devido à forma que os experimentos foram conduzidos, esse primeiro evento na verdade corresponde à uma crise mais avançada, justamente por envolver outras áreas além do local de injeção. Ao longo do registro desse animal, é possível observar a ocorrência de outros dois principais padrões, um que envolve somente o hipocampo direito e outro que compreende as 4 áreas amostradas.

Uma das crises do animal E1 apresentou um comportamento distinto dos demais animais de ambos os grupos. A segunda crise acometeu a amígdala direita e o hipocampo esquerdo, porém sem a presença de disparo ictais no local da injeção. O padrão encontrado no hipocampo direito se assemelha à disparos interictais (Figura 43).

Em um trabalho de Avoli e colaboradores em 2013, são discutidos os dois tipos de disparos interictais encontrados em pacientes e em modelos de epilepsia de lobo temporal. Um deles, os disparos de atividade lenta, ocorre no hipocampo e possui forte relação com atividade GABAérgica (AVOLI; DE CURTIS; KÖHLING, 2013). Experimentos *in vitro* demonstram a ocorrência de disparos interictais lentos

em fatias hipocampais antes de crises no hipocampo e no córtex entorrinal de cobaias (UVA; AVOLI; DE CURTIS, 2009). É possível que o que estamos observando na crise 2 do animal **E1** seja resultante dessa atividade inibitória local, que pode acarretar sincronização das áreas adjacentes.

O segundo animal pertencente ao grupo experimental (**E2**), assim como o **E4**, apresenta somente um padrão de comportamento ao longo do período de registro, o primeiro compreendendo ambos os hipocampos e a amígdala ipsilateral à injeção e o outro ocorrendo nas 4 áreas amostradas.

Já o animal **E3** teve os primeiros eventos ictal somente no local de injeção e mais para o final do registro passa a apresentar disparos ictais nas quatro áreas amostradas. Somente nesse animal observamos essa transição abrupta de 1 para 4 áreas apresentando disparos ictais.

Observando a ocorrência de crises nos animais registrados, é possível perceber a diversidade de padrões de espalhamento entre eles e, em alguns casos, entre as crises do próprio animal. Em um trabalho de 2018, Karoly e colaboradores utilizam uma abordagem com modelos computacionais para obter informações sobre os padrões de crises de 12 pacientes e concluem que é possível observar padrões estereotipados de desenvolvimento de crises, e que isso deve-se às conexões das redes envolvidas na ictogênese (KAROLY *et al.*, 2018).

Em nossos animais, perdemos os passos iniciais de geração e desenvolvimento dos disparos no foco inicial e nas demais áreas. Porém, mesmo somente possuindo registro de crises mais avançadas, é possível observar a evolução da atividade ictal saindo do foco para as outras estruturas. Esses resultados contribuem para a discussão sobre o quão realmente focais são as epilepsias assim denominadas.

Utilizando um modelo de injeção intrahipocampal, temos a certeza da localização inicial das crises. Porém, em quase todos os animais de ambos os grupos experimentais (exceto **E2**), ao longo do desenvolvimento sucessivo de eventos ictais, são observados disparos nas outras estruturas amostradas, inclusive com eventos que não incluem o hipocampo injetado (ex: E1_02). Assim, ressaltamos a importância da utilização de múltiplos eletrodos distribuídos em diferentes áreas do encéfalo nos registros de processos ictogênicos e o

acompanhamento de crises sucessivas para a compreensão dos mecanismos de espalhamento de atividade ictal.

Na maioria dos artigos publicados sobre TLE, os registros são concentrados no hipocampo (RAEDT *et al.*, 2009; RATTKA; BRANDT; LÖSCHER, 2013), o que faz com que a existência de focos secundários e detalhes sobre o espalhamento da atividade ictal passem despercebidos, comprometendo a identificação correta dos tipos de crise.

**CAPÍTULO 3 - PROCESSAMENTO DOS REGISTROS ENCEFALOGRÁFICOS E
ANÁLISES DE SIMILARIDADE APLICADAS À DINÂMICA DE PROPAGAÇÃO
ICTAL**

Processo objetivo

A epilepsia de lobo temporal é classificada como uma síndrome focal sintomática, ou seja, as crises são originadas em estruturas temporais e podem propagar para áreas adjacentes (ENGEL, J., 2001). Porém, como ocorre o espalhamento da atividade epileptiforme?

Observando o desenvolvimento de uma crise em micro escala, grupos de pesquisa demonstraram que microdomínios celulares locais são ativados, determinados por suas conexões sinápticas (BRAGIN; WILSON; ENGEL, 2000; FELDT MULDOON; SOLTESZ; COSSART, 2013). A atividade desses microcircuitos pode ser percebido mesmo em registros de potenciais de campo, onde o início da crise é dessincronizado, devido à ativação destes microdomínios e com o desenvolvimento do *ictus*, se tornam progressivamente mais síncronos até atingir o ápice antes do fim da crise, caracterizado por um silenciamento abrupto do sinal (FELDT MULDOON; SOLTESZ; COSSART, 2013; JIRUSKA *et al.*, 2013).

Assim, a dinâmica temporal parece ser essencial para o acoplamento das estruturas envolvidas no espalhamento de uma atividade ictal, sendo o sincronismo entre redes de neurônios sinápticamente conectados um possível mecanismo pelo qual isso acontece (DE CASTRO MEDEIROS *et al.*, 2018; JIRUSKA *et al.*, 2013; PASQUETTI *et al.*, 2019; PENFIELD; JASPER, 1954). De fato, a aplicação de estímulos não periódicos a fim de se perturbar a sincronização em modelos de epilepsia vem sendo estudados como um possível tratamento para epilepsias refratárias (COTA *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA, JASIARA CARLA *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA, J. C. *et al.*, 2018).

Uma forma de mensurar o qual sincrônico dois sinais são é através da correlação linear, onde a dinâmica de suas variações ao longo do tempo refletem a relação entre eles, porém sem indicar a direcionalidade, ou seja, se a atividade do sinal A determina o sinal B, ou vice-versa (BUONACCORSI *et al.*, 2001). Na seguinte seção, essa será a medida utilizada para as análises das dinâmicas temporais de circuitos pertencentes ao lobo temporal em um modelo de crises focais e agudas e a influência do estímulo elétrico intracerebral na promoção de sincronismo será observada.

11. OBJETIVOS

11.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os padrões eletrofisiológicos encontrados durante os períodos pré-ictal, ictal e pós ictal
- Comparar os padrões encontrados entre os grupos experimentais
- Verificar a dinâmica de recrutamento de áreas durante os eventos ictais
- Comparar as dinâmicas encontradas entre os grupos experimentais
- Verificar a dinâmica de comunicação entre áreas antes e depois de injeção de ácido caínico.
- Verificar a dinâmica de comunicação entre áreas antes e depois dos estímulos.
- Verificar influência do estímulo no padrão das crises

12. MATERIAIS E MÉTODOS

12.1 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO

Foram utilizados os registros eletrofisiológicos obtidos de acordo com os protocolos descritos no capítulo 2. Os dados foram pré-processados e a frequência de amostragem reduzida de 20k para 5k. Foram utilizados filtros passa-alta de 1 Hz, passa baixa de 450 Hz e um filtro *notch* para frequências de 60Hz e seus harmônicos, atenuando possíveis interferências da rede elétrica.

Para a retirada de ruídos, o sinal foi normalizado pela média de 5s da atividade basal de cada canal do registro.

12.2 CÁLCULO DA ENERGIA DO SINAL E Z-SCORE

A energia do sinal foi calculada em cada um dos animais em cada canal individualmente, em janelas de 1s com intervalos de 10 ms utilizando a equação abaixo, sendo X o sinal a ser analisado e n o intervalo da janela:

$$E = \sum_{n=0}^{n=N} |X(n)|^2$$

Para o cálculo do *z-score*, foram utilizados os valores de média e desvio padrão de cada trecho de 1s, sendo o valor obtido de acordo com a fórmula abaixo, onde \bar{X} corresponde à média da energia extraída do trecho e σ ao desvio padrão da média.

$$Zscore = \frac{X_n - \bar{X}}{\sigma}$$

12.2 IDENTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DE EVENTOS EPILEPTIFORMES

Para a identificação automática da ocorrência de possíveis eventos epileptiformes foram utilizados os pontos de aumento na energia do sinal. Os picos de energia foram identificados com a utilização da função *findpeaks* (MATLAB®) e somente

foram considerados aumentos superiores ao valor da média total do sinal + 3 desvio-padrão, com duração mínima de 30 ms.

12.3 ANÁLISE DE SIMILARIDADE

Utilizamos a correlação de Pearson para analisar o quão semelhantes são os sinais de dois registros ao longo do tempo. Ela oferece uma indicação da relação linear entre os dados amostrados em uma escala que varia entre -1 (sinais negativamente correlacionados), 0 (sinais não correlacionados) até 1 (sinais perfeitamente correlacionados), e pode ser utilizada como um indicador de sincronia (COHEN; KOHN, 2011).

Para realizar a comparação par a par das áreas de interesse foi necessário fazer uma redução no número de pontos do sinal (Figura 50). Para cada janela de análise foi gerada uma matriz de correlação de 16x16 canais (4 por área) com valores de ρ de Pearson. Em seguida, dentro de cada conjunto de 4 canais de uma mesma região, foi feita a mediana dos valores de ρ por canal, reduzindo assim uma matriz de 4x4 a 4 valores principais. Como todos os 4 valores principais equivalem à uma mesma região e nos interessa a comparação entre as diferentes estruturas, uma nova mediana foi feita desses valores, resultando em um valor de ρ por área de interesse em cada janela de amostragem. A diagonal principal não foi considerada por representar os valores de correlação de cada canal com ele mesmo.

As combinações inter áreas geradas foram: 1) amígdala direita – hipocampo direito; 2) amígdala direita – hipocampo esquerdo; 3) amígdala direita – amígdala esquerda; 4) hipocampo direito – hipocampo esquerdo; 5) hipocampo direito – amígdala esquerda; 6) amígdala esquerda – hipocampo esquerdo. Também foram calculadas as combinações intra área: 7) amígdala direita – amígdala direita; 8) amígdala esquerda – amígdala esquerda; 9) hipocampo direito – hipocampo direito; e 10) hipocampo esquerdo – hipocampo esquerdo.

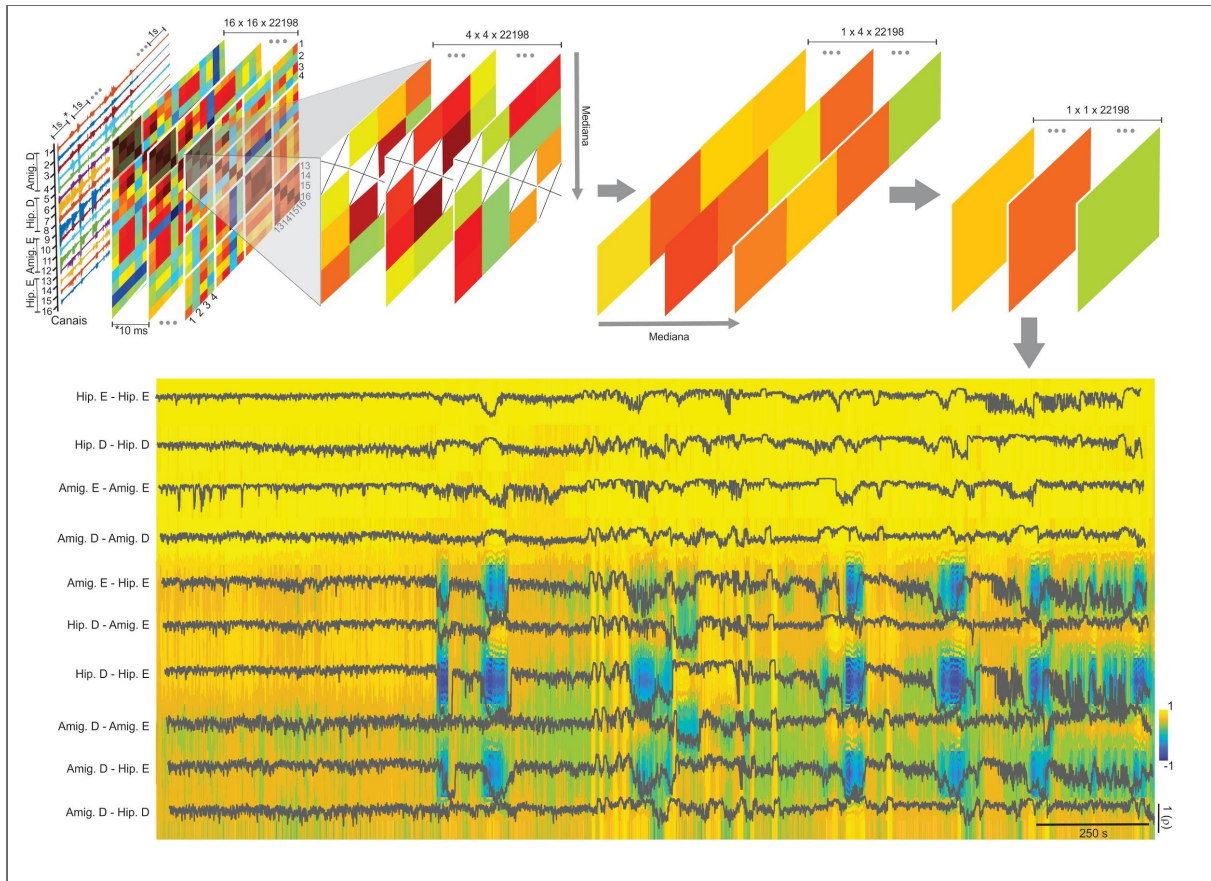


Figura 50: Esquema das etapas de redução do número de pontos para o cálculo da correlação de Pearson ao longo do tempo a partir de uma matriz de 16x16. A primeira matriz compreende os valores de todos os canais, combinados par a par. Em seguida, cada coluna das matrizes 4x4 de cada área é reduzida a 1 ponto, resultando em 4 pontos e em seguida em 1 ponto por janela de amostragem. A diagonal principal, não considerada nas análises (por ser igual a 1) foi representada pela célula branca com um x na matriz de correlação.

Os parâmetros de janelamento para análise utilizado foram os mesmos empregados no cálculo de energia do sinal. Para o cálculo foi utilizada a equação abaixo, onde X e Y são os sinais a serem correlacionados, \bar{X} e \bar{Y} são a média de cada sinal e i o intervalo da janela:

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}) - (Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2][\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2]}}$$

12.3.1 Similaridade durante os eventos

Os eventos ictais identificados em 12.2 foram utilizados como janelamento para análises de similaridade, assim como 5s antes e depois de cada evento, correspondentes aos períodos pré-ictal e pós-ictal, respectivamente.

Para a análise de similaridade durante os eventos ictais, foram utilizadas as correlações cruzadas entre áreas e as autocorrelações. Para cada combinação de canais foi calculado o coeficiente de determinação (quadrado do coeficiente de Pearson - R^2) e em seguida calculada a mediana para gerar as curvas de correlação.

12.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES ICTAIS

Para investigar as inter-relações entre as variáveis analisadas, utilizamos a análise de componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis* - PCA). A análise consiste em uma transformação linear dos dados em que suas componentes mais relevantes são representadas nos eixos principais. No presente trabalho, as componentes utilizadas foram os valores de correlação de Pearson encontrados nos períodos pré-ictal, ictal e pós ictal obtidos para os 10 pares de comparação . Para isso foi utilizada a função pca (MATLAB®).

13. RESULTADOS

13.1 IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS EPILEPTIFORMES

13.1.1 Grupo controle

13.1.1.1 Animal C1

Na figura 51, temos a energia normalizada (z-score) de todos os canais amostrados por área (A) e a correlação de Pearson para todos os pares de comparação utilizados ao longo do tempo (B) para o primeiro animal do grupo controle.

No período basal, não são encontrados aumentos expressivos na energia do sinal. Somente após a injeção de ácido caínico, vemos energias muito superiores à média do sinal, correspondentes aos eventos ictais.

Nesse animal, antes da injeção, vemos uma alta correlação entre os pares amostrados, em especial nos pares intra-área (51B - 4 últimos pares de regiões) entre os hipocampus esquerdo e direito (51B - HipD-HipE). Após a injeção de ácido caínico, são observadas correlações negativas (marcações em azul) nas áreas que envolvem o hipocampo esquerdo durante as crises.

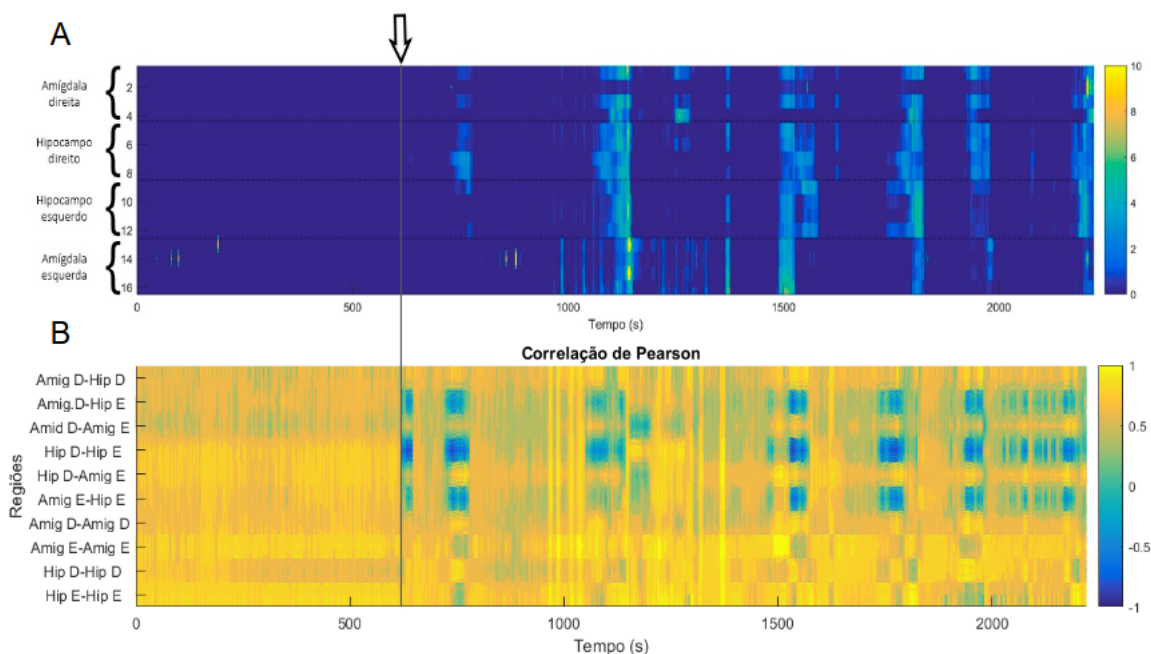


Figura 51: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal **C1**. A: Energia normalizada (z-score): em x temos o tempo de registro, em y as áreas amostradas e a intensidade da energia foi representada pela escala de cores. Quanto mais próximo de amarelo, maior a energia naquele instante de tempo. B: Correlação de Pearson para os 10 pares de comparação: em x temos o tempo de registro, em y os pares de áreas correlacionados e o valor de p

de Pearson foi representado pela escala de cor, sendo amarelo igual à uma alta correlação positiva e azul uma alta correlação negativa. A linha vertical sinalizada pela seta indica o início do período pós-injeção.

13.1.1.1.2 Animal C2

No segundo animal do grupo controle, são observados aumentos na energia do sinal após a injeção de ácido caínico (Figura 52A), correspondente aos eventos ictais identificados.

Os valores de correlação aumentam visivelmente após a injeção em todos os pares de área, em especial entre os dois hipocampus e nos pares intra-áreas (Figura 27B - 4 últimos pares de áreas).

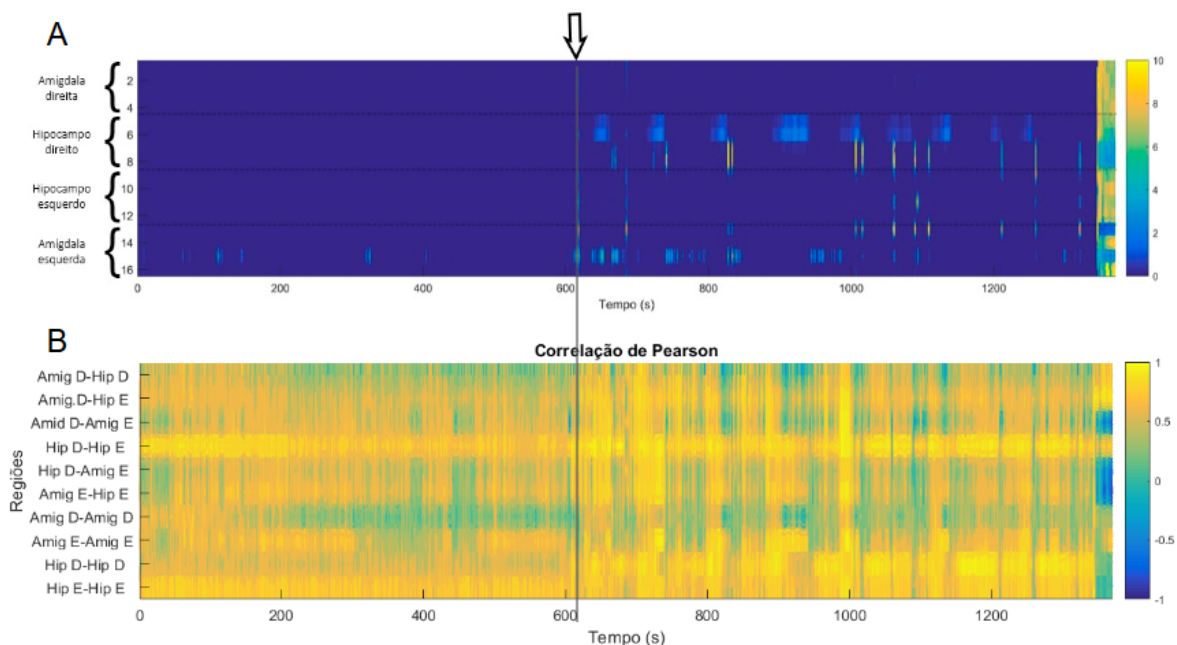


Figura 52: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal **C2**. Detalhes da imagem similar ao descrito na figura 51.

13.1.1.1.3 Animal C3

O animal C3 não apresentou aumento de energia significativo após a injeção de ácido caínico como pode ser observado na figura 53. As marcações em amarelo observadas na imagem de z-score são correspondentes à ruídos no registro.

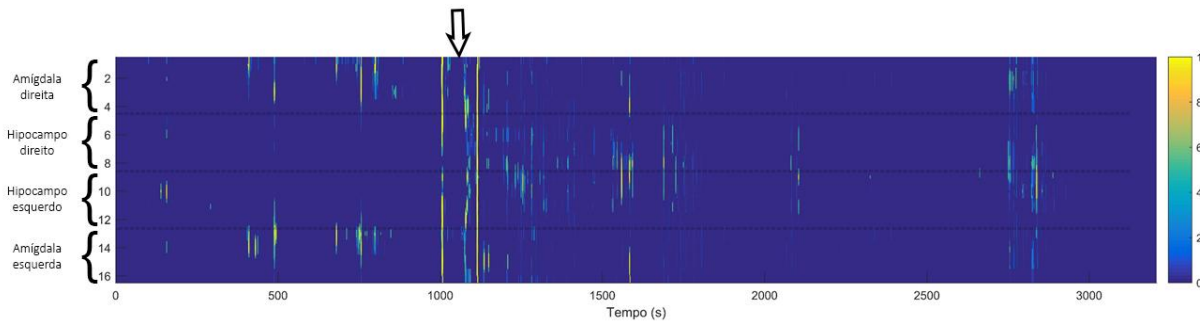


Figura 53: Energia normalizada (*z-score*) ao longo do tempo de registro do animal **C3**. Detalhes da imagem similar ao da figura 51.

13.1.1.1.4 Animal C4

Na figura 54A temos a energia normalizada do registro do animal **C4** ao longo do tempo. Após a injeção é observado aumentos de energia correspondente aos eventos ictais, claramente distinguíveis da atividade basal.

Em B temos a correlação de Pearson para os 10 pares de áreas utilizados para a comparação. Após a injeção temos um aumento de correlação durante os eventos correspondentes ao aumento de energia em A, além do aparecimento de correlações negativas nos pares AmyD-HipD, HipD-HipE e HipD-AmyE.

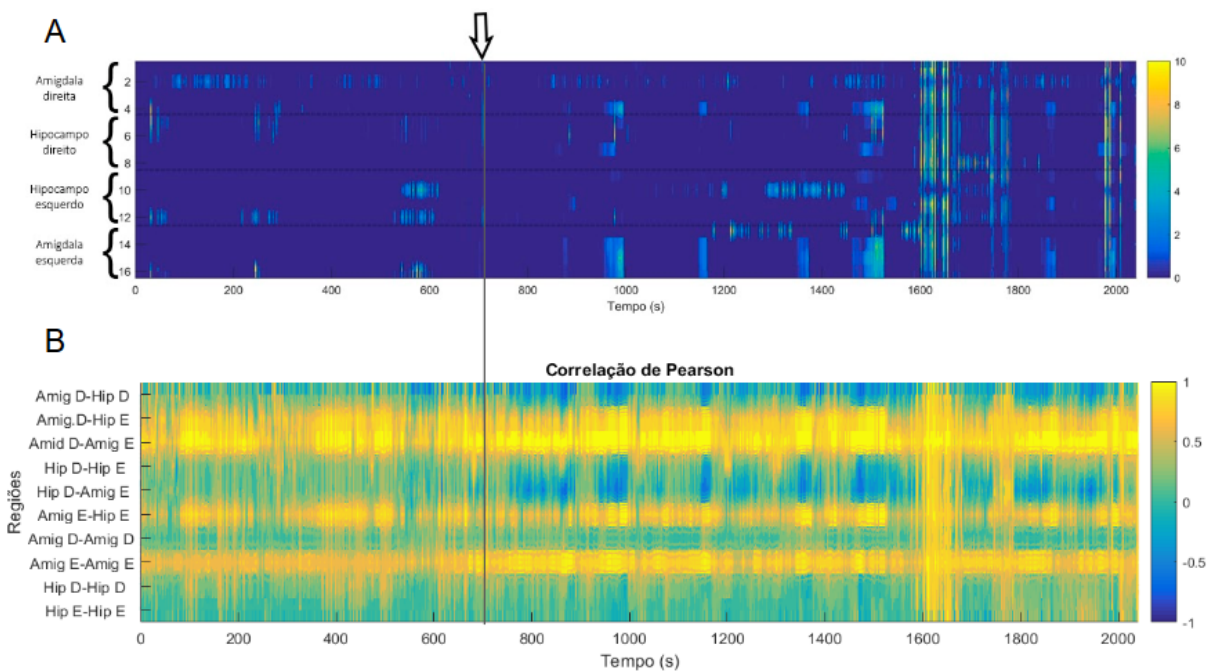


Figura 54: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal **C4**. Detalhes da imagem similar ao descrito na figura 51.

13.1.1.2 Grupo estimulado

13.1.1.2.1 Animal E1

Na figura 55A temos a energia normalizada do animal E1 ao longo do tempo. após a injeção (indicada pela seta), temos a ocorrência de eventos com aumento de energia, identificados como ictais.

Em 55B, temos a correlação de pearson para os 10 pares analisados, ao longo do tempo. As correlações intra-áreas e entre os dois hipocampus apresentaram o aumento mais expressivo após a injeção.

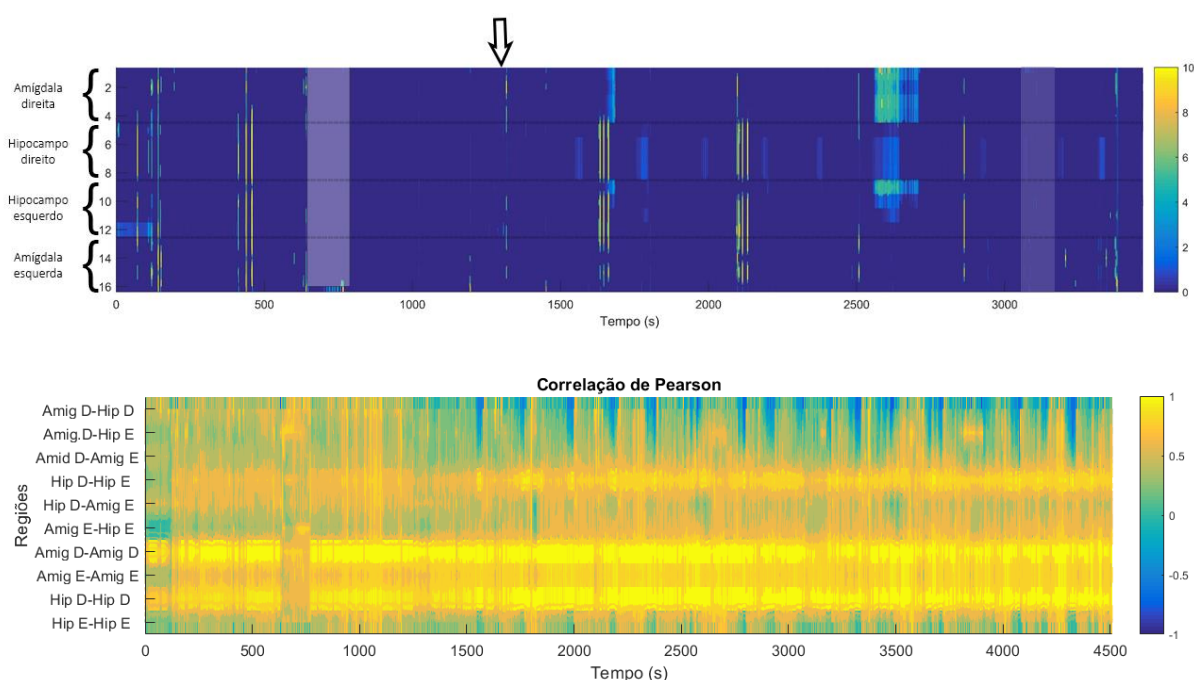


Figura 55: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal **E1**. A: Energia normalizada (z-score): em x temos o tempo de registro, em y as áreas amostradas e a intensidade da energia foi representada pela escala de cores. Quanto mais próximo de amarelo, maior a energia naquele instante de tempo. B: Correlação de Pearson para os 10 pares de comparação: em x temos o tempo de registro, em y os pares de áreas correlacionados e o valor de p de Pearson foi representado pela escala de cor, sendo amarelo igual à uma alta correlação positiva e azul uma alta correlação negativa. A seta indica o início do período pós-injeção e as faixas em cinza correspondem aos períodos de estimulação.

13.1.1.2.2 Animal E2

Em 56A temos a energia normalizada do animal E2. Assim como nos demais sujeitos experimentais, vemos um aumento de energia após a injeção, que

correspondem às crises. Na análise de correlação de Pearson para os 10 pares de comparações entre áreas, vemos que a correlação aumenta expressivamente em todas as áreas após a injeção, e mais ainda após o estímulo durante a crise.

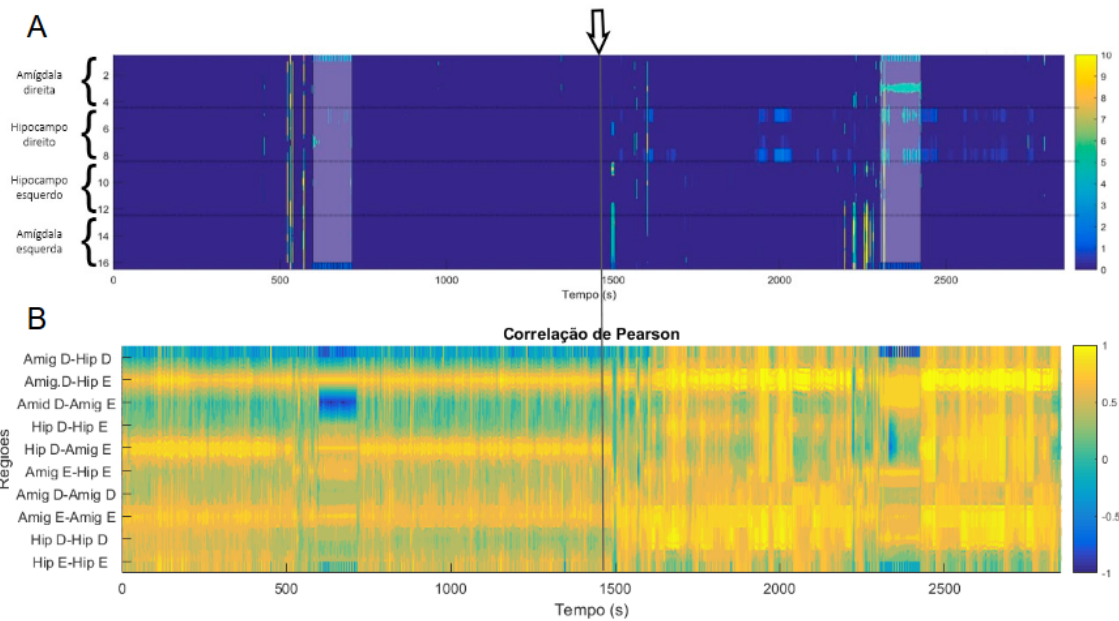


Figura 56: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal **E2**. Detalhes da imagem similar à legenda da figura 55.

13.1.1.2.3 Animal E3

Na figura 76A, temos a energia normalizada do animal **E3** ao longo de todo o tempo de registro. Após a injeção de ácido caínico, sinalizado pela seta, temos a emergência de períodos com energias maiores que as encontradas no basal, identificados como eventos ictais.

Em B, temos que a correlação entre os pares de comparação também aumentou após a injeção de ácido caínico.

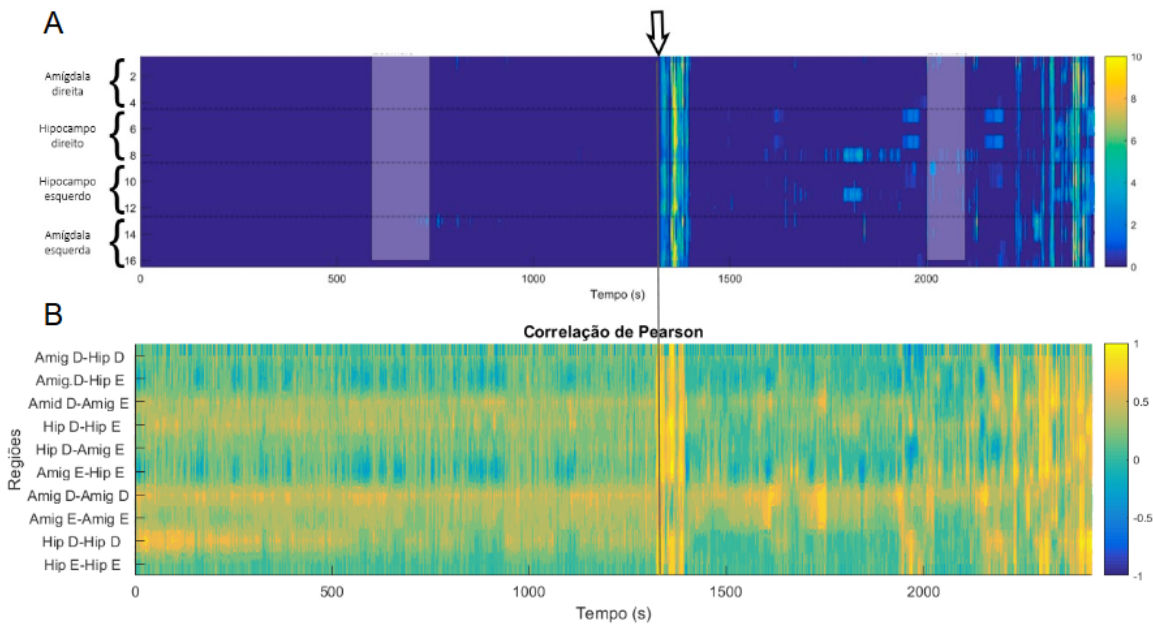


Figura 57: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal **E3**. Detalhes da imagem similar à legenda da figura 72.

13.1.1.2.3 Animal E4

Na figura 79A temos a energia normalizada do animal **E4** ao longo do tempo de registro. Observamos pronunciado aumento em eventos após a injeção de ácido caínico, identificados como ictais.

Na correlação, temos um aumento de correlação nos pares AmyD-AmyE, AmyD-AmyD e AmyE-AmyE após a injeção. Depois do segundo estímulo, todos os pares de regiões apresentam valores de correlação maior do que antes da estimulação elétrica.

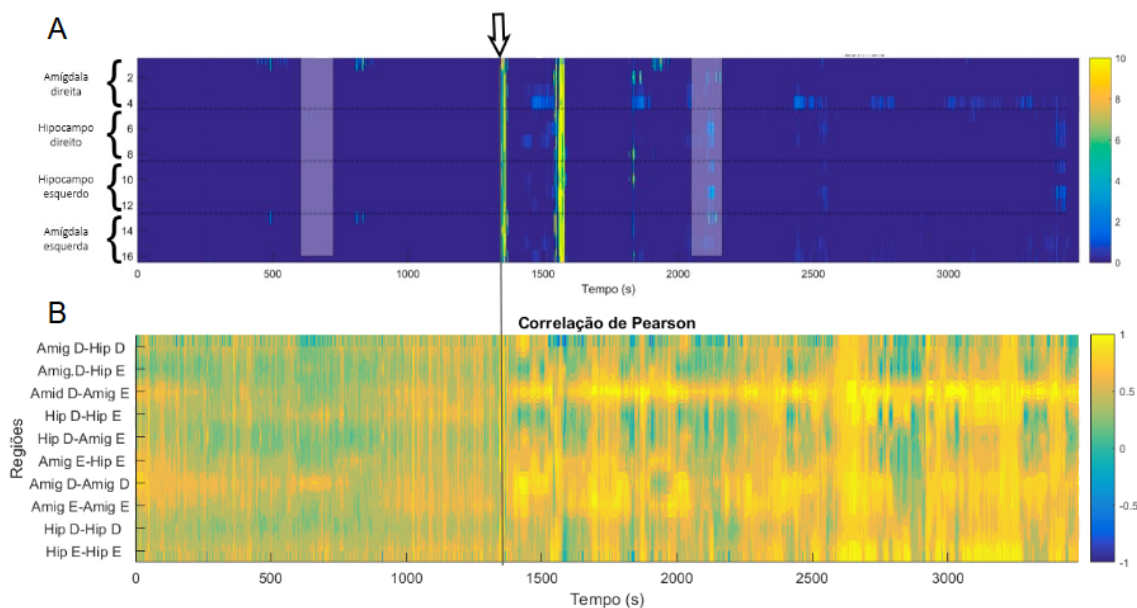


Figura 58: Energia normalizada e correlação de Pearson ao longo do tempo de registro do animal **E4**. Detalhes da imagem similar à legenda da figura 55

13.1.2 Identificação dos picos de energia

Os picos de energia identificados na seção 13.1.1 foram utilizados para a classificação dos eventos ictais. Realizamos a correlação entre o método subjetivo de identificação visual utilizado na clínica médica com o método objetivo de identificação automática aplicada na dissertação (Figura 59).

Em ambos os grupos a correlação foi bem alta, com valores de p maiores que 0,993, o que nos indica uma relação linear entre os dados e uma alta confiabilidade na identificação dos eventos.

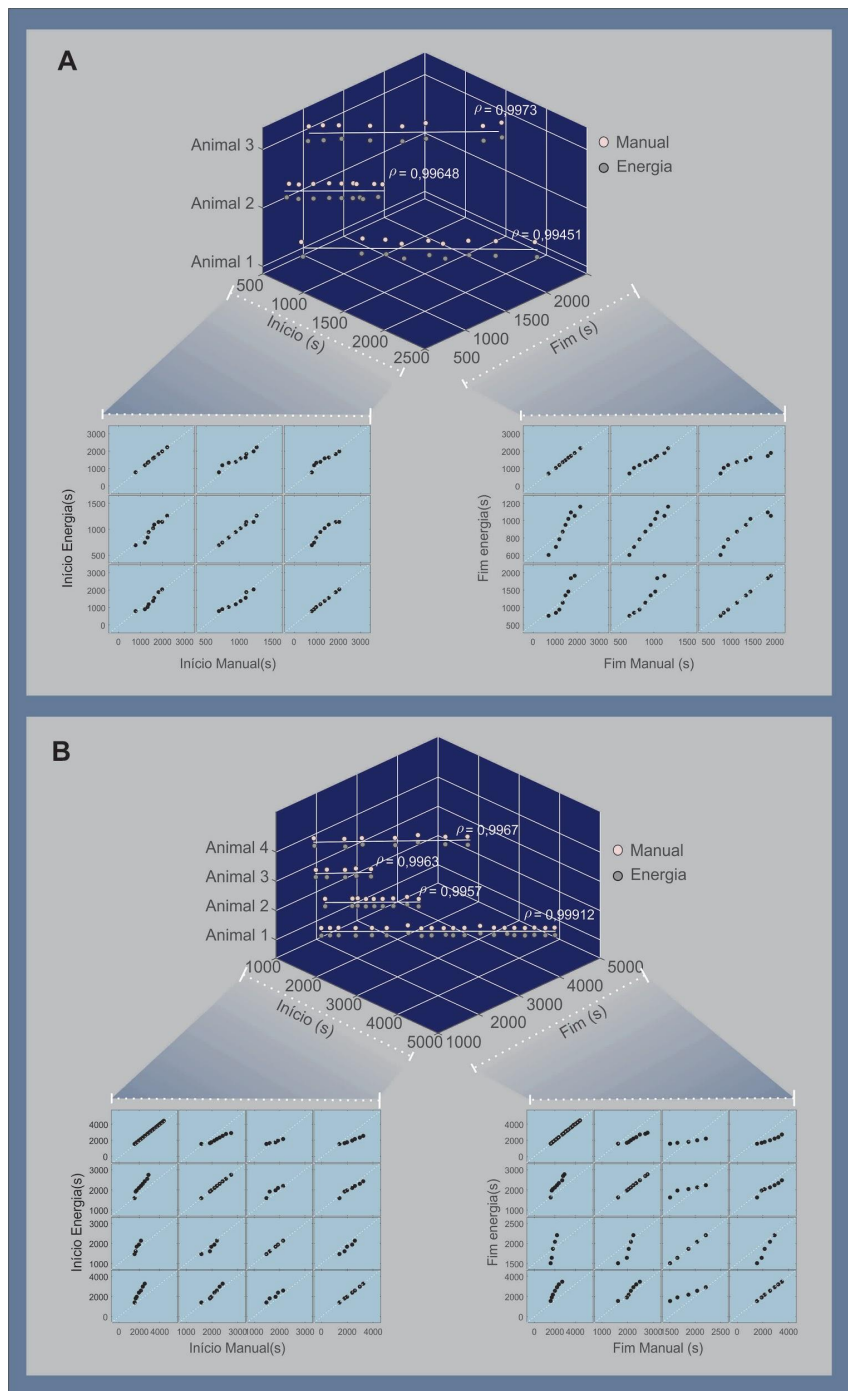


Figura 59: Correlação entre os eventos ictais identificados visualmente e utilizando os picos de energia no sinal. Valores de p estão representados na figura. A: grupo controle. B: Grupo estimulado.

13.2 ANÁLISE DE SIMILARIDADE POR EVENTO

Para compreender as dinâmicas dos diferentes padrões de crise encontrados nos animais, realizamos análises de similaridade dos eventos ictais de cada animal, utilizando como referência os períodos definidos no capítulo 2.

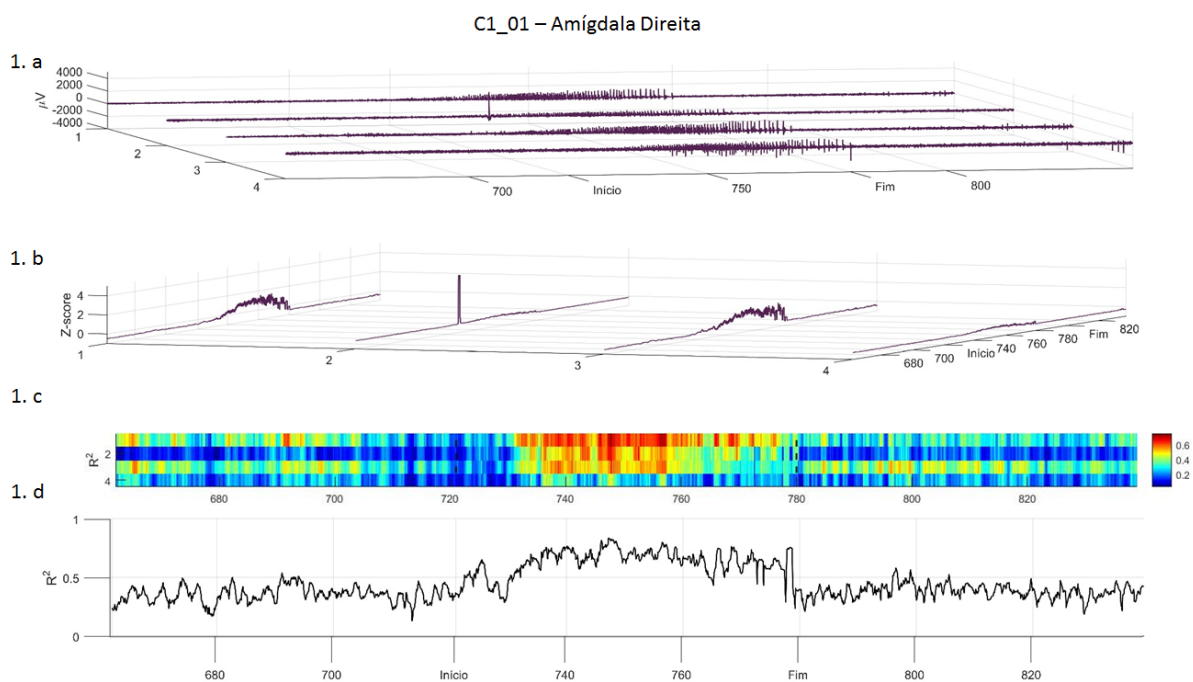
13.2.1 Grupo Controle

13.2.1.1 Animal C1

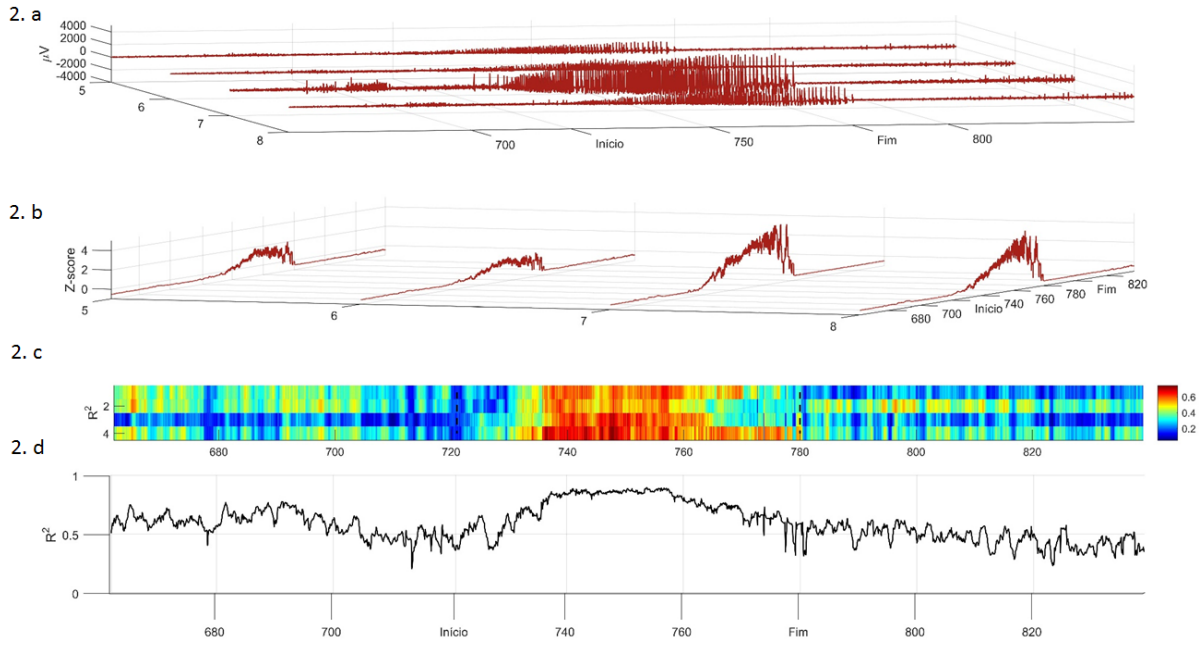
No capítulo 2, foi identificado dois padrões de crise no animal C1, de acordo com as áreas envolvidas em cada evento. O primeiro padrão corresponde à crises que iniciam sua atividade no hipocampo direito e são vistos disparos na amígdala direita e no hipocampo esquerdo instantes depois, sem o recrutamento da amígdala contralateral.

Nas três áreas envolvidas, é observado um aumento significativo na energia do sinal durante o período ictal (Figura 60 1b, 2b e 3b). A correlação entre os canais de cada área (correlação intra) aumentam na amígdala e hipocampo direito (Figura 60 1c, 2c) enquanto no hipocampo contralateral, é observada uma diminuição do valor de R^2 durante a crise (Figura 60 3c).

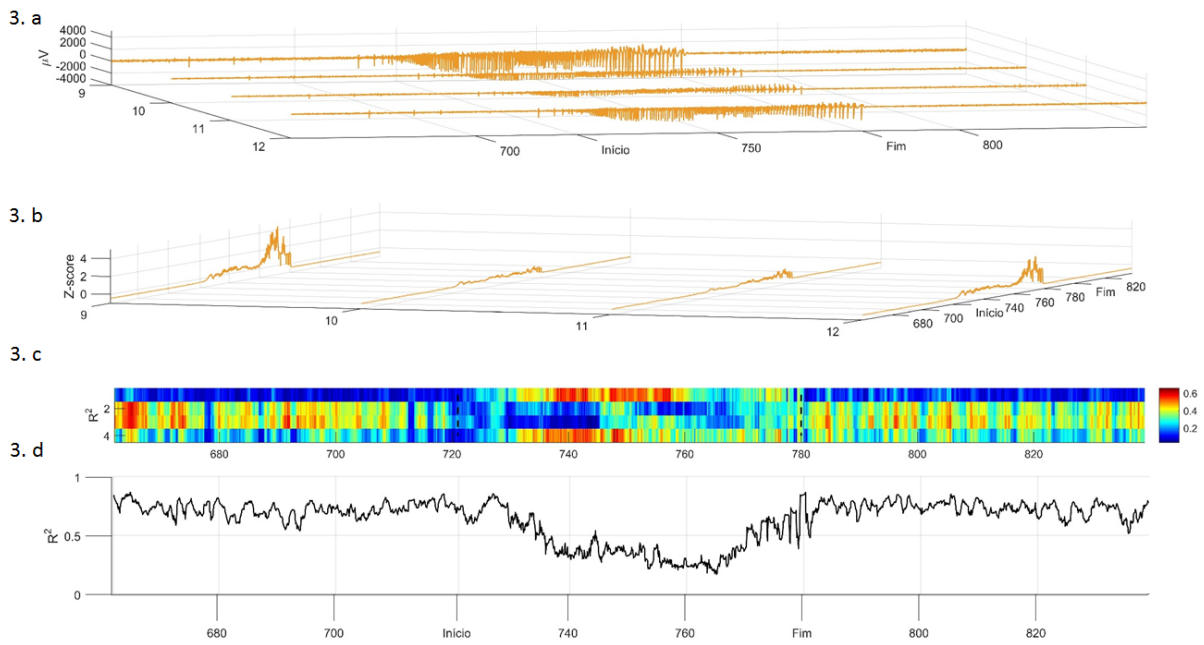
Na amígdala esquerda, não foi observado disparos ictais (Figura 60 4a) nem aumento de energia (Figura 60 4b). A correlação entre os eletrodos dessa área apresentou uma leve diminuição durante o período analisado (Figura 60 4d).



C1_01 – Hipocampo Direito



C1_01 – Hipocampo Esquerdo



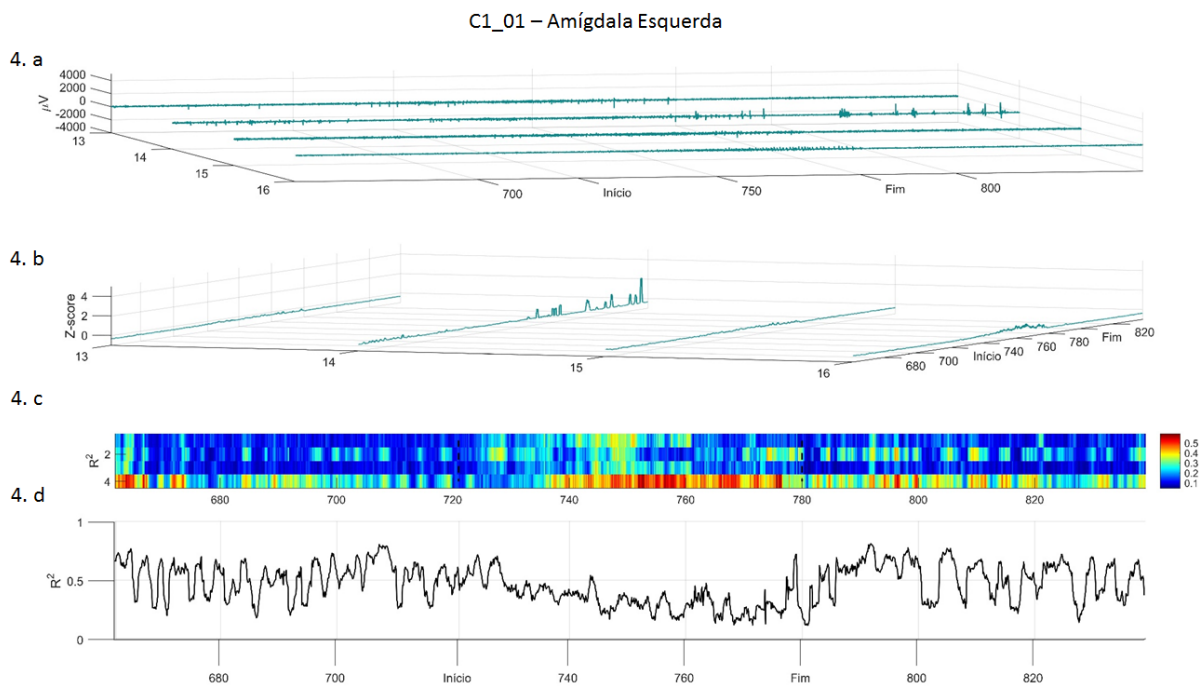


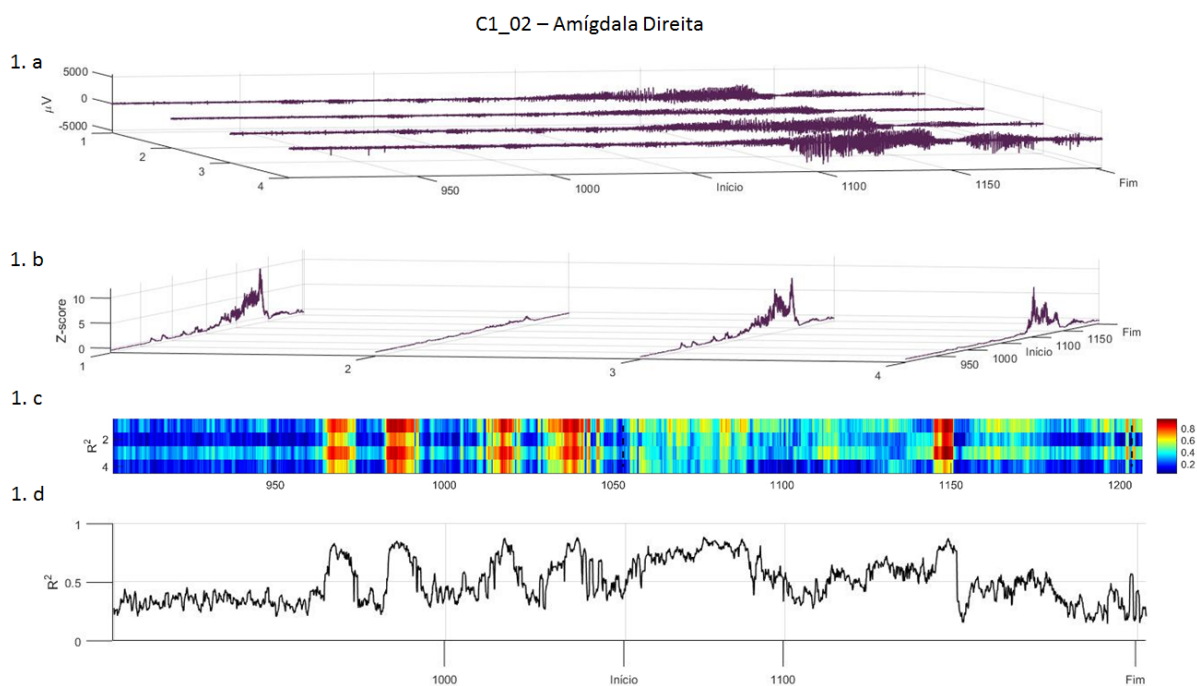
Figura 60: Análise de energia e similaridade durante o primeiro padrão ictal do animal C1. Subfiguras foram identificadas por números, referentes às áreas analisadas, sendo **1**: Amígdala direita, **2**: Hipocampo direito, **3**: Hipocampo esquerdo e **4**: Amígdala esquerda; e letras de acordo com a análise realizada. **a**: Registro do período ictal. No eixo x temos o tempo, com um período pré e pós crise, em y os canais referentes à área e em z a amplitude do sinal. **b**: energia normalizada do período. em x temos os canais referentes à área analisada, y o valor de z-score e z o eixo do tempo. **c**: Análise de correlação entre os canais da área analisada. Em x temos o eixo tempo. Em y, a linha 1 representa os valores do coeficiente de correlação entre o primeiro canal em relação aos demais, 2 do segundo canal em relação aos demais, e assim por diante, ao longo do tempo. A escala de cor em indica o valor do R^2 , sendo vermelho o máximo e azul o mínimo. **d**: Em x temos a escala de tempo e em y a mediana do valor do coeficiente de correlação para todos os canais pertencentes à área.

Nas análises de correlação entre-áreas, vemos um aumento expressivo na similaridade do sinal entre a amígdala direita e o hipocampo esquerdo durante o período de crise (Figura 61, azul escuro). Entre a amígdala direita e amígdala esquerda (Figura 61, amarelo), hipocampo direito e hipocampo esquerdo (Figura 61, roxo) e hipocampo direito e amígdala esquerda (Figura 61, verde), é observado um pequeno aumento, durante o *ictus*. Já nos pares amígdala direita e hipocampo esquerdo (Figura 61, laranja) e amígdala esquerda e hipocampo esquerdo (Figura 61, azul claro) não vemos nenhuma variação nos valores de R^2 antes, durante e depois do *ictus*.

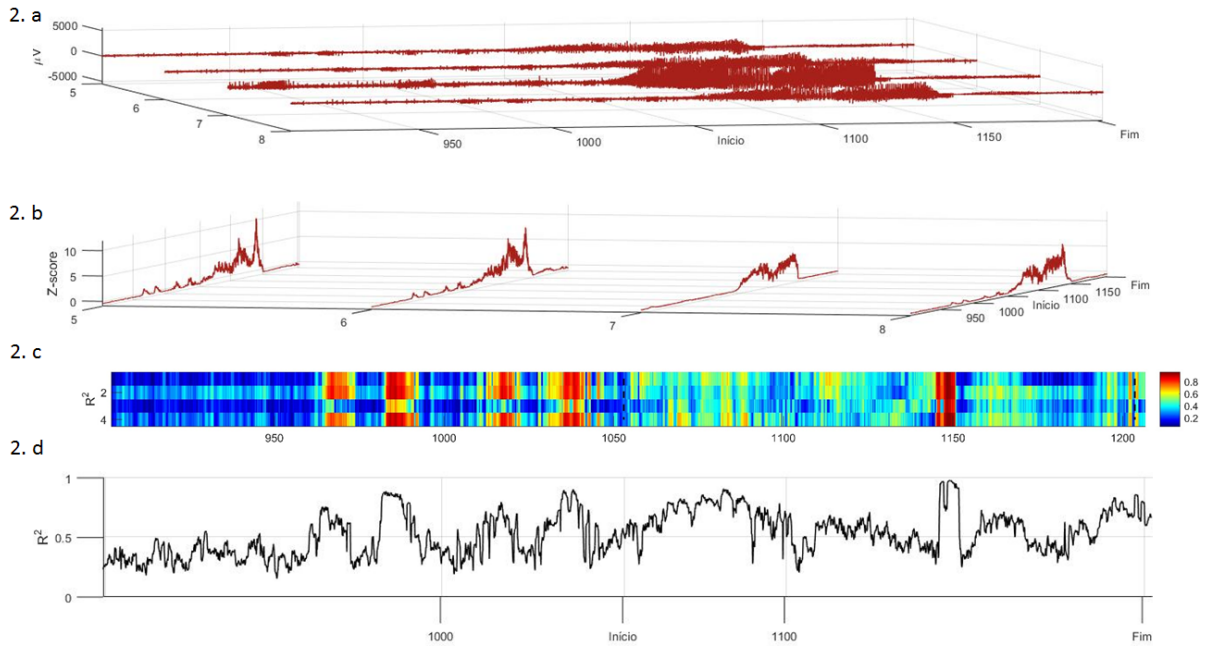


Figura 61: Análise de correlação inter-áreas do primeiro padrão de crise identificado no animal C1. Em todos os gráficos, no eixo x temos o tempo do registro e em y os valores do coeficiente de correlação, que variam de 0 (nada correlacionado) a 1 (completamente correlacionado). Em azul: comparação entre a amígdala direita e o hipocampo esquerdo; laranja: amígdala direita e hipocampo esquerdo; amarelo: amígdala direita e amígdala esquerda; roxo: hipocampo direito e hipocampo esquerdo; verde: hipocampo direito e amígdala esquerda e azul claro: amígdala esquerda e hipocampo direito.

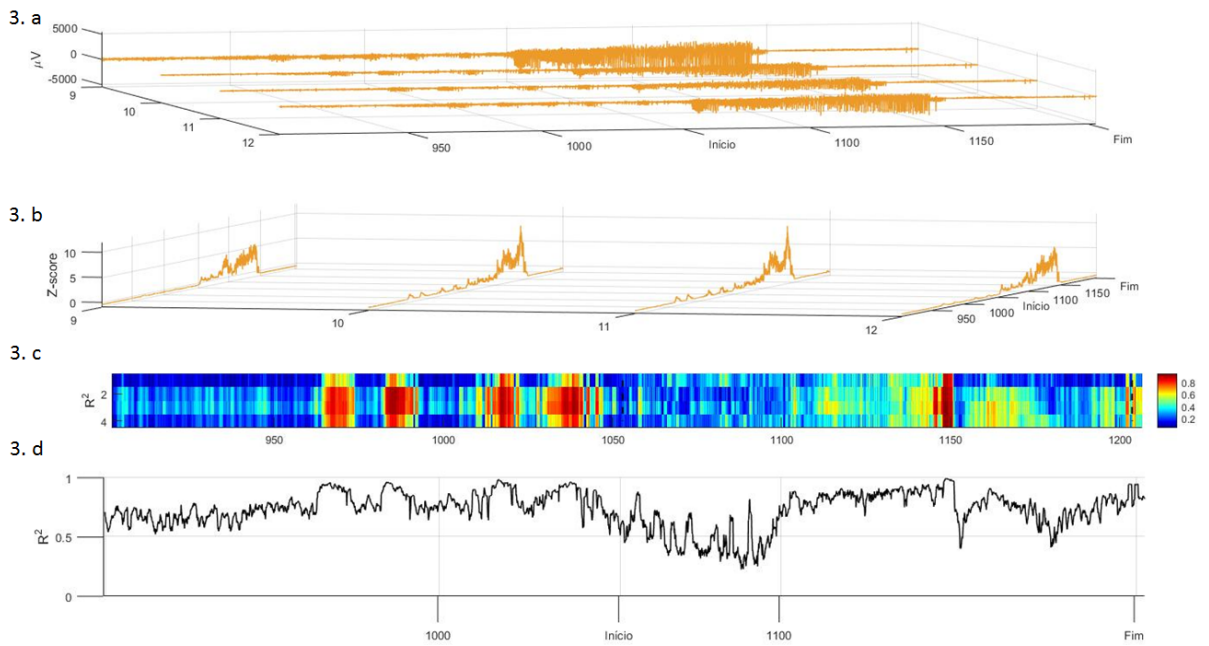
No segundo padrão de crise identificado, todas as áreas amostradas foram recrutadas. Isso pode ser observado pelo padrão de disparo apresentado no registro e pelo aumento de energia normalizada durante o período ictal (Figura 62: 1a e b, 2a e b, 3a e b, 4 a e b). O padrão do coeficiente de correlação de todas as áreas ao longo do tempo foi similar, com bursts de correlação alta pouco antes do início do evento, uma diminuição dos valores no início da crise e um aumento novamente próximo ao fim do evento (Figura 62 1c e d, 2c e d, 3c, d e 4c e d)



C1_02 – Hipocampo Direito



C1_02 – Hipocampo Esquerdo



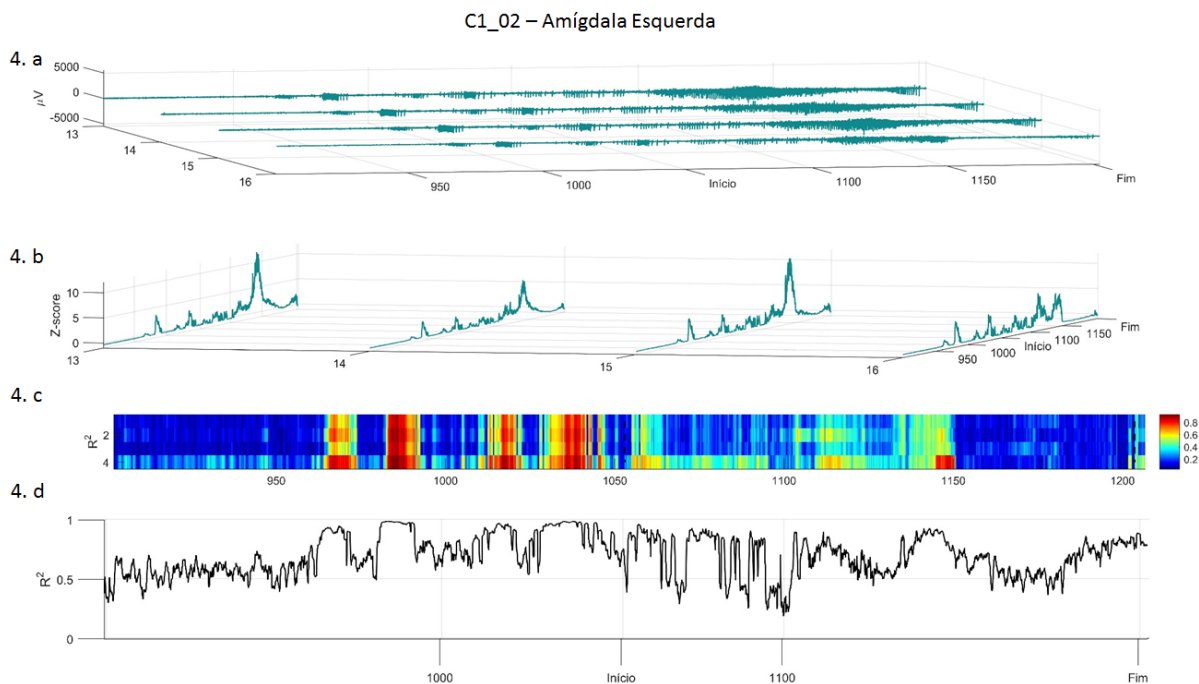


Figura 62: Análise de energia e similaridade durante o segundo padrão ictal do animal C1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

As correlações inter-áreas durante o segundo padrão de crise encontrado no animal C1 apresentaram comportamentos muito similares em todos os pares analisados, com alta correlação pouco antes do início da crise, um retorno aos valores basais durante os primeiros segundos ictais e um novo aumento próximo ao fim do evento (Figura 63).

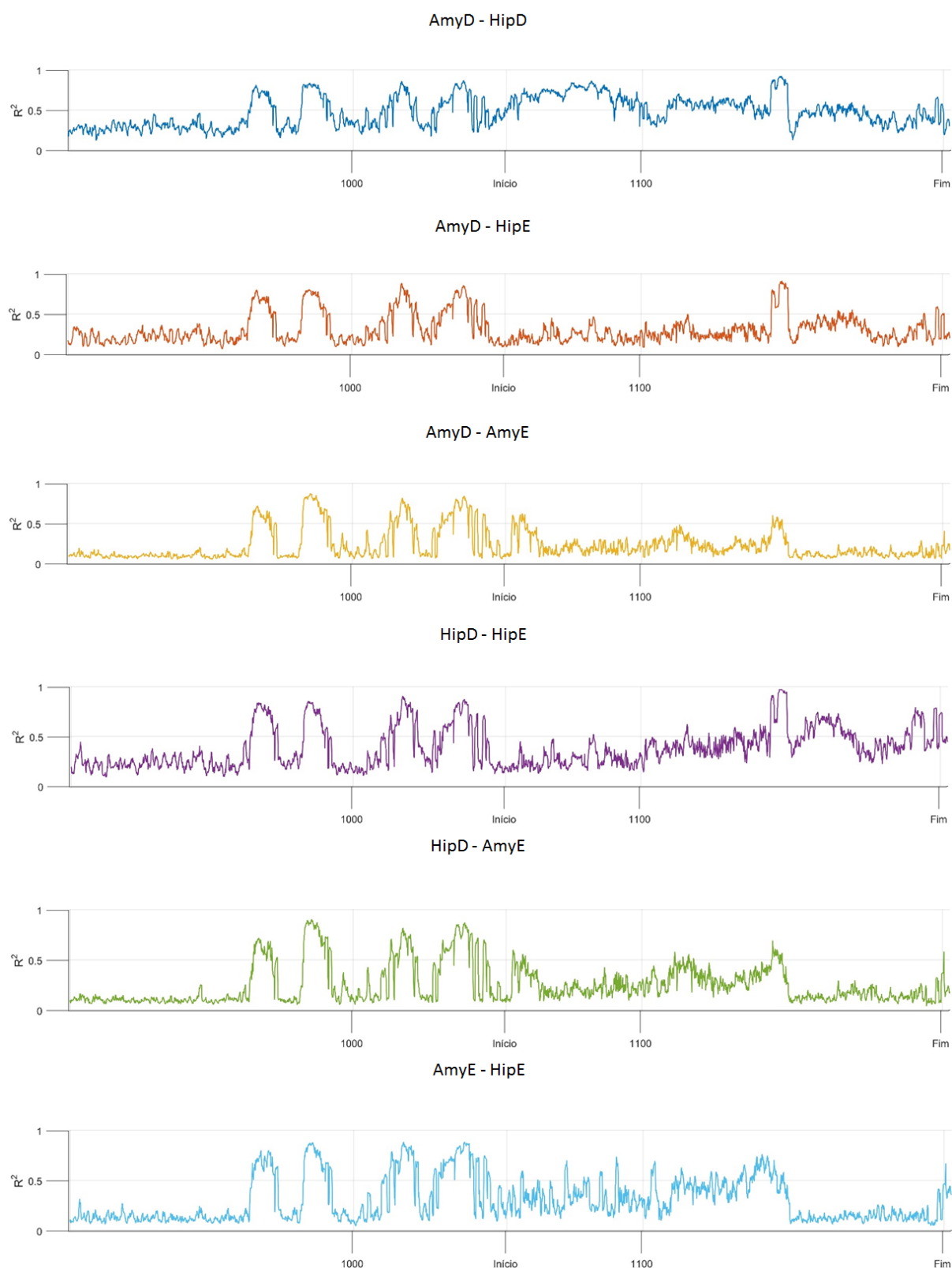


Figura 63: Análise de correlação inter-áreas do segundo padrão de crise identificado no animal C1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

Observando as análises de componente principal (PCA) dos dois tipos de crise encontrado no animal C1 (Figura 64), que resume os resultado encontrados nas

análises de similaridade durante os eventos, claramente são vistos dois padrões distintos de comportamento de crise, assim como foi identificado na caracterização visual no capítulo 2. Mais detalhes dessa análise serão apresentados na seção 13.3

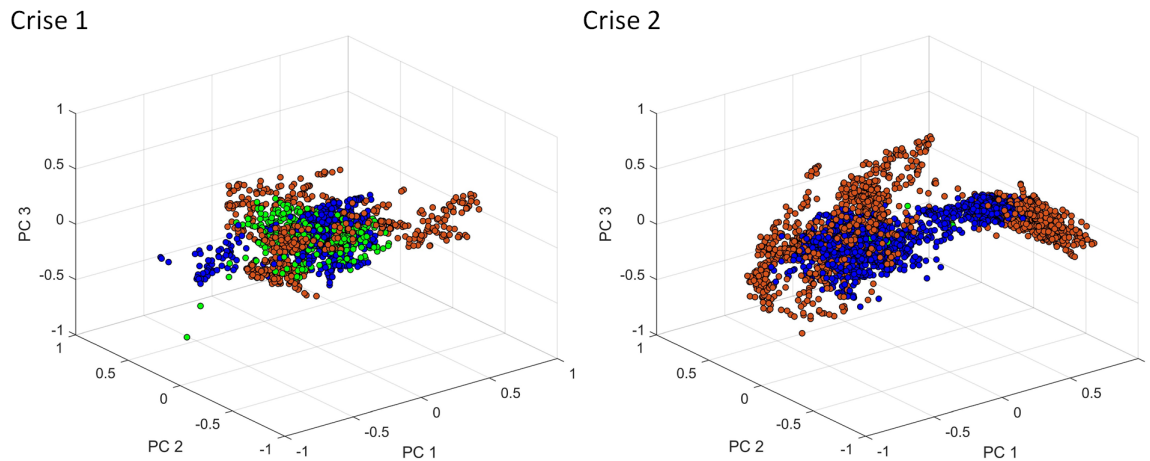
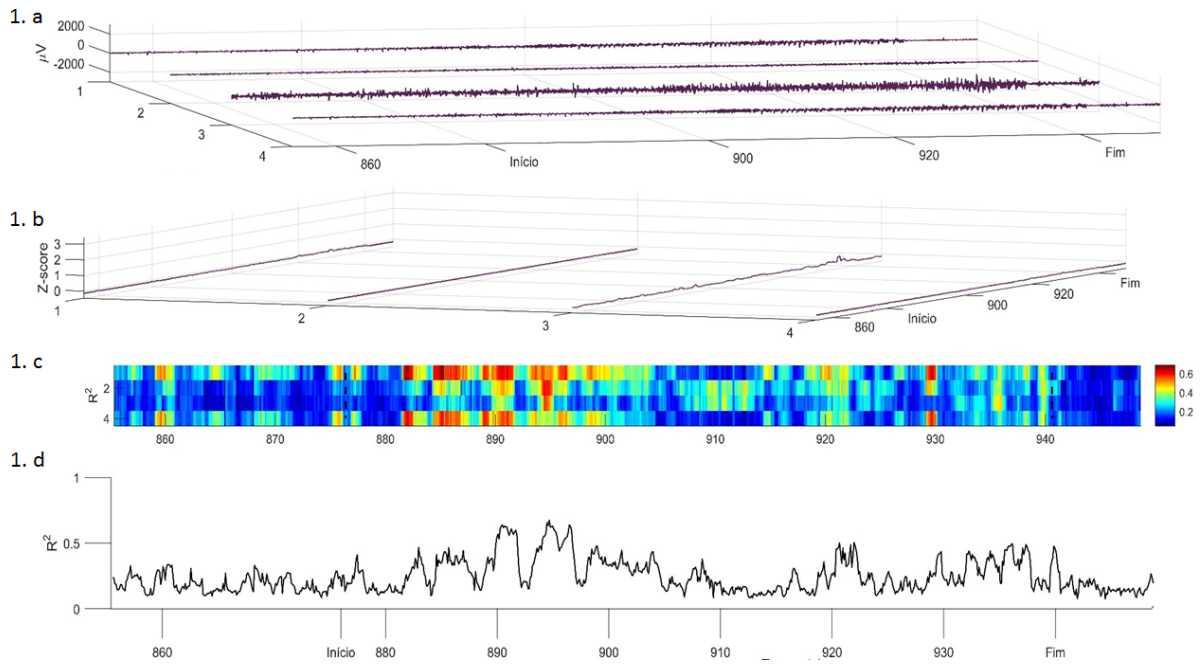


Figura 64: Análise de componentes principais do animal C1 durante as crises C1_01 e C1_02. Nos eixos, temos as três componentes utilizadas para a separação dos padrões. Os pontos azuis correspondem ao período pré-ictal, laranja ictal e verde pós-ictal. Note como os padrões de comportamento dos pontos são diferentes nas duas crises.

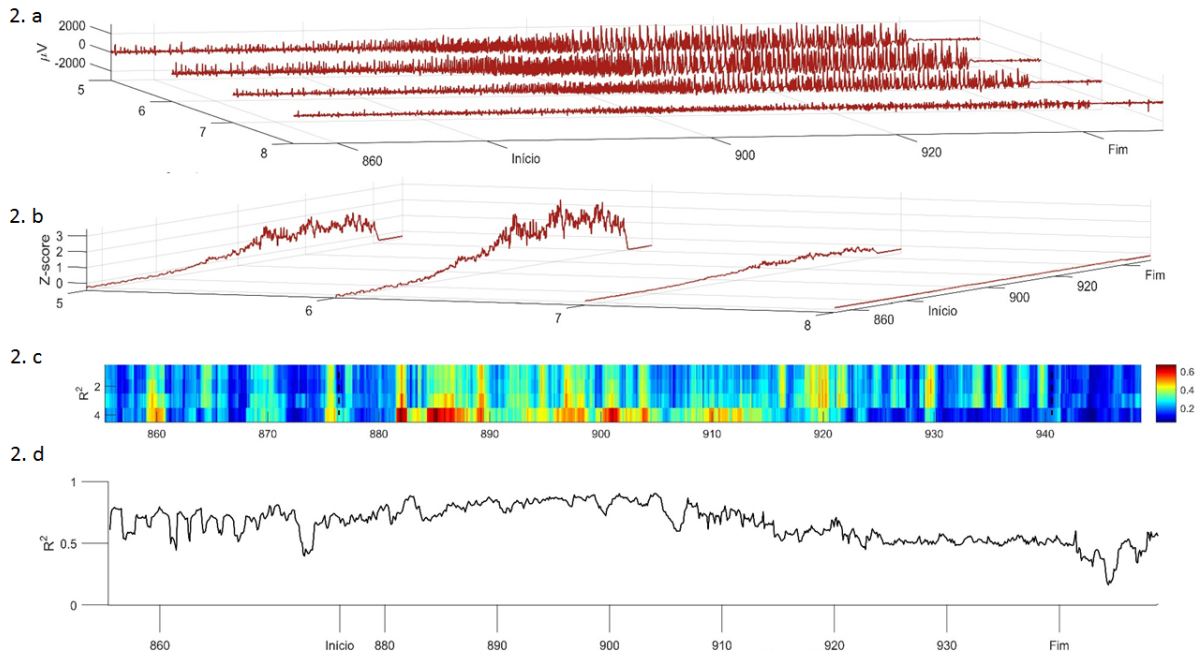
13.2.1.2 Animal C2

No segundo animal do grupo controle foi encontrado somente um padrão de crise, que acometeu o local da injeção sem o aparecimento de disparo ictais nas demais áreas amostradas, como pode ser observado na figura 65. Nela, somente observamos alterações de energia no hipocampo direito. Esse padrão, identificado visualmente no capítulo dois, foi evidenciado pelas análises de similaridade realizados, onde não é observado aumento no valor do coeficiente de correlação entre os pares de áreas analisados durante a crise (Figura 66).

C2_04 – Amígdala Direita



C2_04 – Hipocampo Direito



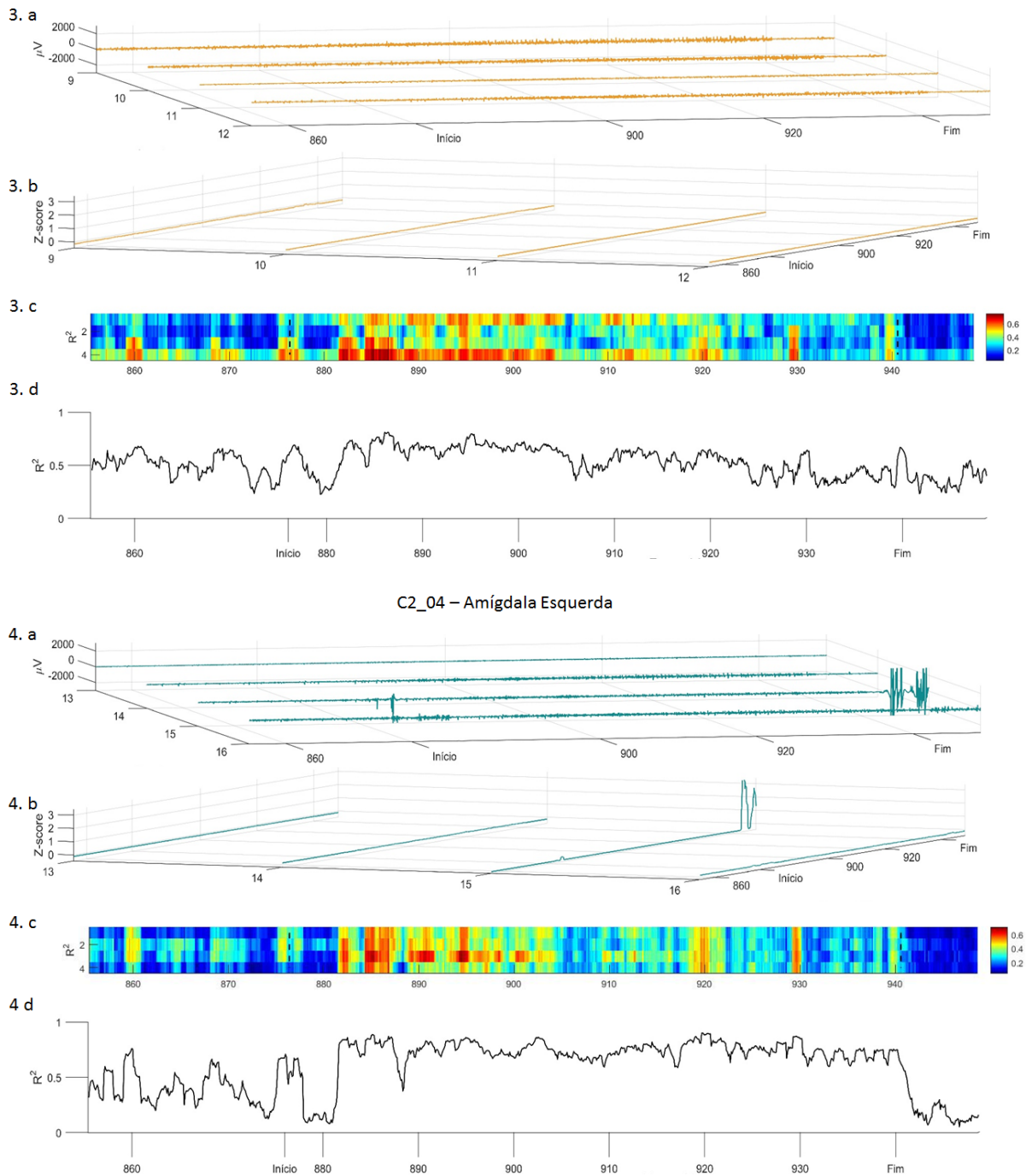


Figura 65: Análise de energia e similaridade durante o padrão ictal identificado no animal C2. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

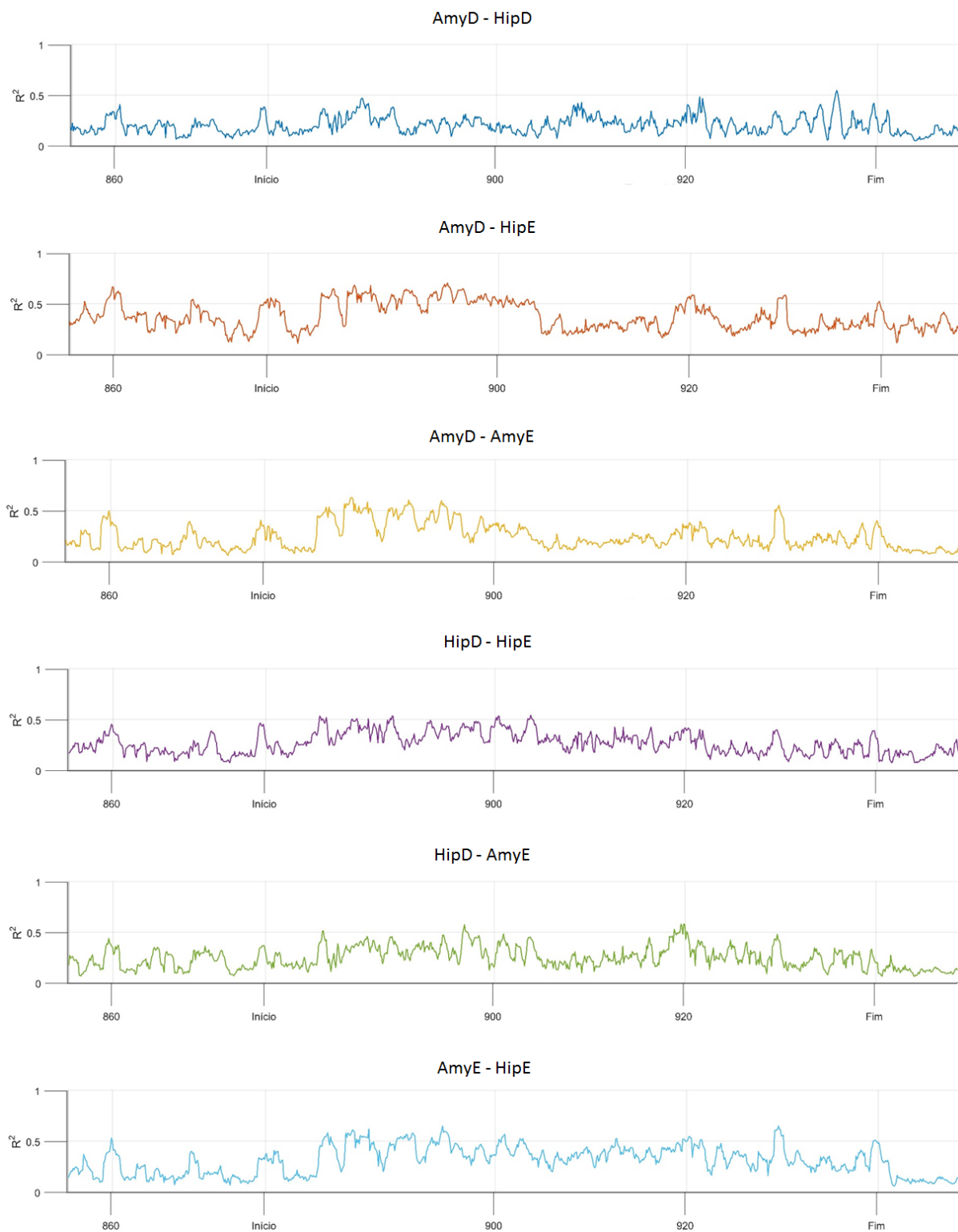
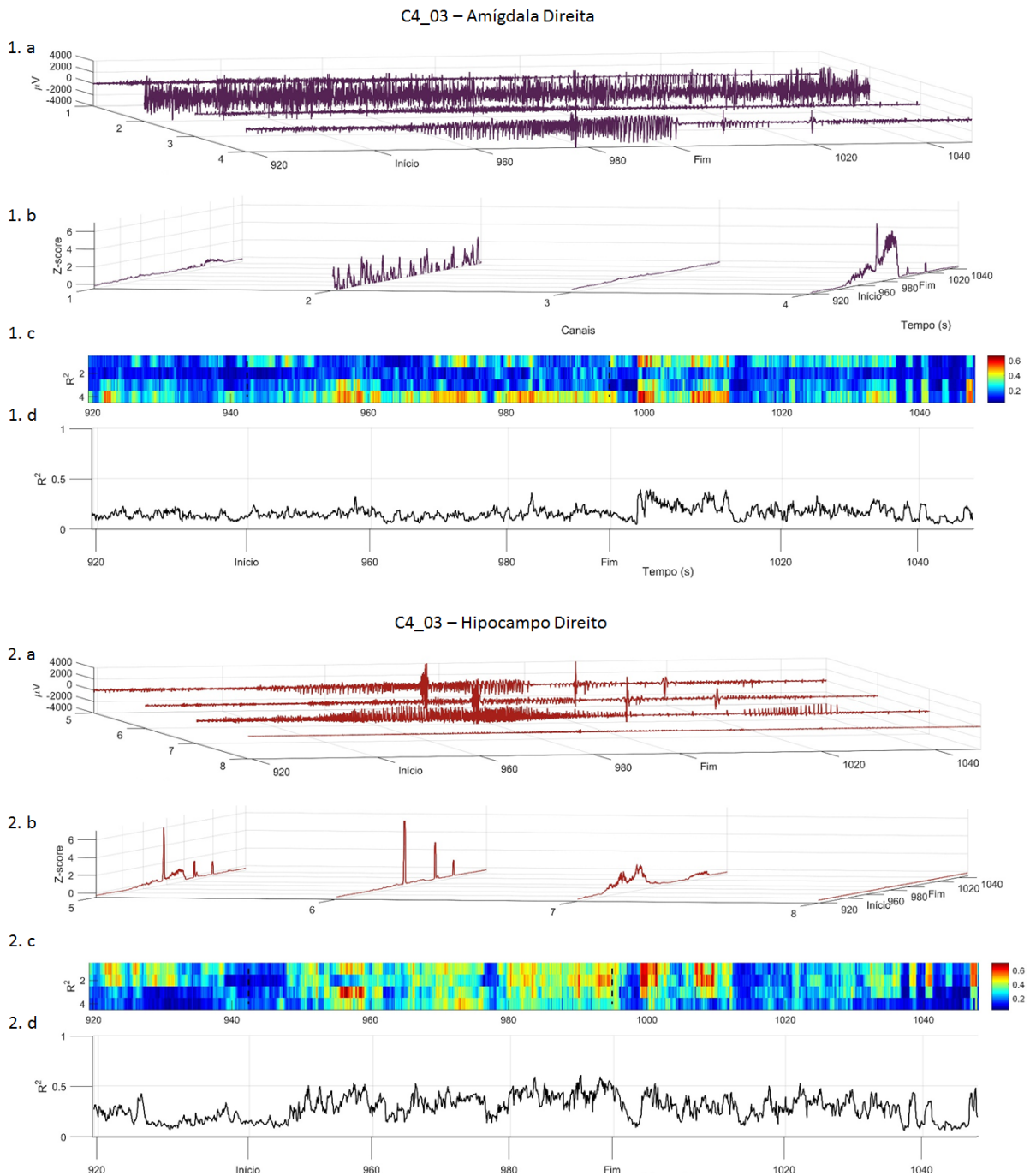


Figura 66: Análise de correlação inter-áreas no padrão de crise identificado no animal C2. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

13.2.1.3 Animal C4

O animal controle C4 também só apresentou um padrão de crise, em que todas as áreas apresentam disparos ictais. Isso é evidenciado ao se observar as partes a e b da figura 67. As correlações intra-área não apresentaram um padrão claro entre as áreas analisadas (partes c e d da figura 68).



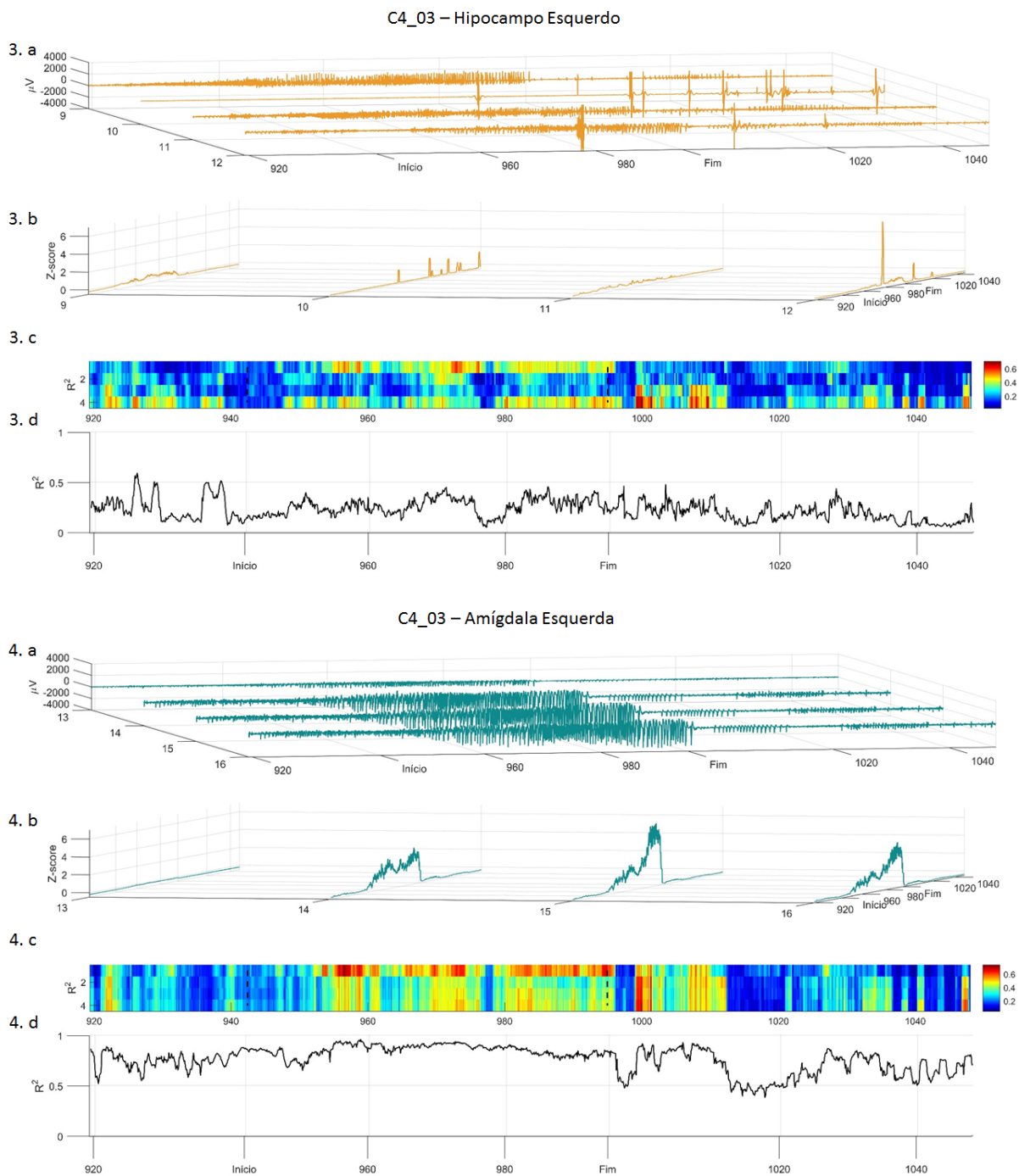


Figura 67: Análise de energia e similaridade durante o padrão ictal identificado no animal C4. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

As análises de similaridade inter-áreas também não apresentaram um padrão claro entre todos os pares de comparação e em geral não apresentaram um aumento durante a ocorrência do evento ictal. Somente foi visto valores mais altos de correlação no par HipD-AmyE (em verde na figura 68). No período pós ictal, todos os pares analisados apresentaram um ligeiro aumento nos valores de R^2 .

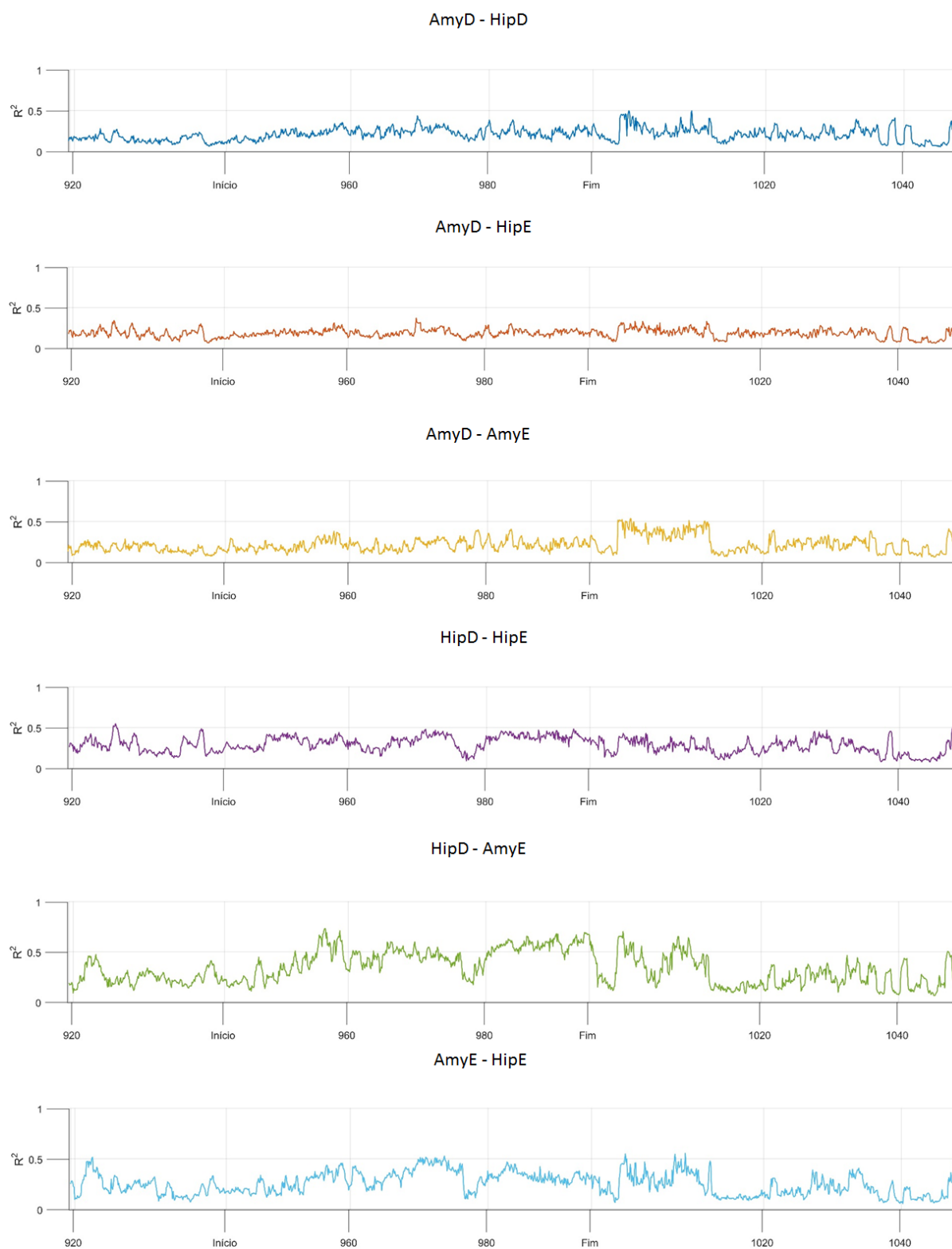


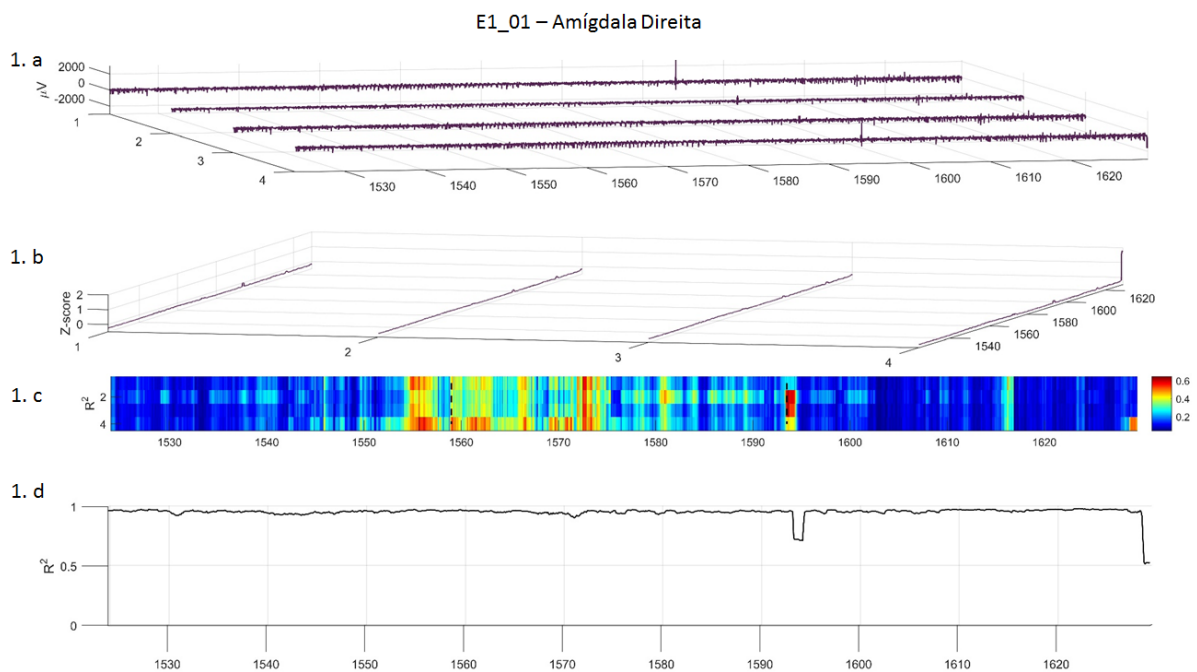
Figura 68: Análise de correlação inter-áreas do padrão de crise identificado no animal C4. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

13.2.2 Grupo estimulado

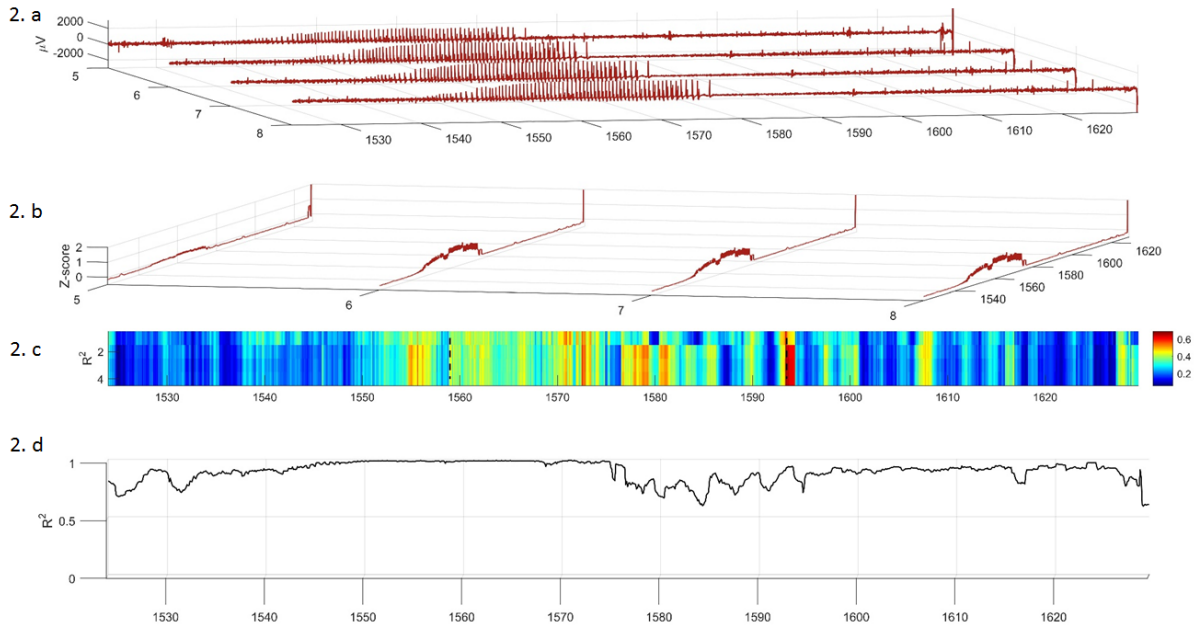
13.2.2.1 Animal E1

Foram encontrados quatro padrões de crise para o animal E1 no capítulo 2, de acordo com o recrutamento das áreas registradas.

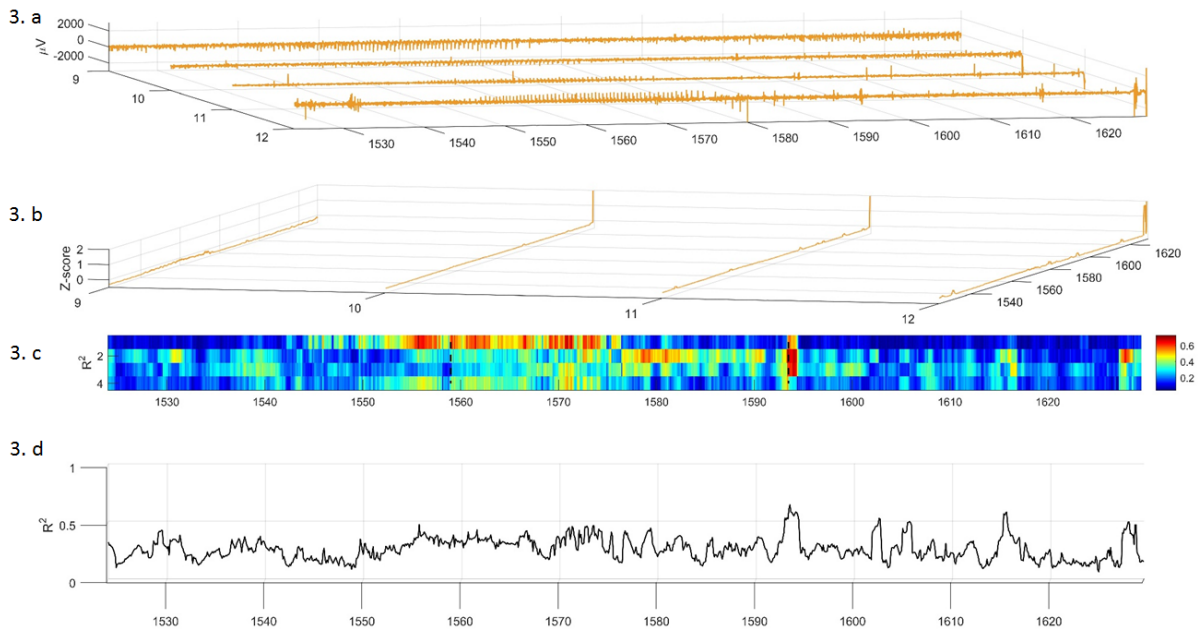
O primeiro padrão de crise foi o que acomete somente o hipocampo direito. Observamos as análises de energia e correlação intra-área, vemos somente no hipocampo direito um aumento de energia substancial (Figura 69, 2a e b). As análises de correlação intra-área demonstram valores próximos de um nas estruturas que se encontram no hemisfério direito, e valores menores nas do hemisfério esquerdo (Figura 69, 1b e c, 2b e c, 3b e c, 4b e c).



E1_01 – Hipocampo Direito



E1_01 – Hipocampo Esquerdo



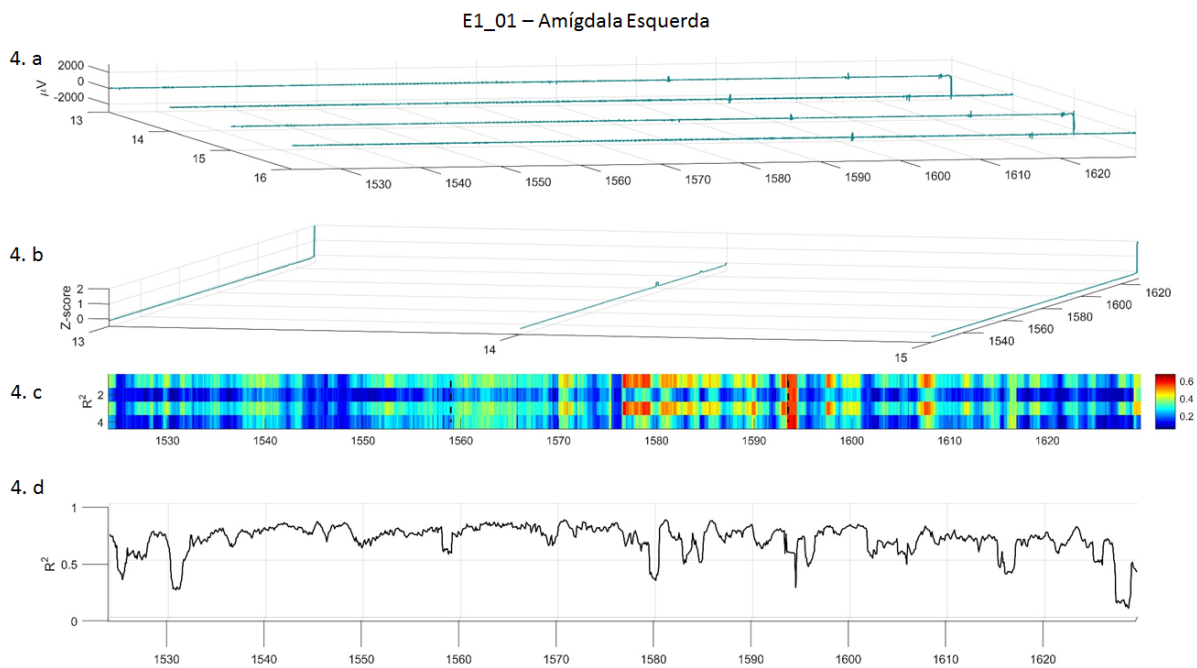


Figura 69: Análise de energia e similaridade durante o primeiro padrão ictal identificado no animal E1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

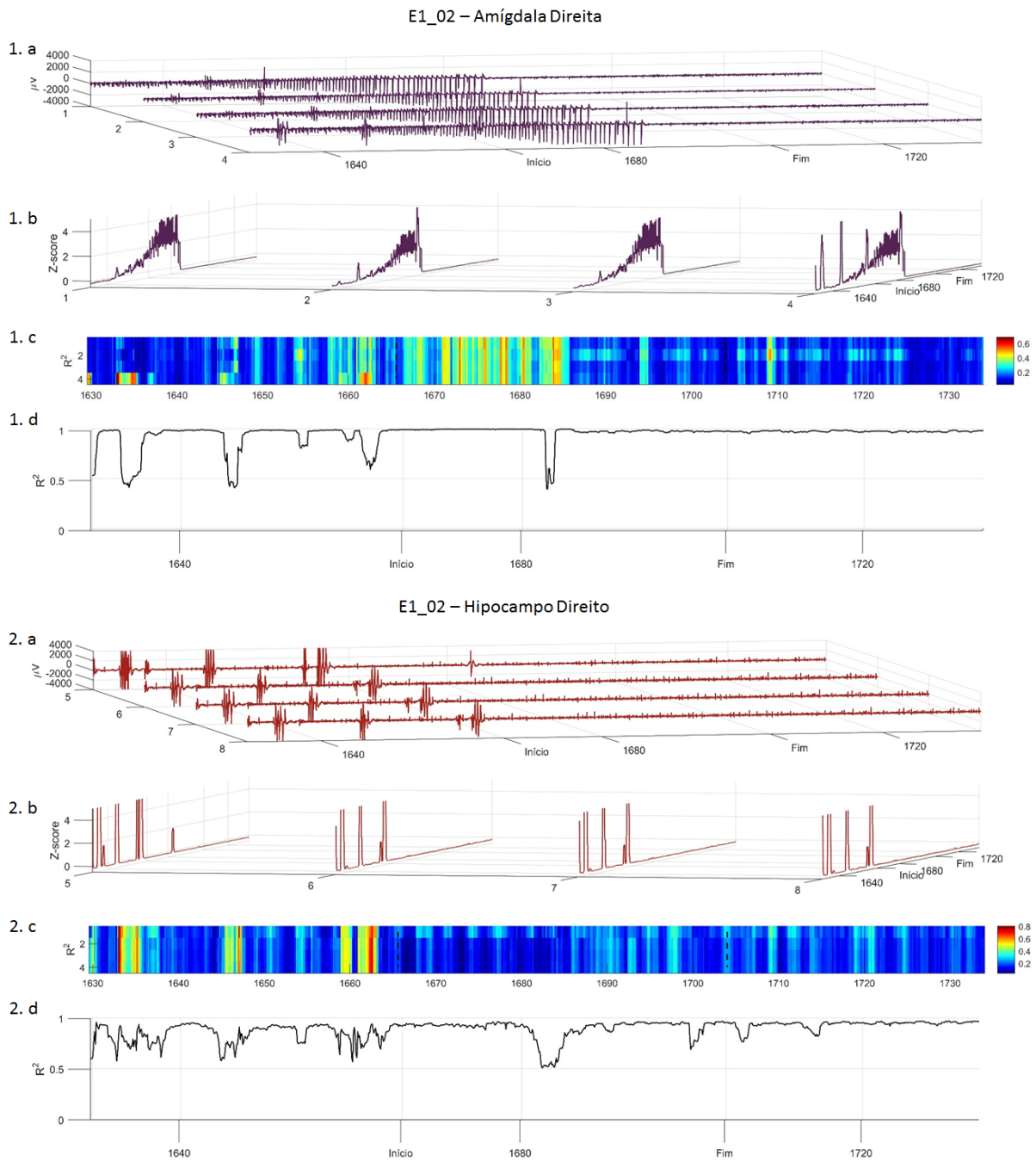
As análises de correlação inter-áreas não demonstram um aumento substancial durante o evento ictal, porém as áreas AmyD-HipE (Figura 70, laranja) e HipD-HipE (Figura 70, roxo) apresentam valores de correlação maiores que os demais durante todo o período amostrado.



Figura 70: Análise de correlação inter-áreas do primeiro padrão de crise identificado no animal E1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

No segundo padrão de crise identificado no animal E1 os disparos ictais foram encontrados na amígdala direita e no hipocampo esquerdo, sem atividade ictal na amígdala contralateral e atividade semelhante a disparos ictais no

hipocampo direito (Figura 71, 1a, 2a, 3a e 4a). As análises de correlação intra-área do segundo tipo de crise apresentou um comportamento similar ao encontrado no primeiro, com valores de correlação muito altos nas estruturas localizadas no hemisfério direito (Figura 71 1c e 1d, 2c e 2d) do que nas do hemisfério esquerdo (Figura 70 3c e 3d, 4c e 4d).



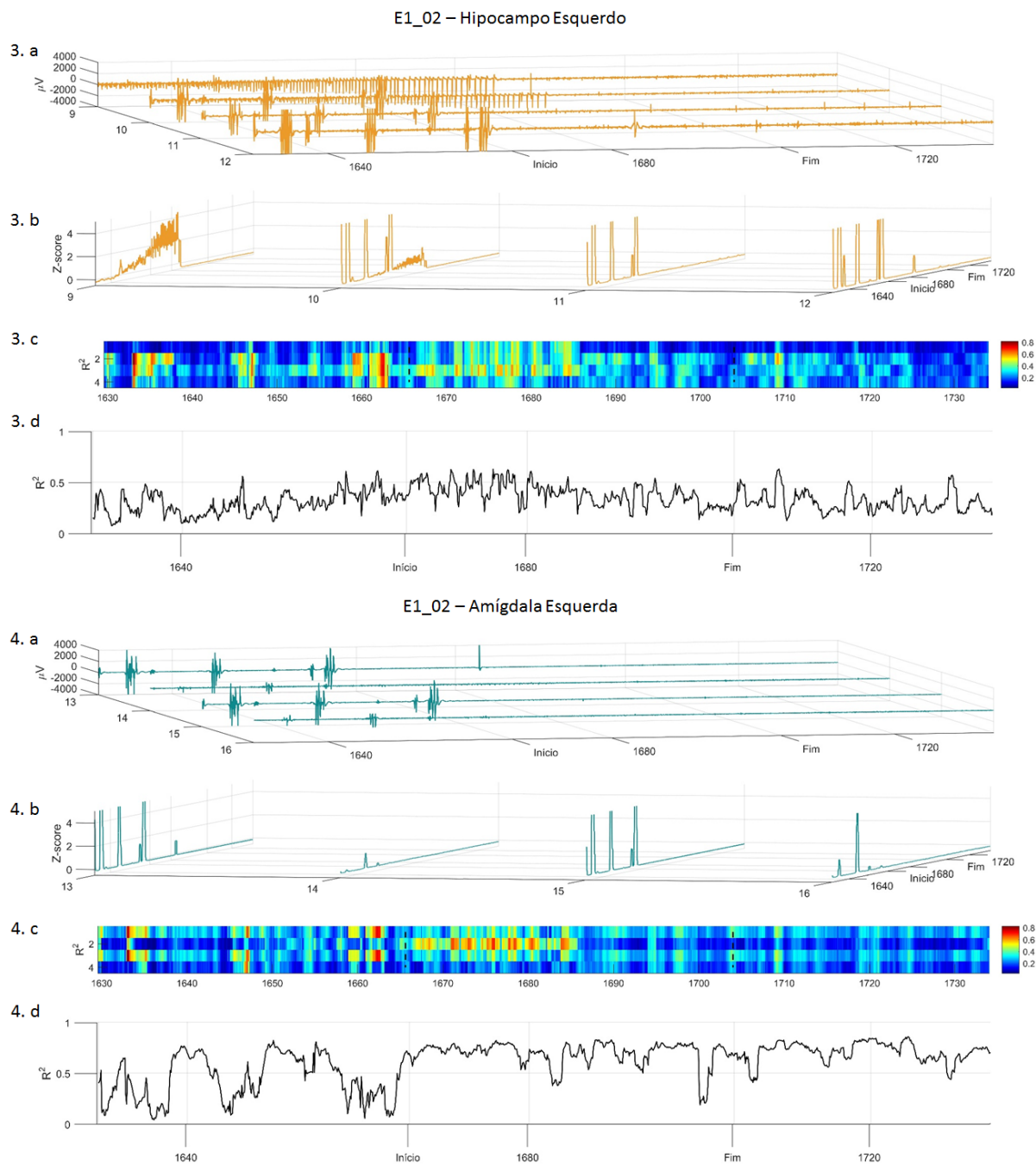


Figura 71: Análise de energia e similaridade durante o segundo padrão ictal identificado no animal E1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

Na análise de correlação inter-áreas, vemos um aumento no valor de R^2 durante a crise somente no par AmyD-HipE (Figura 72, laranja).

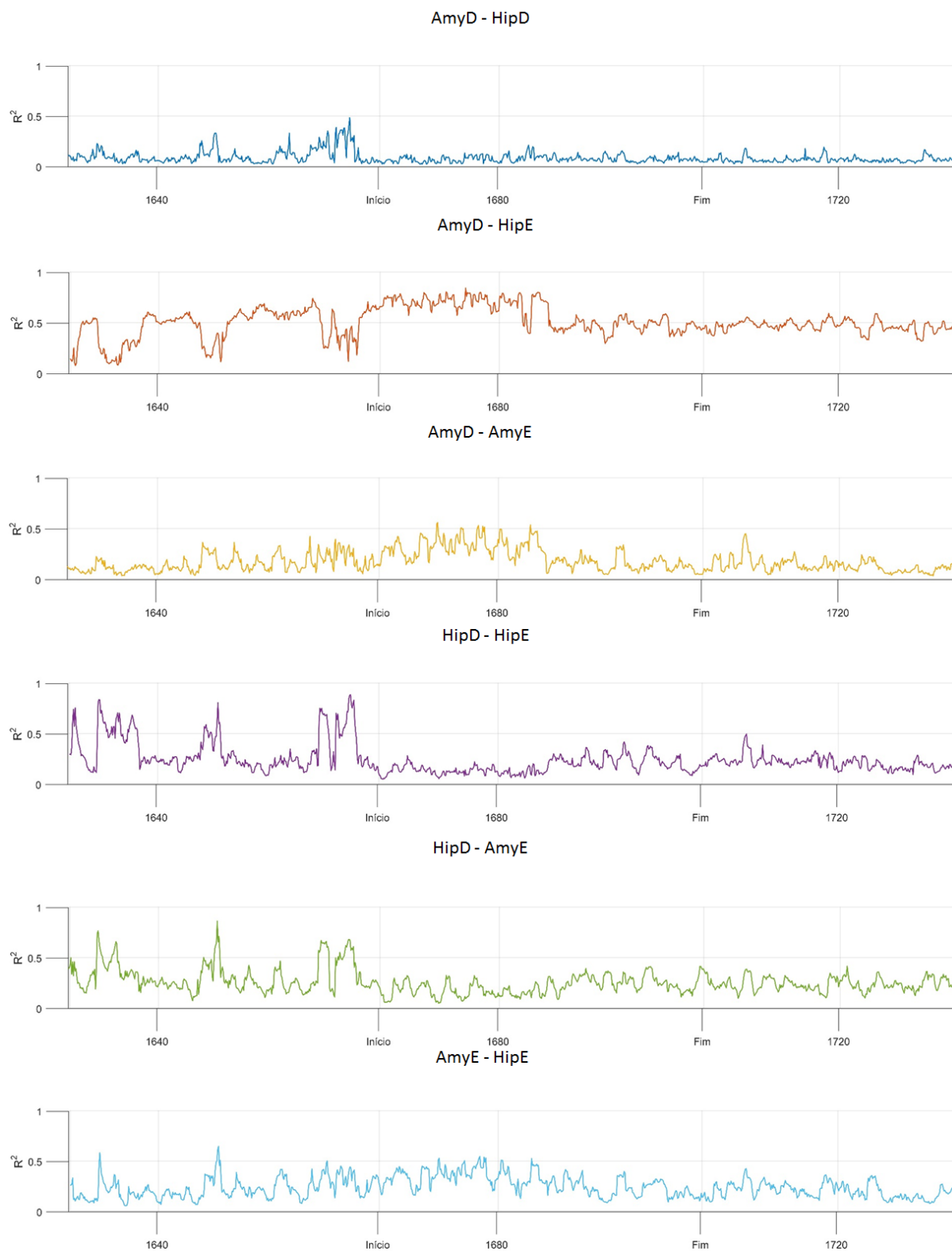
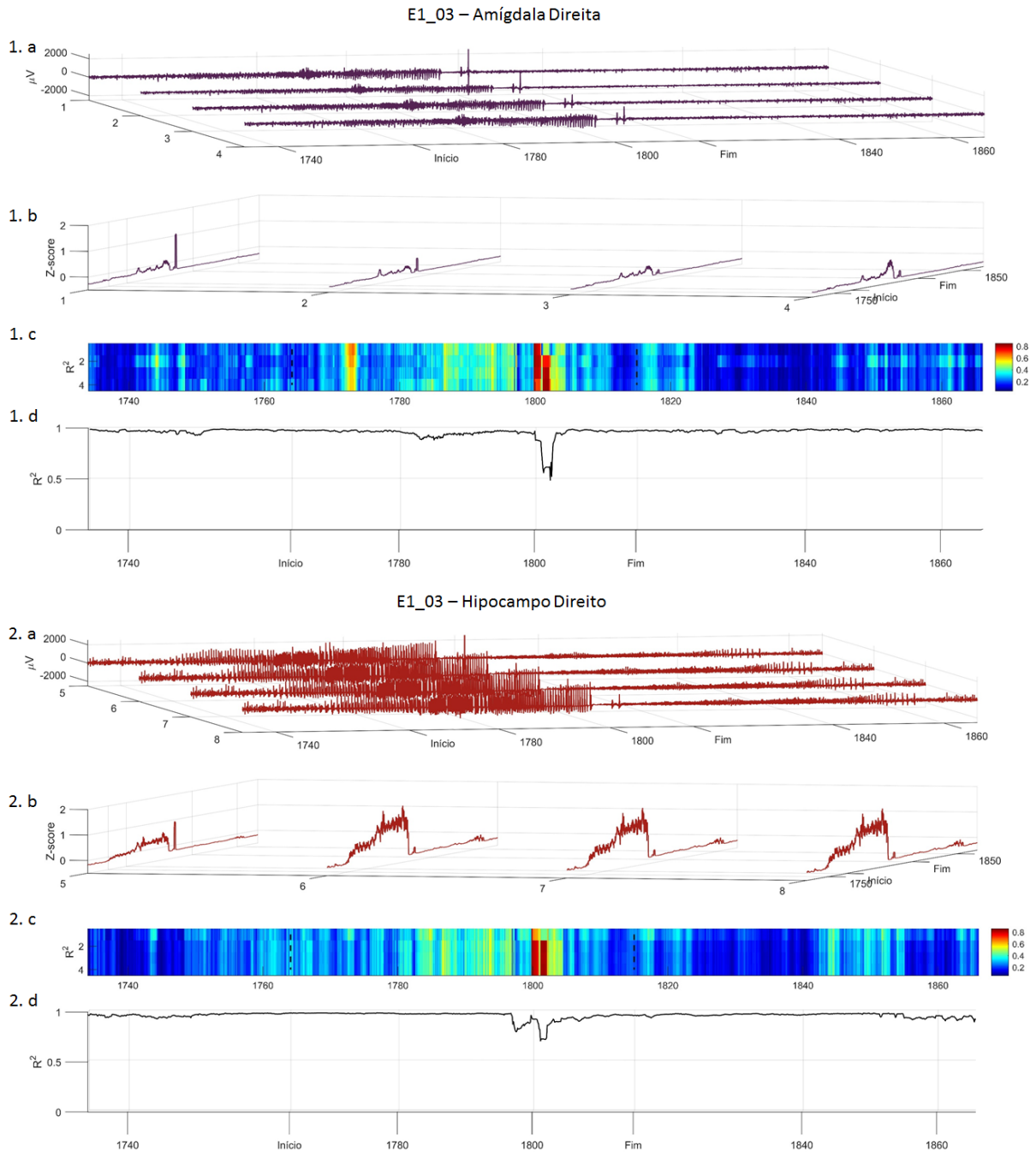


Figura 72: Análise de correlação inter-áreas do segundo padrão de crise identificado no animal E1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

O terceiro padrão de crise encontrado no animal E1 foi aquele em que os disparos ictais são encontrados em todas as áreas amostradas (Figura 73 1a, 2a, 3a

e 4a). Novamente, os valores de correlação intra-área foram muito próximo de 1 nas estruturas localizadas no hemisfério direito durante todo o tempo amostrado, o que não acontece nas do hemisfério esquerdo (Figura 73 1d, 2d, 3d e 4d).



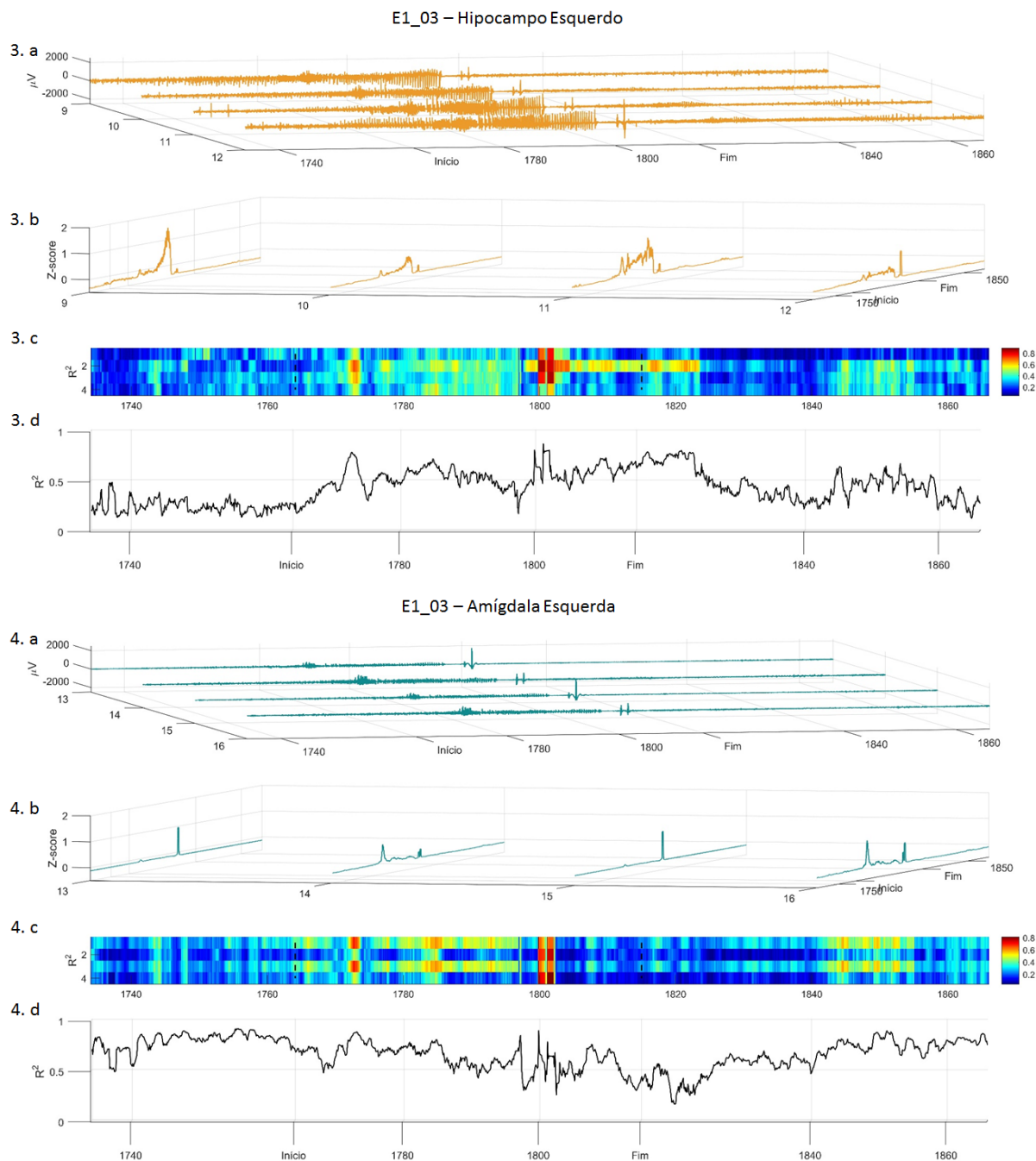


Figura 73: Análise de energia e similaridade durante o terceiro padrão ictal identificado no animal E1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

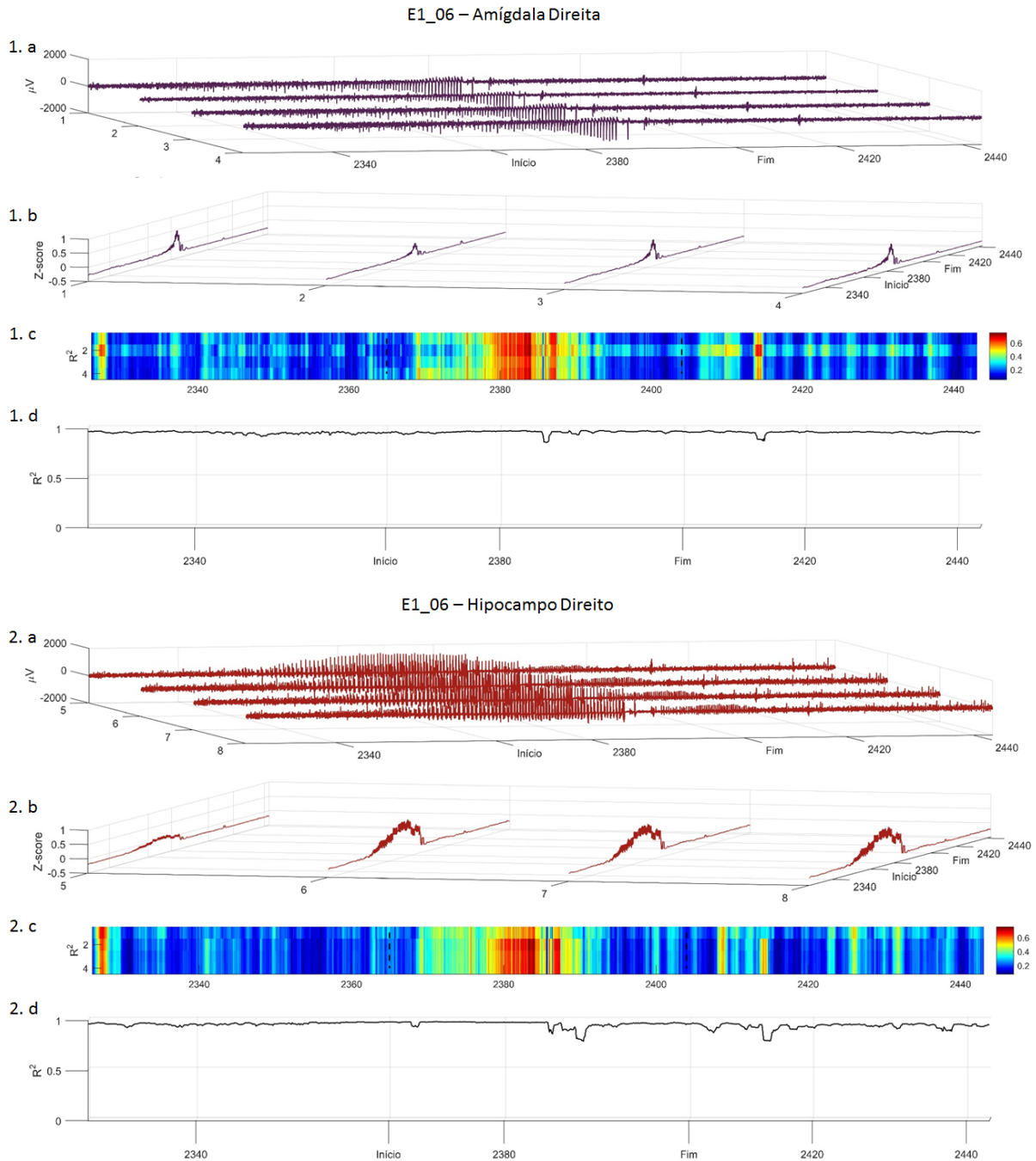
As análises de correlação inter-áreas do terceiro padrão de crise encontrado no animal E1 apresentou comportamento similar entre todos os pares analisados, com um aumento do valor de R^2 em torno de 1800s. Novamente os pares AmyD-HipE (Figura 74 laranja) e HipD-HipE (Figura 74 roxo), tiveram valores de coeficiente de correlação maior do que os demais pares analisados durante todo o período de análise.



Figura 74: Análise de correlação inter-áreas do terceiro padrão de crise identificado no animal E1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

O último padrão de crise encontrado no animal E1 tinha como característica a existência de disparos ictais na amígdala direita, hipocampo direito e hipocampo esquerdo, sem recrutamento da amígdala contralateral (Figura 75 1a, 2a, 3a e 4a).

Os valores de correlação intra-áreas, assim como nos demais padrões, apresentou valores maiores nas estruturas do hemisfério direito do que no esquerdo (Figura 75 1d, 2d, 3d e 4d).



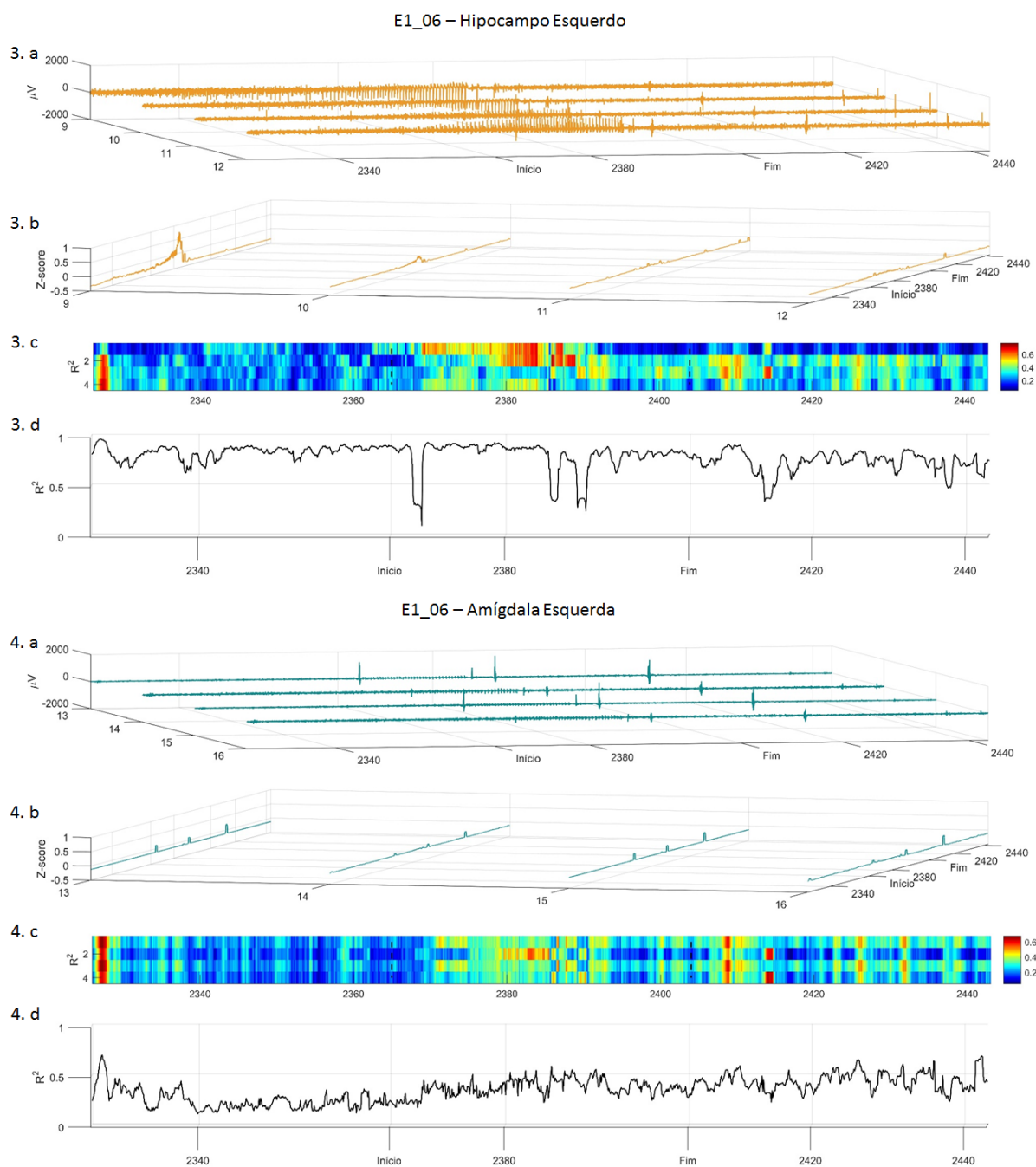


Figura 75: Análise de energia e similaridade durante o quarto padrão ictal identificado no animal E1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

Nas análises de similaridade inter-áreas do quarto padrão de crise do animal E1, vemos um aumento nos valores de R^2 durante a crise somente nos pares AmyD-HipD (Figura 76 azul escuro), AmyD-HipD (Figura 76 laranja) e HipD-HipE (Figura 76 roxo).

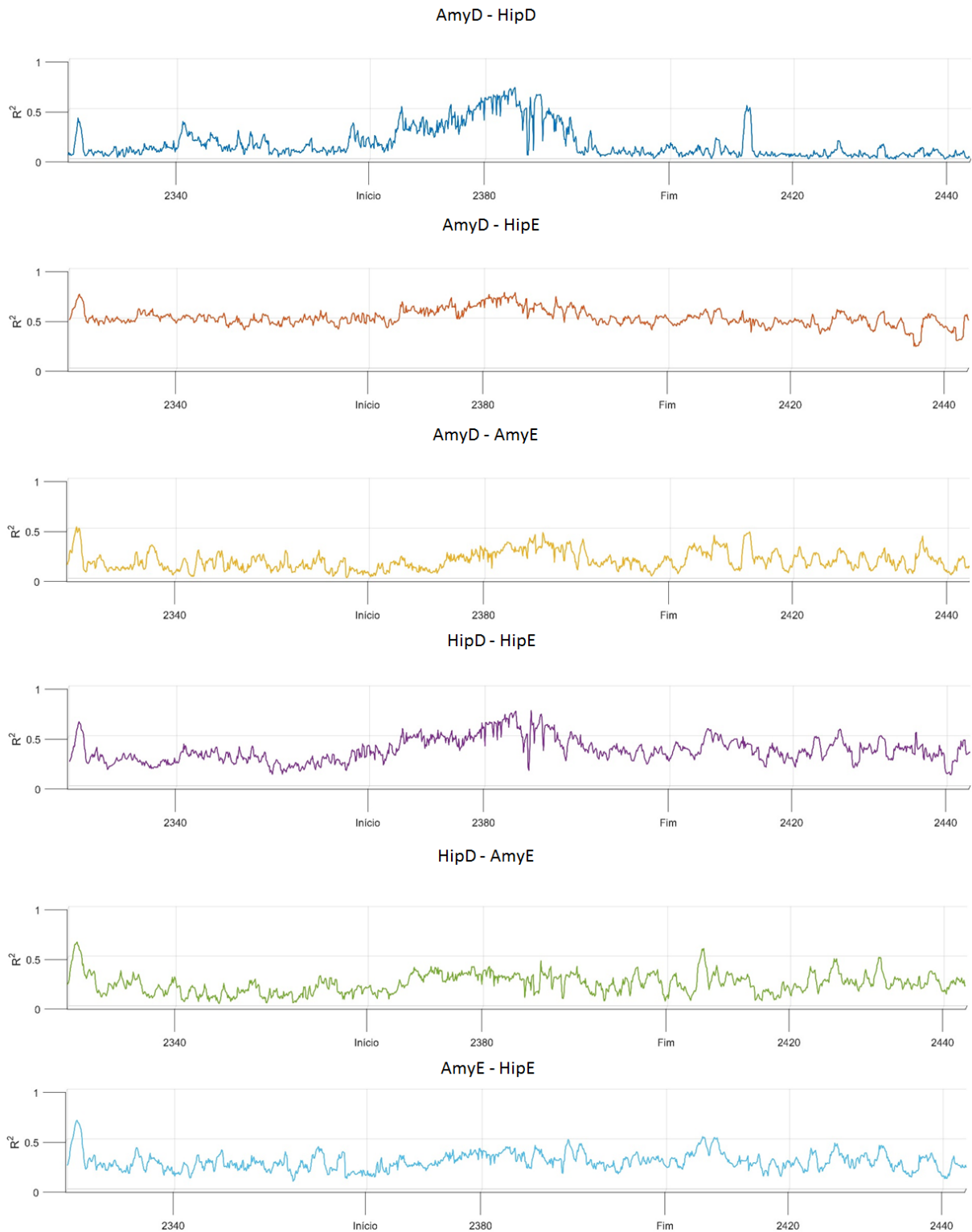


Figura 76: Análise de correlação inter-áreas do quarto padrão de crise identificado no animal E1. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

Observando a análise de componente principal do animal E1, nas quatro crises demonstradas nessa seção, é possível confirmar que os padrões de comportamento das crises são distintos entre si (Figura 77). Mais detalhes dessa análise serão apresentados no item 13.1.

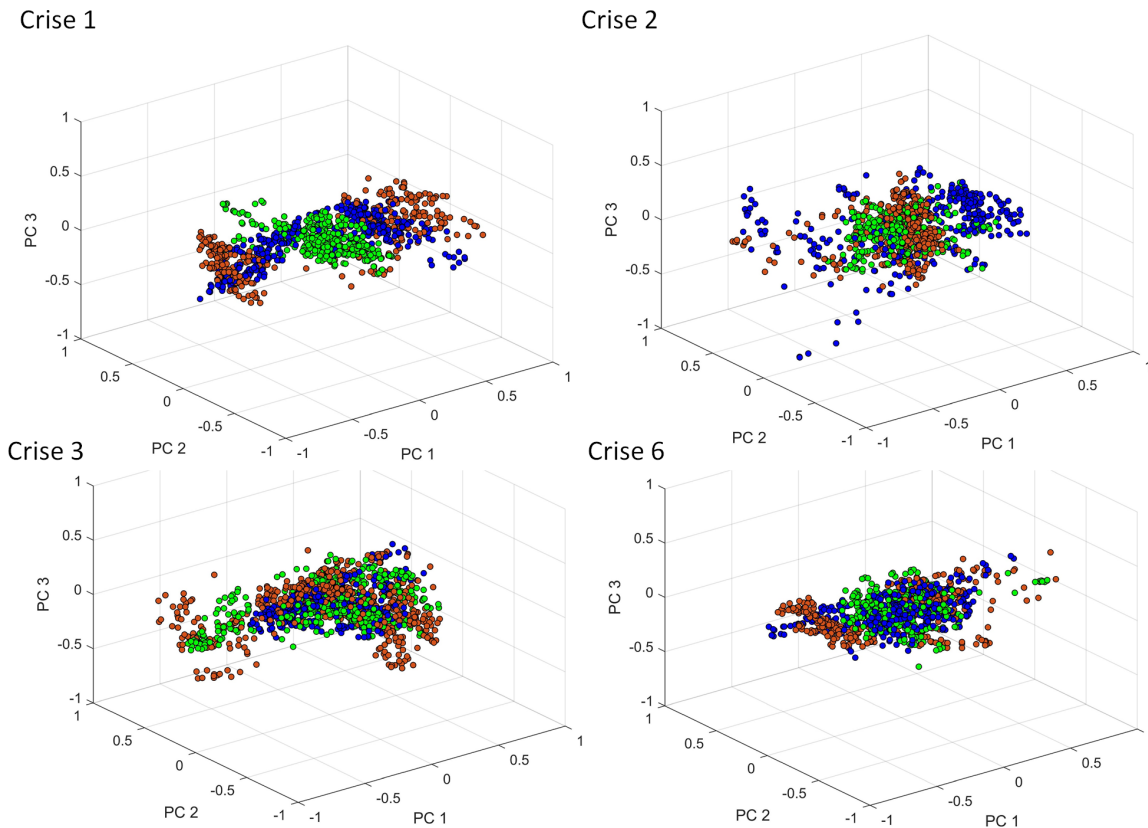
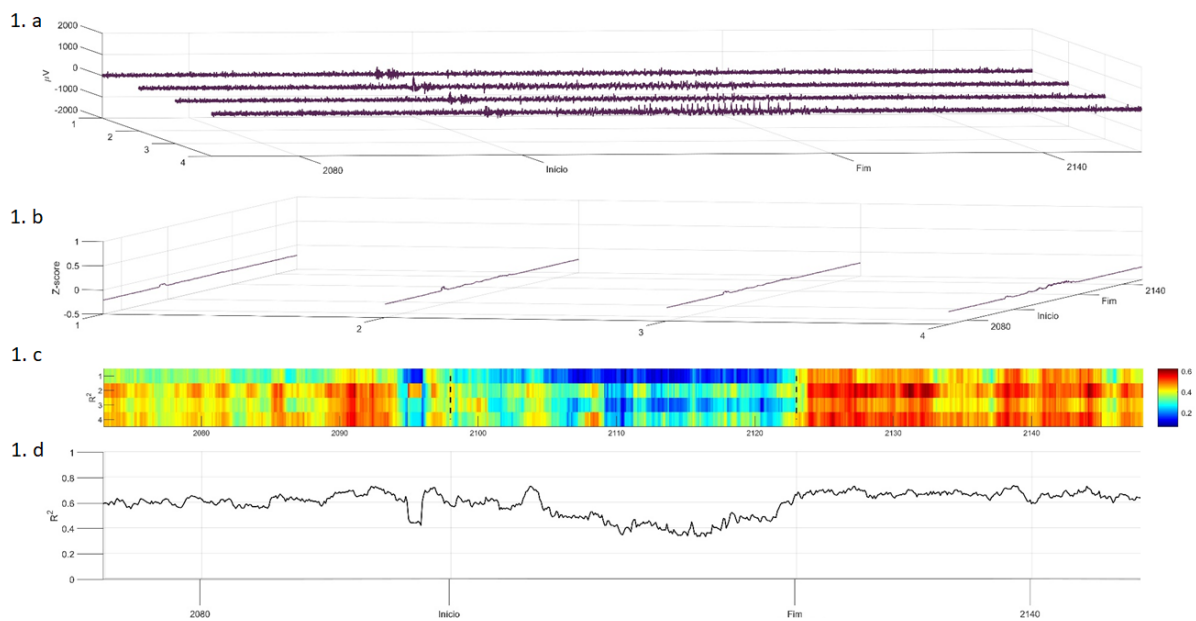


Figura 77: Análise de componentes principais do animal E1 durante as crises E1_01, E1_02, E1_03 e E1_06. Nos eixos, temos as três componentes utilizadas para a separação dos padrões. Os pontos azuis correspondem ao período pré-ictal, laranja ictal e verde pós-ictal. Note como os padrões de comportamento dos pontos são diferentes nas quatro crises.

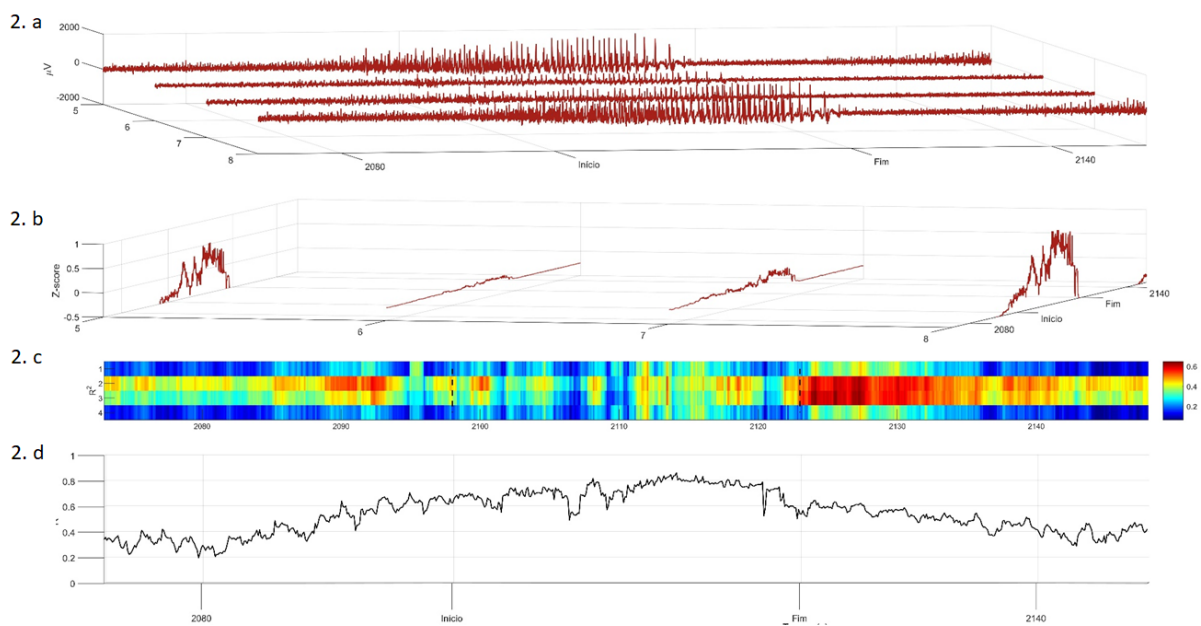
13.2.2.2 Animal E2

O segundo animal pertencente ao grupo estimulado (E2) apresentou somente um comportamento de crise em que os disparos ictais são encontrados no hipocampo direito e esquerdo e na amígdala direita, sem o recrutamento da amígdala contralateral (Figura 78 1a e 1b, 2a e 2b, 3a e 3b, 4a e 4b). As análises de correlação intra-área tiveram um padrão diferente do encontrado nos demais animais, com diminuição dos valores de R^2 durante o período ictal na amígdala direita e no hipocampo esquerdo (Figura 78 1c e 1d, 3c e 3d).

E2_04 – Amígdala Direita



E2_04 – Hipocampo Direito



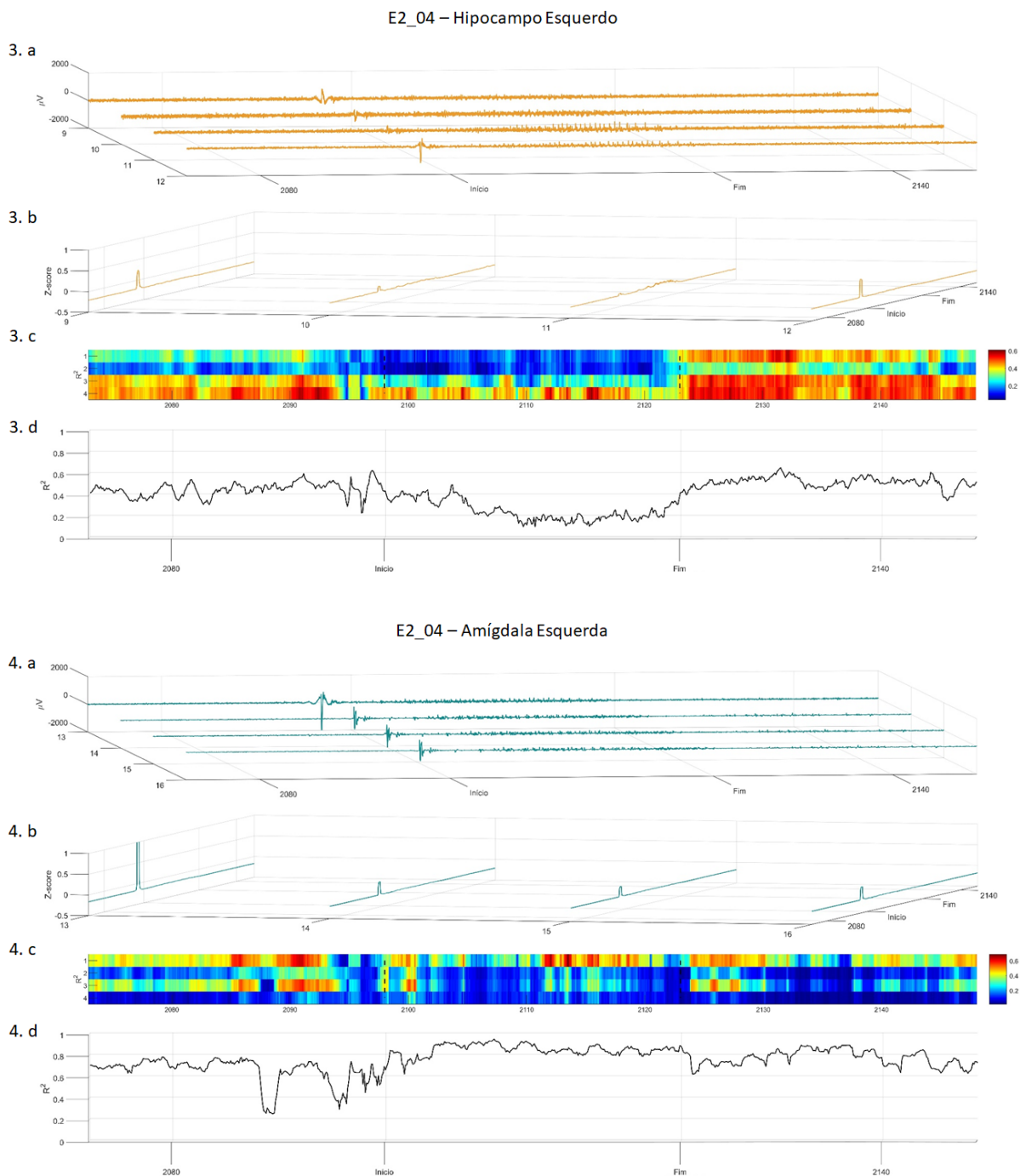


Figura 78: Análise de energia e similaridade durante o padrão ictal identificado no animal E2. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

A análise de correlação inter-áreas do animal E2 evidenciou uma maior correlação entre os pares que envolvem a amígdala direita e o hipocampo (Figura 79 AmyD-HipD e AmyD-HipE).

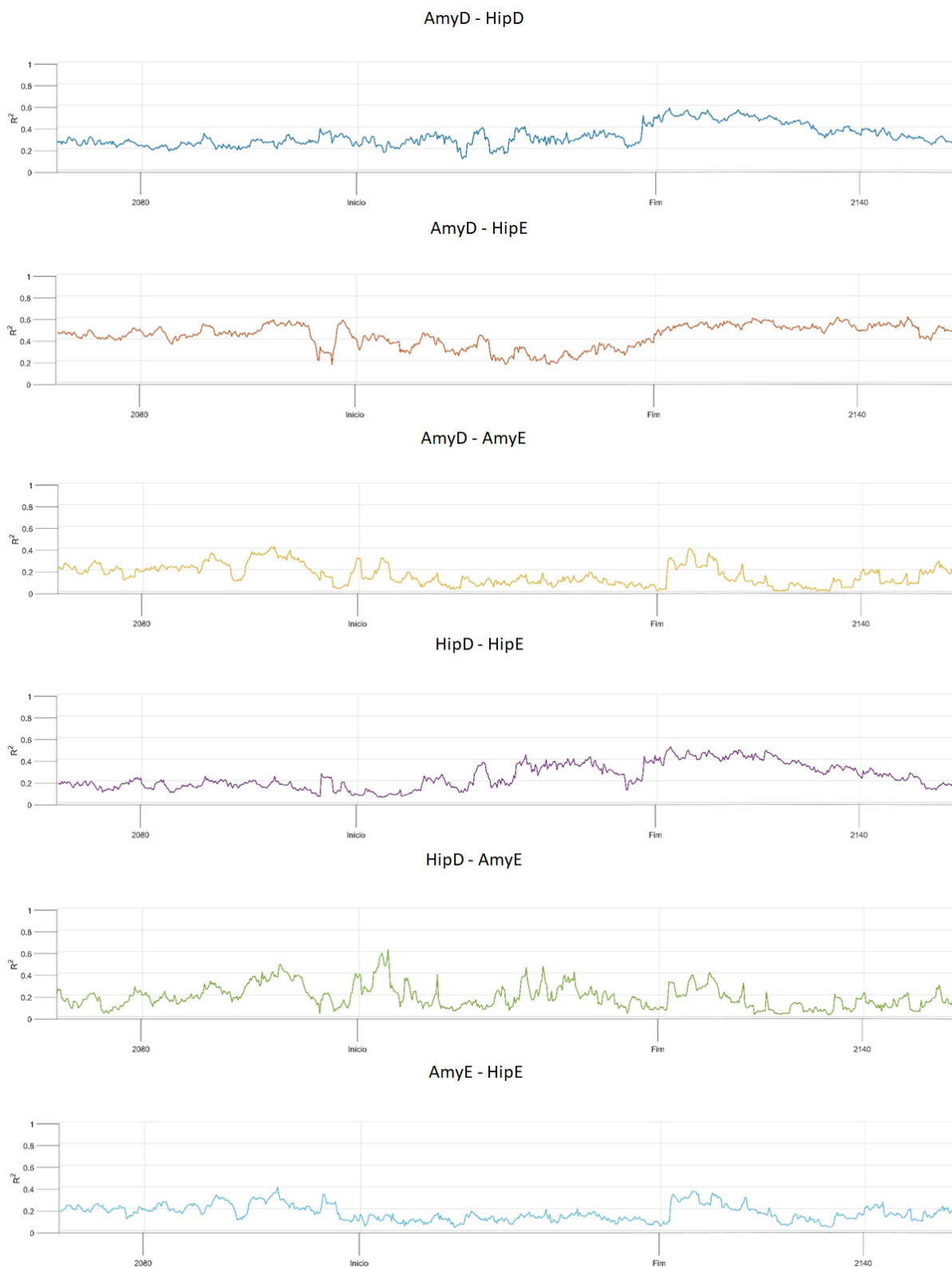
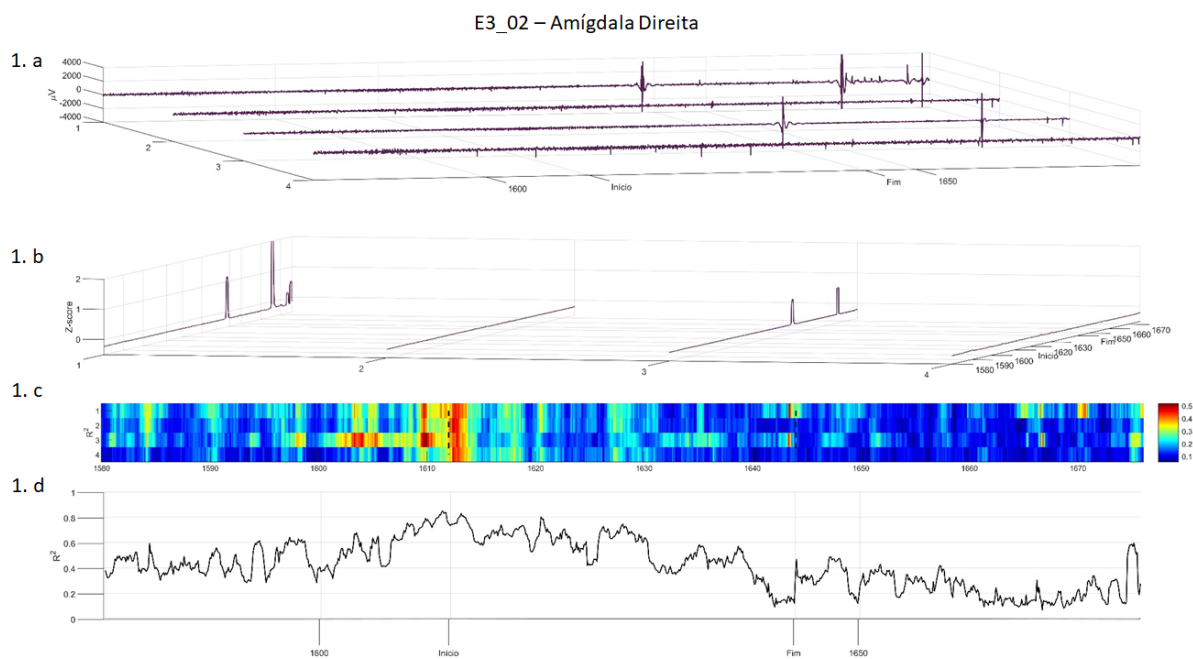


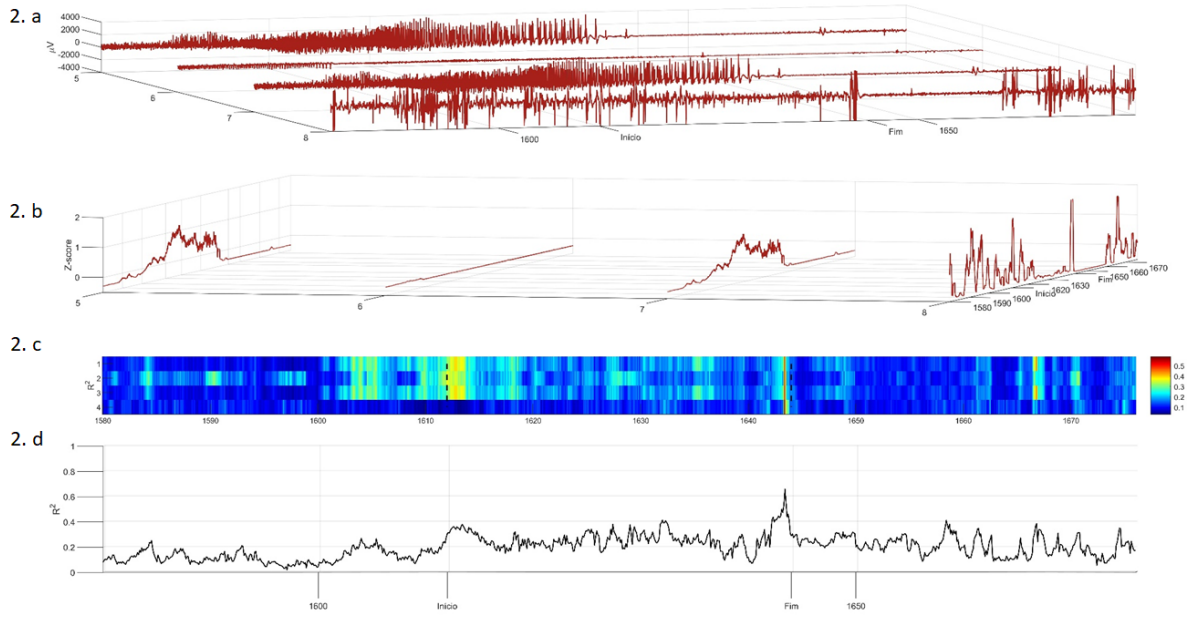
Figura 79: Análise de correlação inter-áreas do padrão de crise identificado no animal E2. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

13.2.2.3 Animal E3

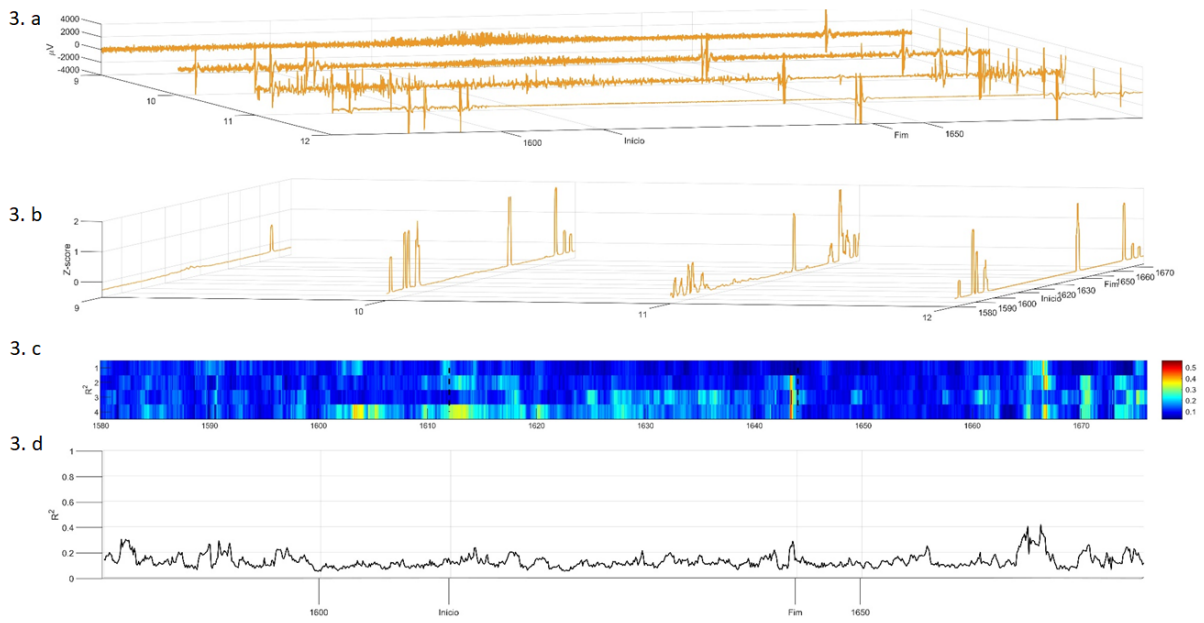
O primeiro padrão de crise encontrado no animal E3 foi o que os disparos ictais foram encontrados somente no local da injeção. Assim, somente no hipocampo direito foram vistos aumento no valor do z-score durante a atividade epileptiforme (Figura 80 1a e 1b, 2a e 2b, 3a e 3b, 4a e 4b). Nas análises de correlação intra-área, somente foi observado altos valores de R^2 (superiores à 0,6) no hipocampo direito ao fim da crise e nas amígdalas durante a maior parte do período analisado (Figura 80 1c e 1d, 2c e 2d, 3c e 3d, 4c e 4d).



E3_02 – Hipocampo Direito



E3_02 – Hipocampo Esquerdo



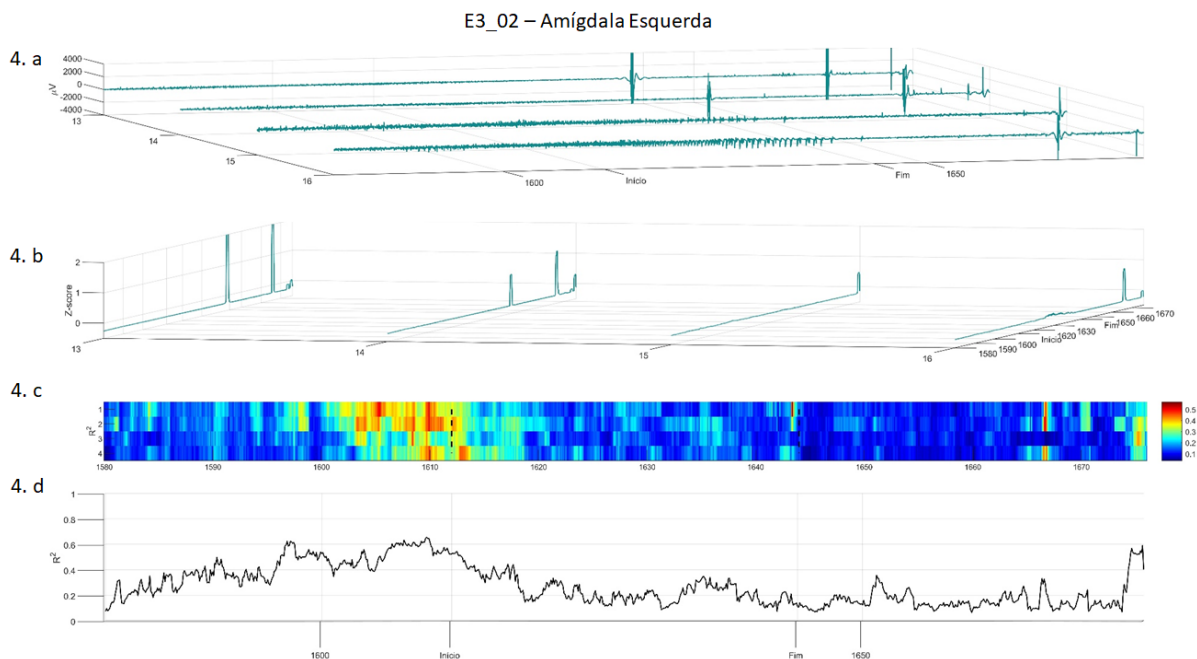


Figura 80: Análise de energia e similaridade durante o primeiro padrão ictal identificado no animal E3. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

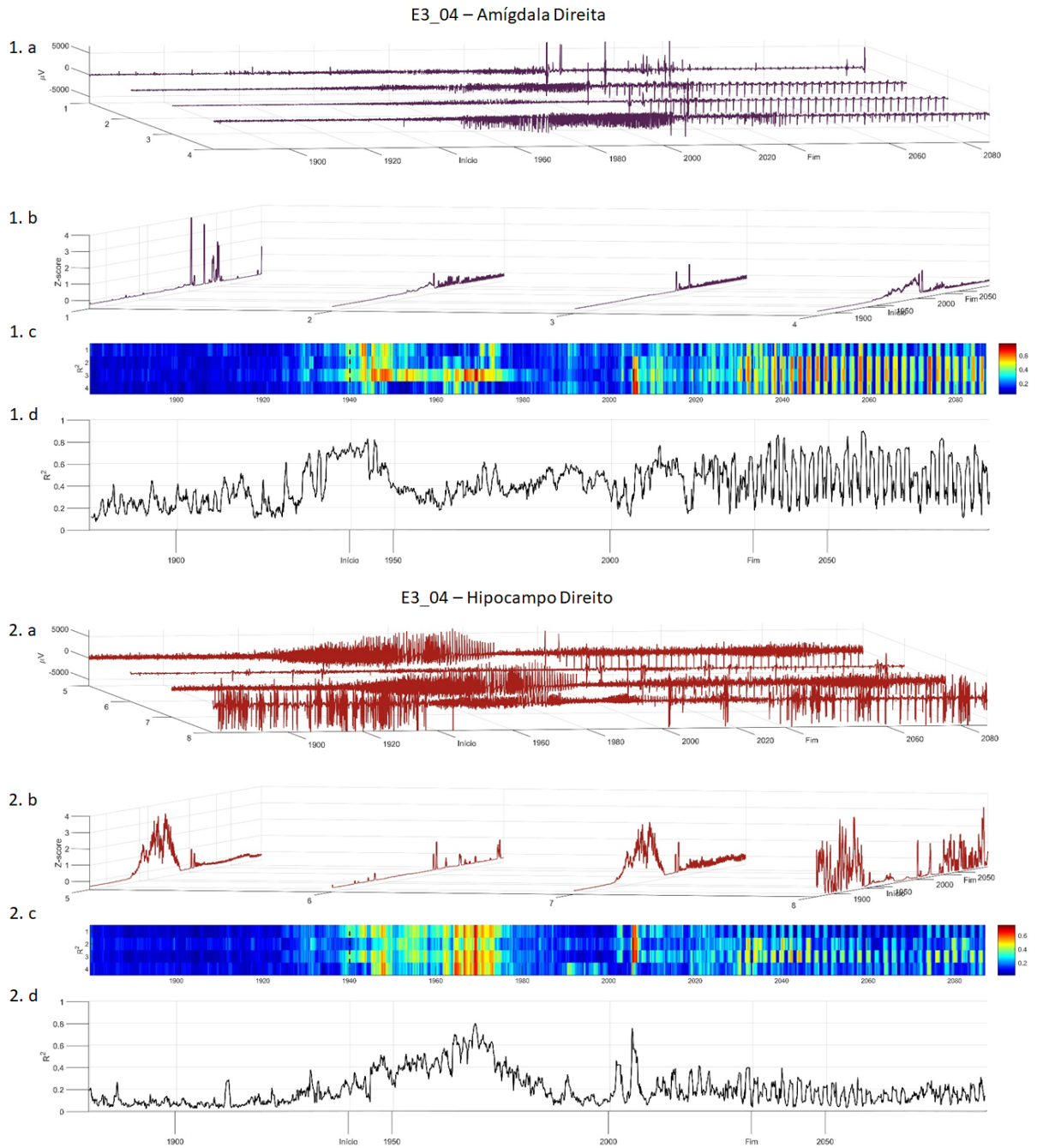
Nas análises de correlação inter-áreas, os valores encontrados antes, durante e depois das crises foram relativamente baixos para todos os pares. Porém, mesmo sem aumento substancial, as áreas que apresentaram valores maiores de R^2 foram as que envolveram o hipocampo direito (Figura 81).



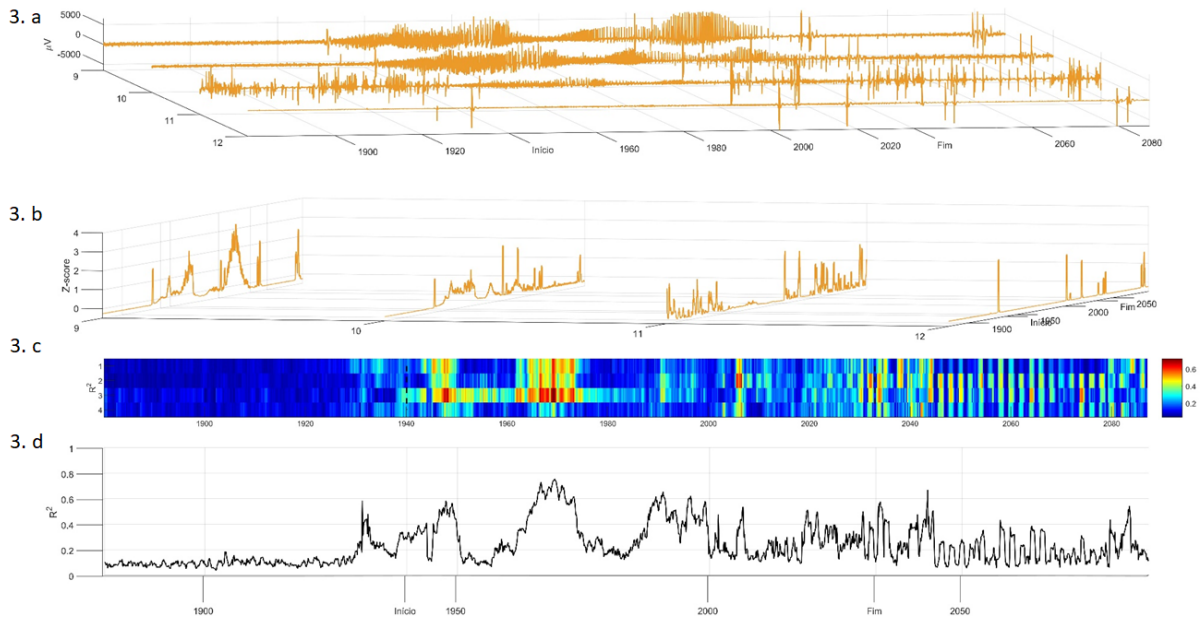
Figura 81: Análise de correlação inter-áreas do primeiro padrão de crise identificado no animal E3. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

O segundo padrão de crise encontrado no animal E3 foi o que os disparos ictais foram encontrados em todas as áreas amostradas. Essa crise ocorreu muito

próxima ao estímulo, o que fez com que uma parte dos resultados tenha sido influenciado pela estimulação elétrica. Porém, antes dessa interferência é possível observar a existência do disparo nas 4 áreas, além do aumento de energia e correlação durante a crise (Figura 82)



E3_04 – Hipocampo Esquerdo



E3_04 – Amígdala Esquerda

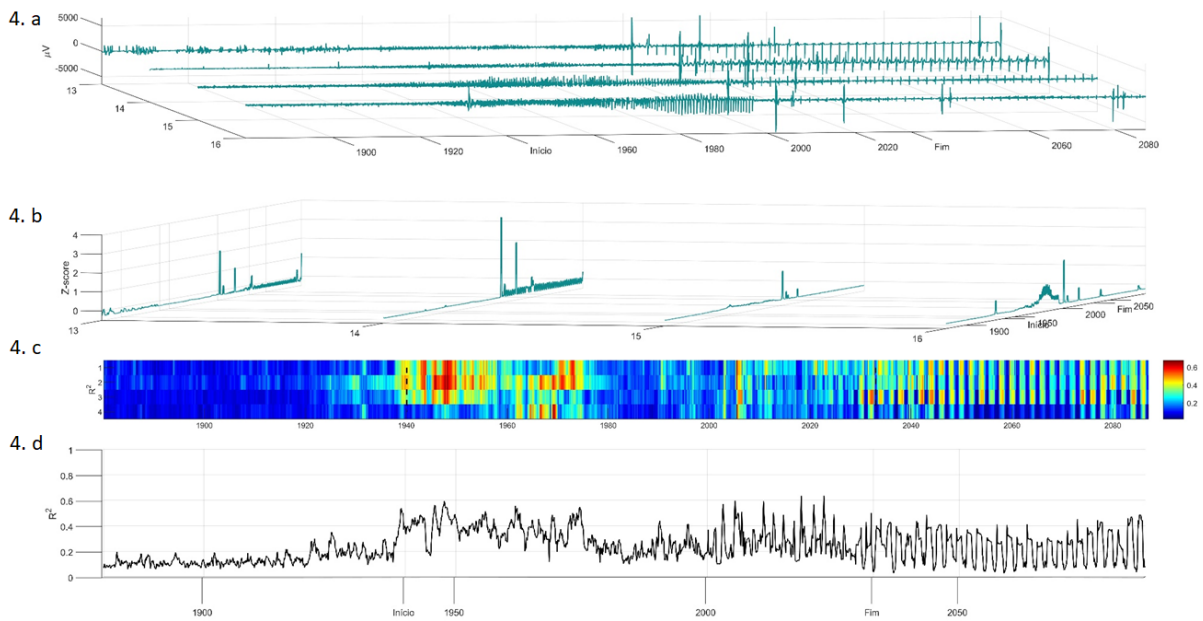


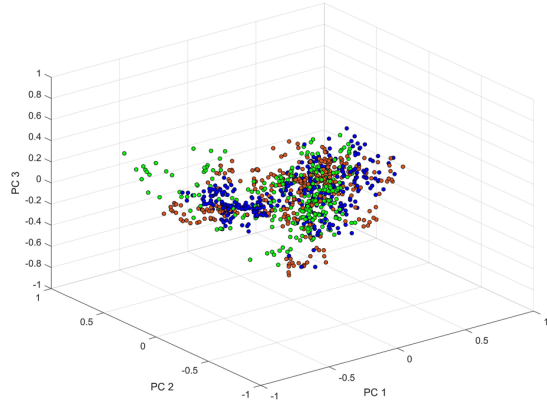
Figura 82: Análise de energia e similaridade durante o segundo padrão ictal identificado no animal E3. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.



Figura 83: Análise de correlação inter-áreas do segundo padrão de crise identificado no animal E3. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

A PCA durante a crise do animal E3 também evidencia os distintos padrões encontrados no capítulo 2 (Figura 84). Mais detalhes dessa análise são vistos na seção 13.1.

Crise 2



Crise 4

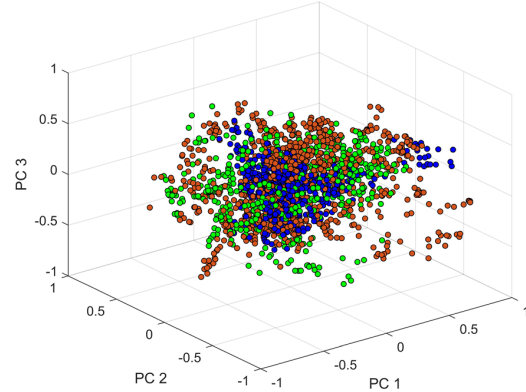
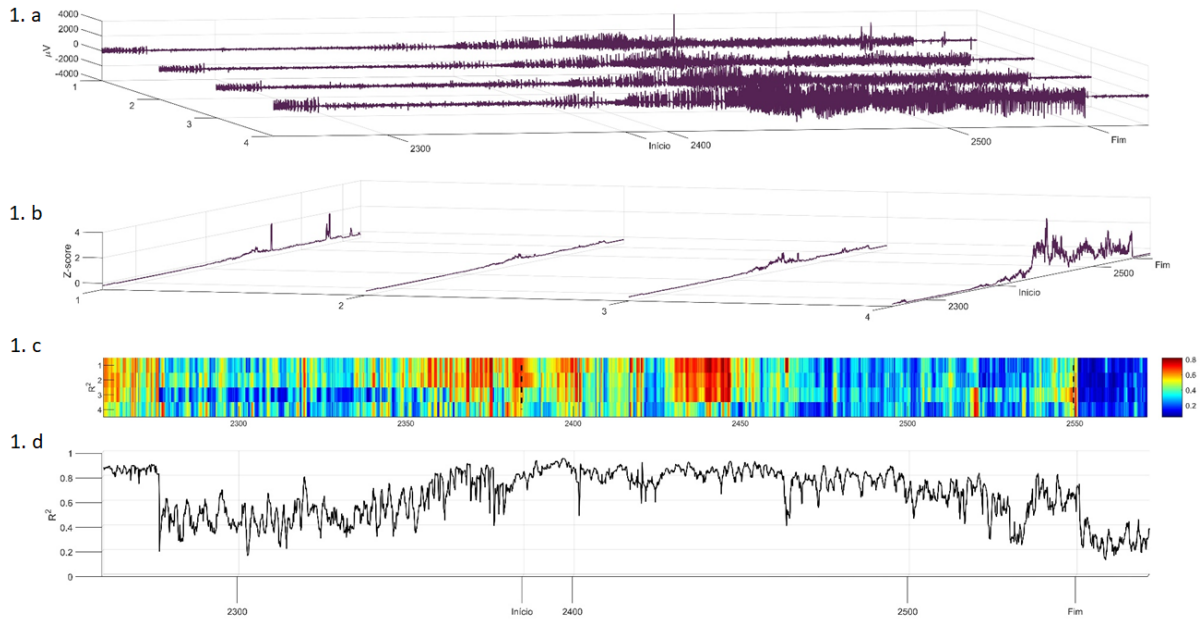


Figura 84: Análise de componentes principais do animal E3 durante as crises E3_02 e E3_04. Nos eixos, temos as três componentes utilizadas para a separação dos padrões. Os pontos azuis correspondem ao período pré-ictal, laranja ictal e verde pós-ictal. Note como os padrões de comportamento dos pontos são diferentes nas quatro crises.

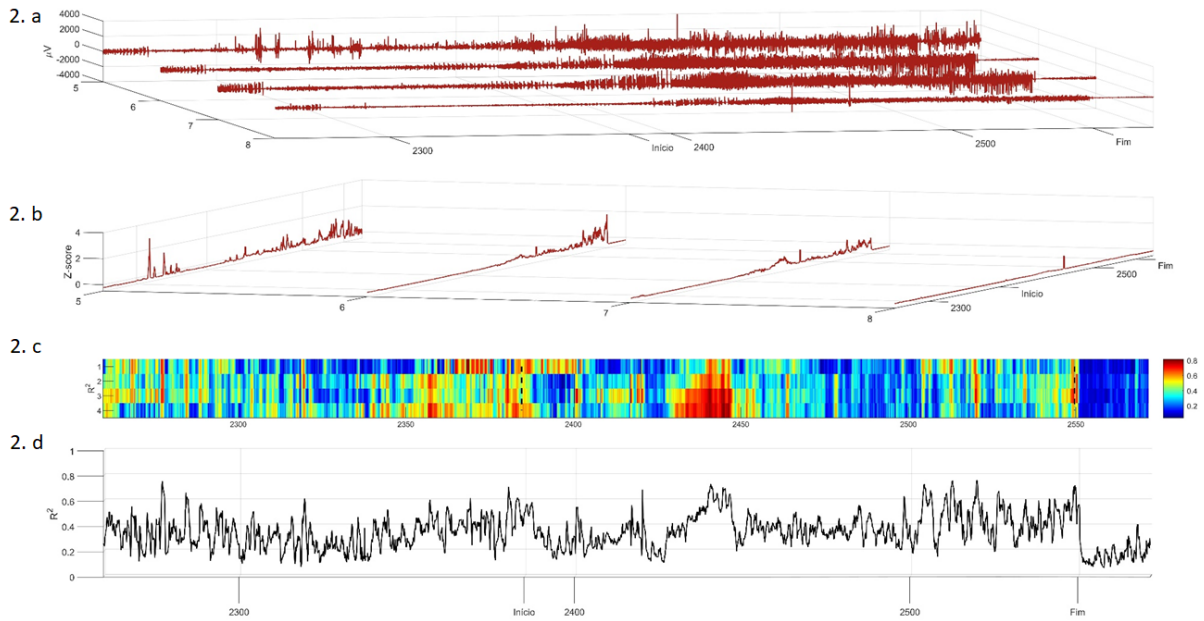
13.2.2.4 Animal E4

O último animal pertencente ao grupo estimulado (E4) apresentou somente um padrão de crises ao longo do tempo de registro, em que os disparos ictais foram encontrados em todas as áreas amostradas. Em todas as áreas foi observado um aumento de energia durante o período ictal (Figura 85 1a e 1b, 2a e 2b, 3a e 3b, 4a e 4b). As correlações intra-áreas apresentaram comportamento similar entre as áreas, com valores maiores de R^2 mais próximo do fim da crise. Assim como observado nos demais animais desse grupo, as amígdalas apresentaram altos valores de correlação intra-área (Figura 85 1c e 1d, 2c e 2d, 3c e 3d, 4c e 4d).

E4_04 – Amígdala Direita



E4_04 – Hipocampo Direito



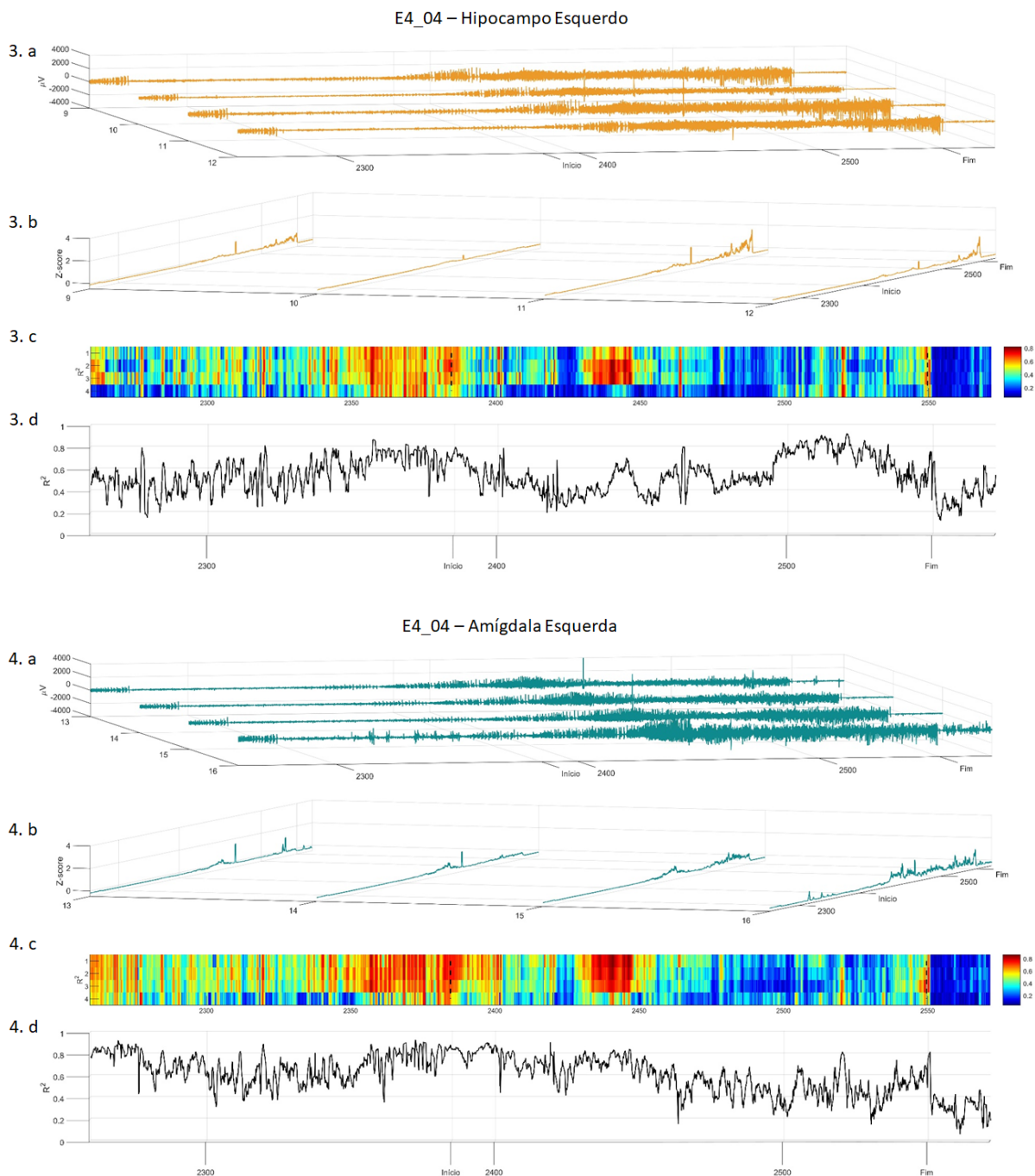


Figura 85 Análise de energia e similaridade durante o padrão ictal identificado no animal E4. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 60.

As correlações inter-áreas tiveram comportamento similar entre todos os pares analisados, com valores de R^2 caindo abruptamente após o fim da crise. Os pares que apresentaram maiores valores de correlação foram AmyD-AmyE (Figura 83 amarelo), HipD-HipE (Figura 86 roxo) e AmyE-HipE (Figura 86 azul claro)

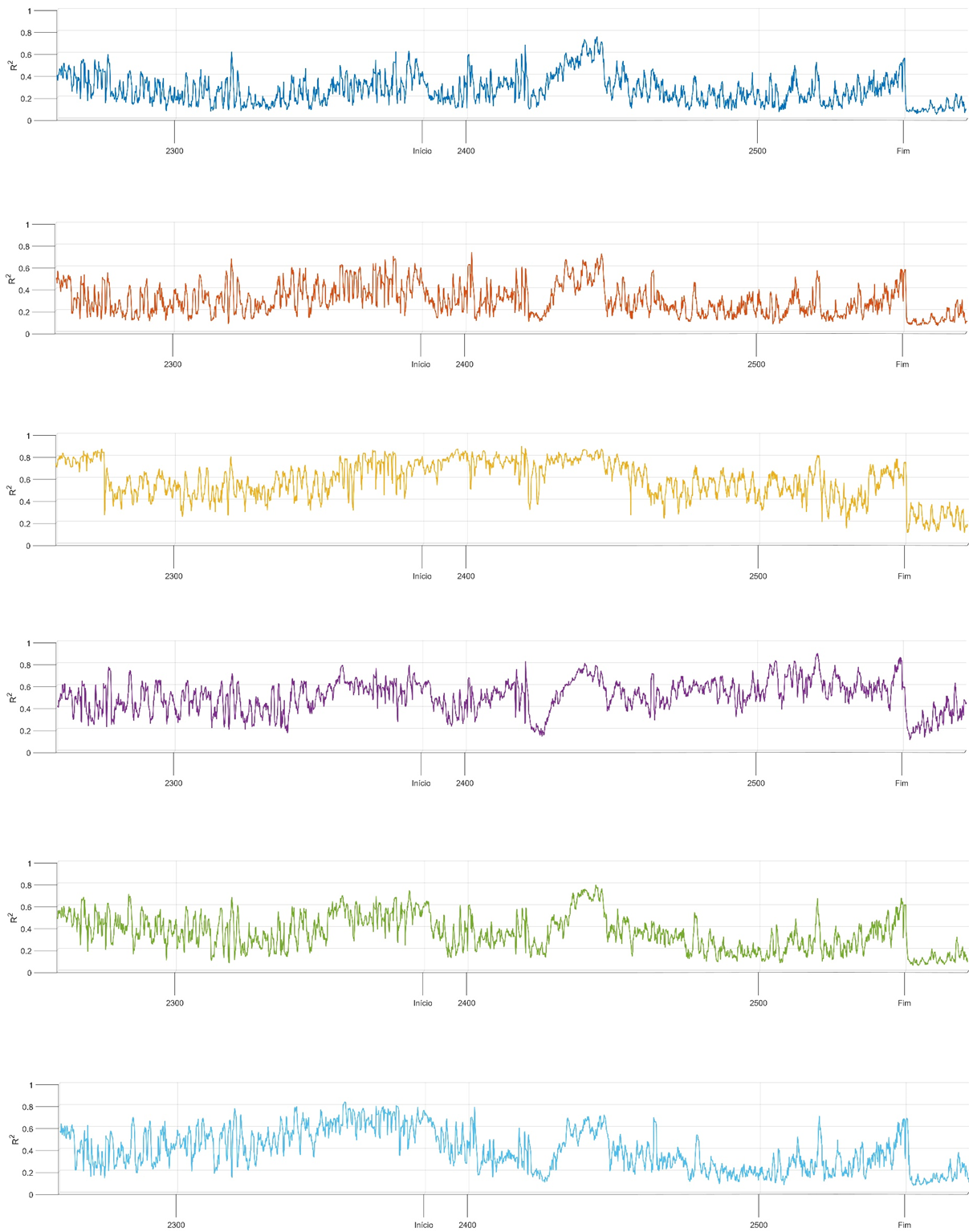


Figura 83: Análise de correlação inter-áreas do padrão de crise identificado no animal E4. Detalhes sobre a imagem na legenda da figura 61.

13.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES ICTAIS

13.3.1 Grupo Controle

13.3.4.1 Animal C1

Utilizando a análise de componentes principais, obtivemos uma combinação das variáveis em padrões, que distinguem os diferentes comportamentos de crise.

No animal **C1**, é possível observar que o padrão de comportamento das componentes principais durante o período pré-ictal e pós ictal (azul e verde, respectivamente) se sobrepõem na maioria das crises (Figura 87, crises 1, 2,3,4, 5, 6, 7 e 9). Porém, durante a crise (laranja), vemos que os pontos se aglutinam em dois clusters distintos na maioria dos eventos ictais (Figura 87, crises 2, 5, 7, 8 e 9)

a

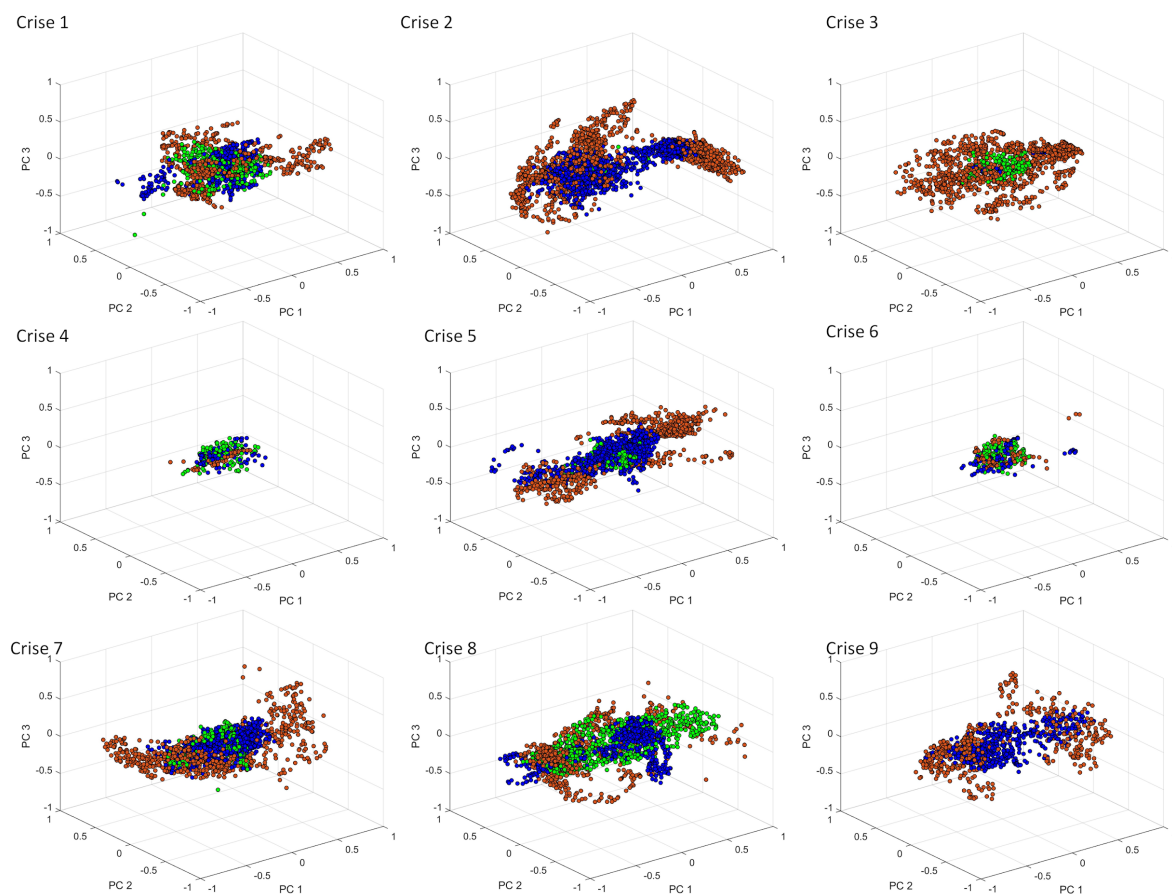


Figura 87: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **C1**. Os eixos representam os 3 componentes principais de maior peso na crise avaliada. Os pontos azuis representam o período pré-ictal, os laranjas o período ictal e os verdes o período pós ictal.

13.3.4.2 Animal C2

Na análise das características das crises do animal **C2** foram encontrados dois comportamentos distintos. O primeiro compreende a maior parte das crises e é o que os pontos que definem os períodos pré, durante e pós ictus se sobrepõem, não parecendo existir muita diferença entre a posição que eles ocupam no plano (Figura 88, crises 1, 3, 4, 5, 6, 7). O segundo tipo é aquele em que a crise apresenta um comportamento muito distinto do padrão pré e pós ictal (Figura 88, crises 2, 8 e 9).

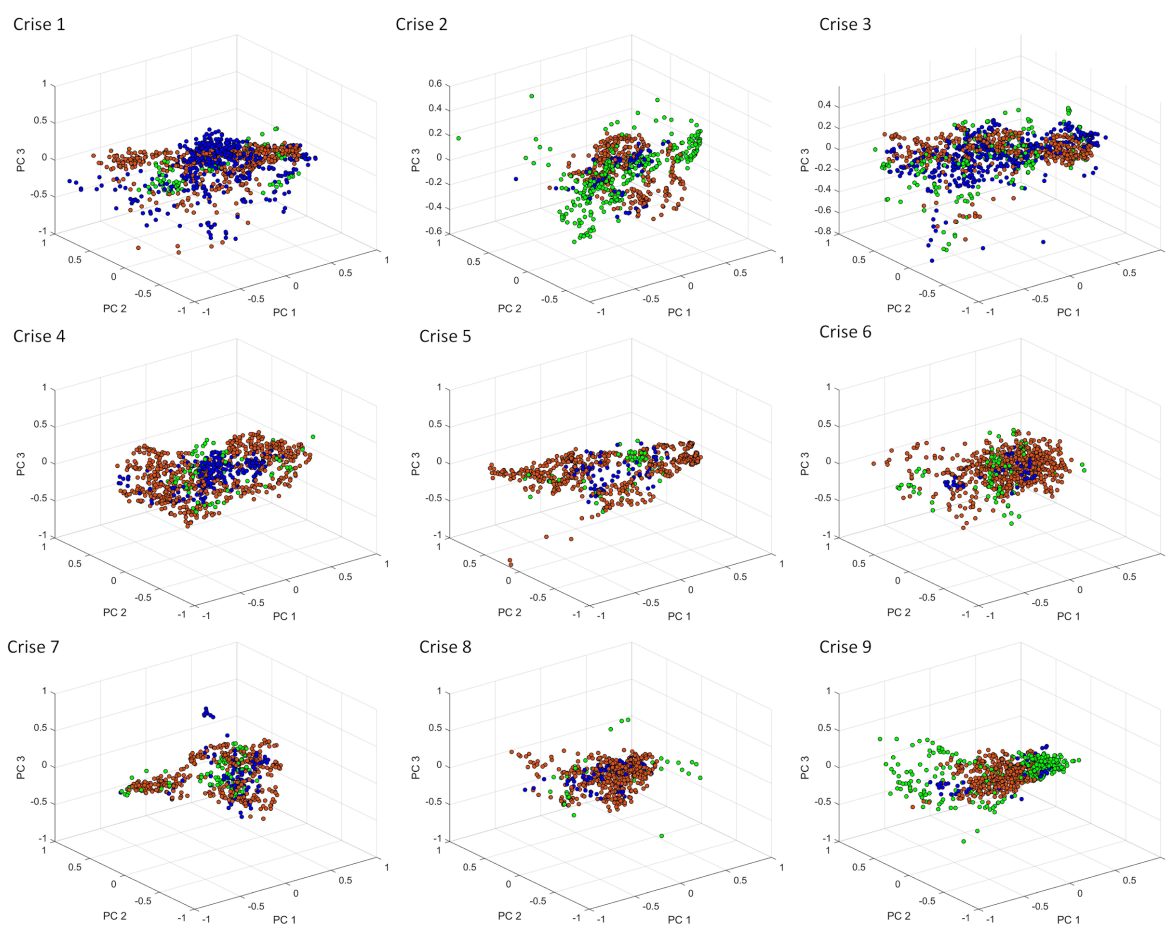


Figura 88: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **C2**. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

13.3.4.3 Animal C4

No último animal do grupo controle, tempos os crises agrupadas em 2 padrões distintos. O primeiro é o que ocorre na maioria, em que os pontos correspondentes à crise estão bem próximos, formando um *cluster* único e claramente distinguível dos períodos pré e pós ictal (Figura 89, crises 1, 3, 4, 5 e 6). O segundo comportamento é o que ocorre nas crises 2, 7 e 8 em que os pontos correspondentes ao período ictal se encontram mais distribuídos pelo plano, sem formar um *cluster* bem definido.

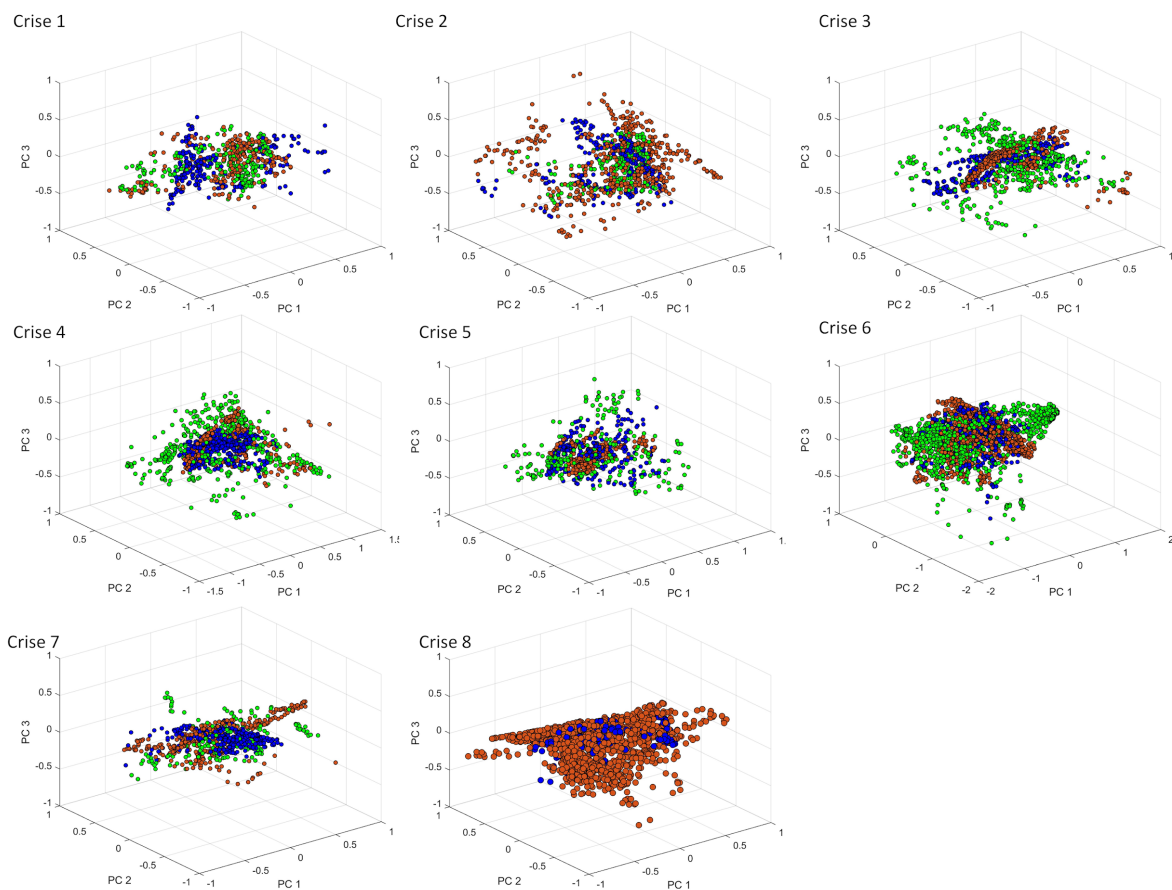


Figura 89: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **C4**. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

13.4.2 Grupo estimulado

13.3.4.1 Animal E1

As crises do animal **E1** antes do estímulo foram agrupadas em três padrões distintos, de acordo com o nível de clusterização. O primeiro é o que ocorre nas crises 1, 4, 5, 6 e 9 em que é possível ver a separação dos pontos correspondentes à crise em dois *clusters* distintos, claramente distinguível dos períodos pré e pós ictais (Figura 90). O segundo padrão é visto nas crises 2 e 8, onde o pontos laranjas (correspondentes à crise) se acumulam no centro do plano, formando um *cluster* único. O último padrão é o que ocorre nas crises 3 e 7, onde não é possível observar a formação de um ou mais clusters e os pontos correspondentes ao período ictal se sobrepõe aos do pré e pós ictal.

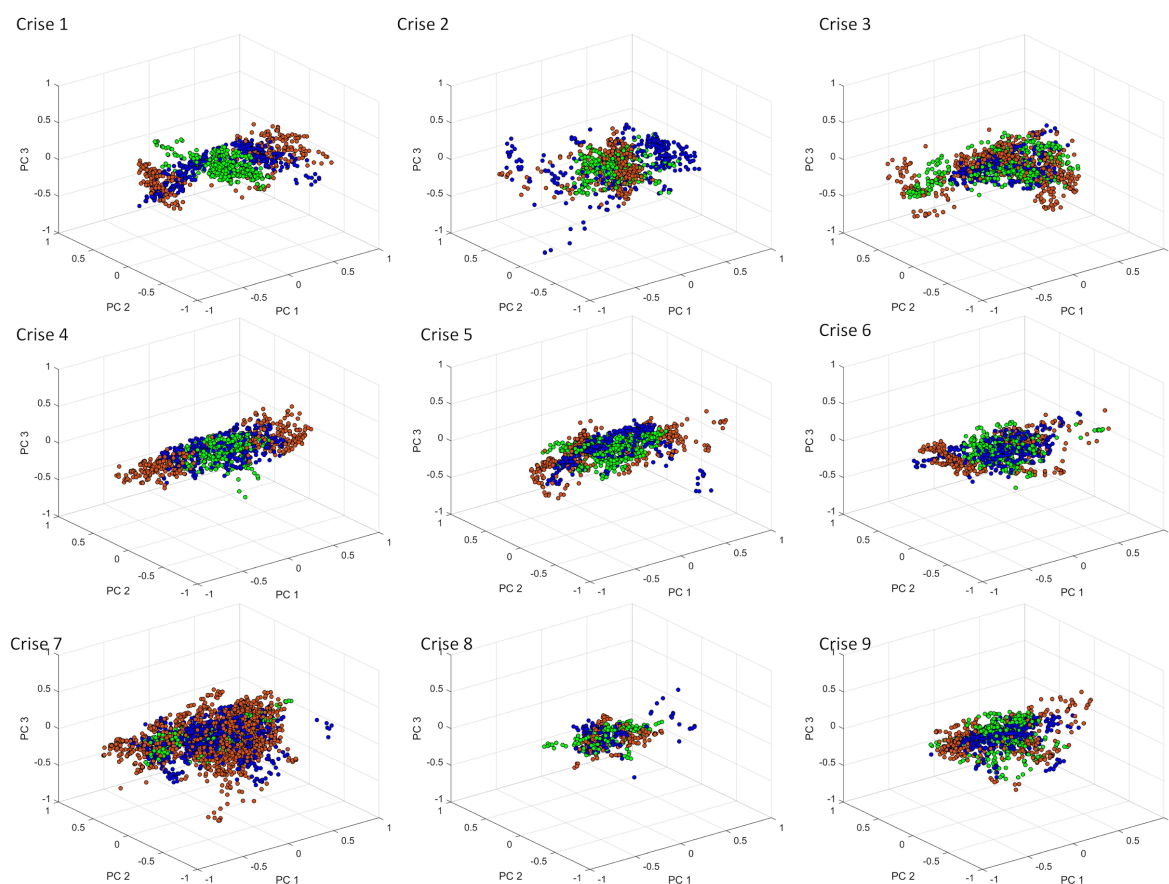
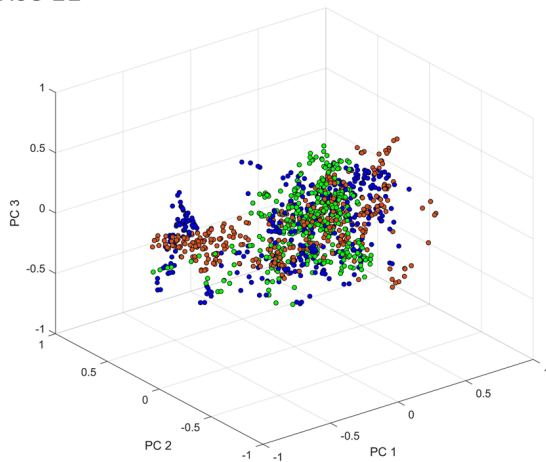


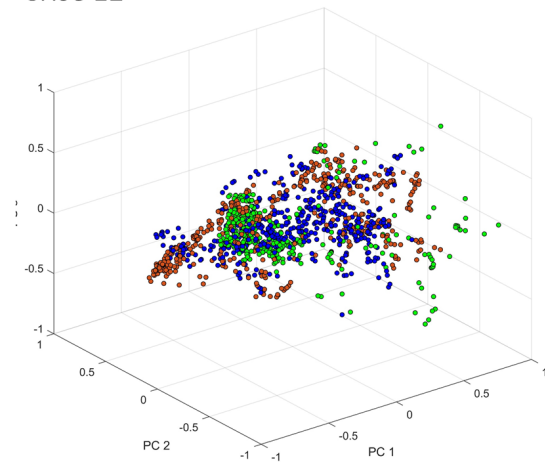
Figura 90: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **E1**, antes do primeiro ES. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

Após a estimulação elétrica os pontos correspondentes à crise se sobrepõem aos dos período pré e pós ictal, sem a ocorrência de clusterização.

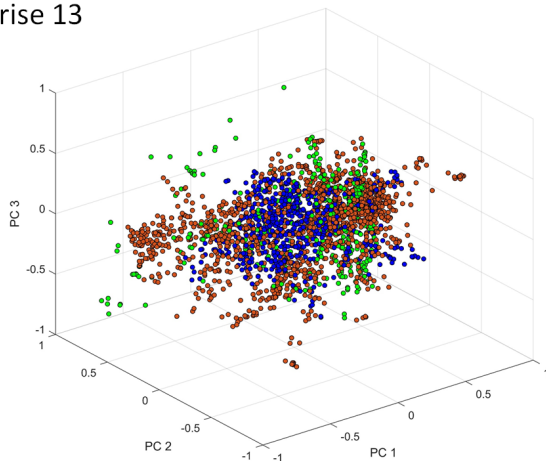
Crise 11



Crise 12



Crise 13



Crise 14

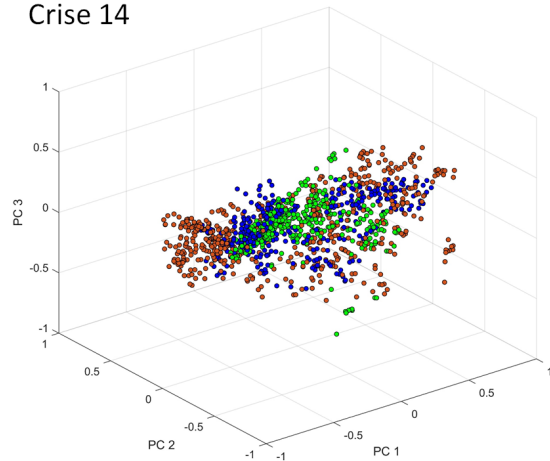


Figura 91: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **E1**, após o ES. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

13.3.4.1 Animal E2

Antes do estímulo elétrico as crises do animal **E2** se distinguem em dois padrões. O primeiro compreende as crises 1, 3 e 5, em que é observado que os pontos correspondentes ao período ictal tendem a se acumular em dois clusters distintos (Figura 92). Já no segundo padrão, presente nas crises 2 e 4, não é possível observar um agrupamento bem definido dos pontos correspondentes ao período ictal.

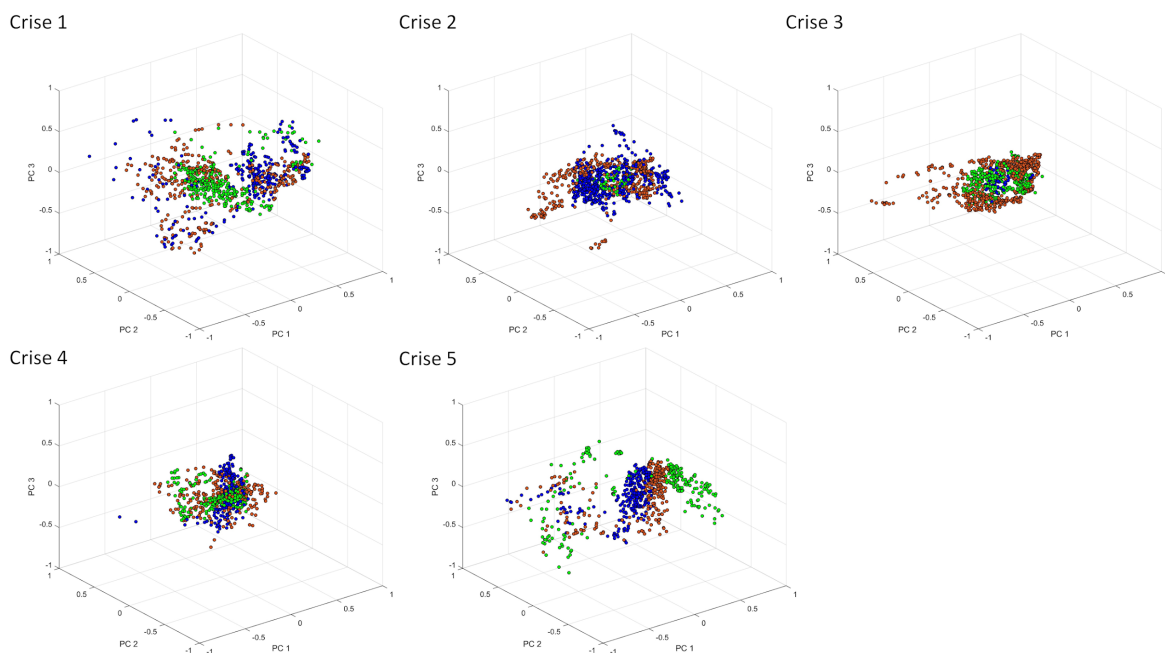


Figura 92: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **E2**, antes do ES. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

Após o estímulo elétrico as crises continuam apresentando dois padrões de comportamento de suas variáveis (Figura 93). Na crise 8, os pontos correspondentes aos 3 períodos pré, pós e ictal se sobrepõem enquanto na crise 9, temos um comportamento mais disperso.

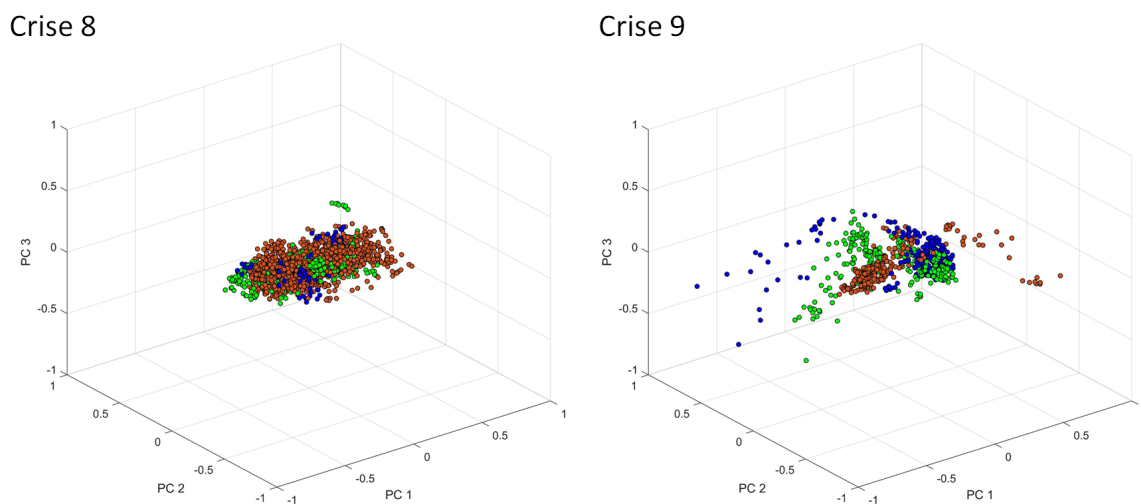


Figura 93: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **E2**, após o ES. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

13.3.4.1 Animal E3

O animal E3 apresenta um padrão de crise antes do estímulo, em que os pontos correspondentes aos períodos pré, pós e ictal se sobrepõem, sem a formação de *clusters* bem definidos.

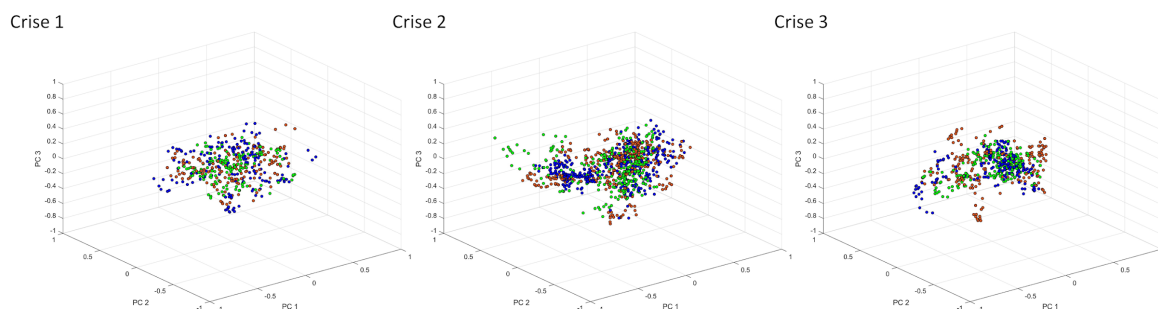


Figura 94: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **E3**, antes do ES. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

Após o estímulo elétrico só fomos capazes de registrar uma crise, resultando assim em um único padrão.

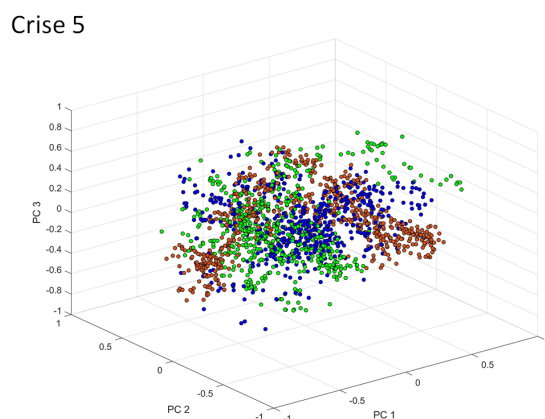
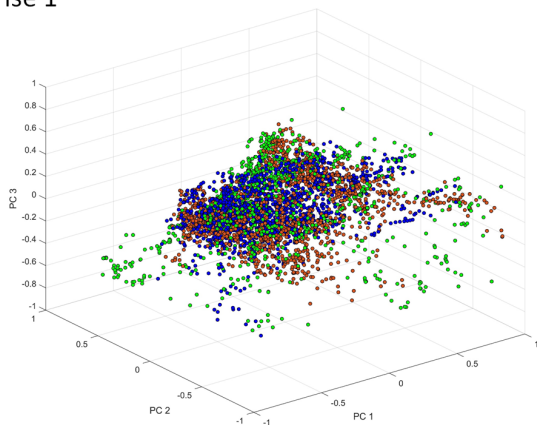


Figura 95: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **E3**, após o ES. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

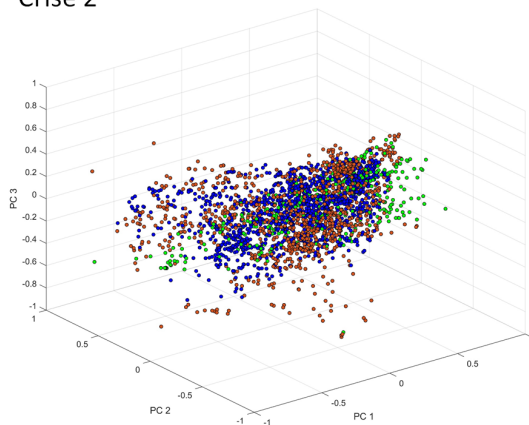
13.3.4.1 Animal E4

O último animal do grupo estimulado apresenta um comportamento de duas variáveis antes do estímulo, em que os pontos correspondentes aos três períodos se sobrepõem, sem uma tendência clara à clusterização.

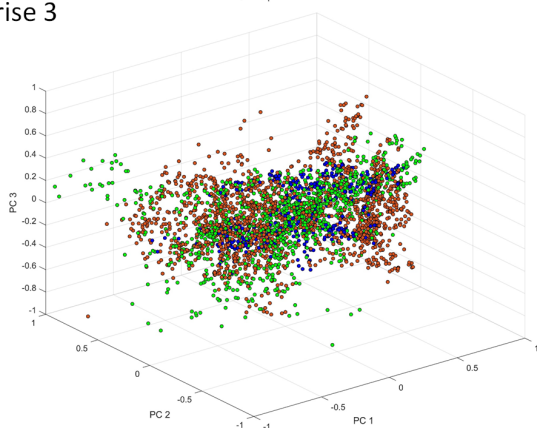
Crise 1



Crise 2



Crise 3



Crise 4

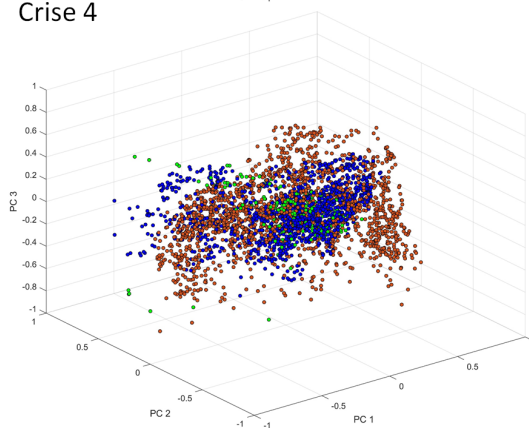
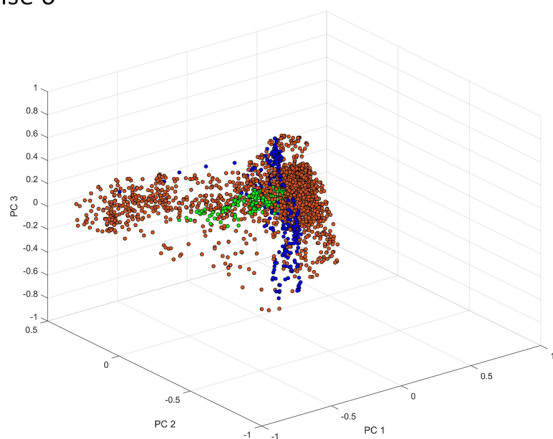


Figura 96: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **E4**, antes do ES. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

Após o estímulo elétrico o padrão dos pontos correspondentes ao período ictal (laranja) muda, sendo possível observar a formação de dois clusters distintos (Figura 97).

Crise 6



Crise 7

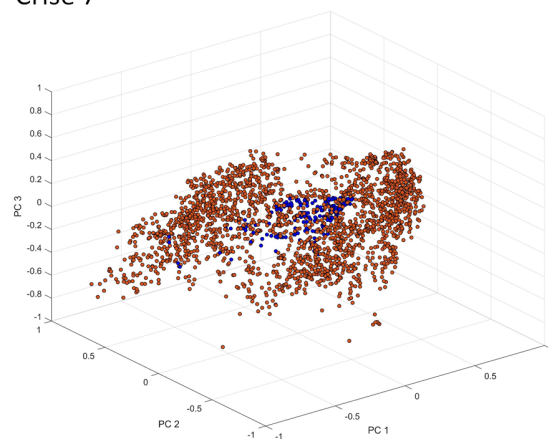


Figura 97: Análise das componentes principais dos eventos ictais do animal **E4**, após o ES. Detalhes da representação na legenda da figura 87.

14. DISCUSSÃO

14.1 IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS EPILEPTIFORMES

Como forma de assegurar a confiabilidade das identificações de eventos ictais realizada no capítulo 2, retirando as subjetividades existentes nos protocolos que dependem somente da visualização do experimentador, utilizamos a função *findpeaks* (MATLAB ®) para identificar as crises a partir dos picos de energia.

Durante a atividade ictal, temos um aumento de sincronismo e de excitabilidade local e a combinação desses dois fatores faz com que a energia do sinal aumente, destoando da atividade basal, como observado em todos os animais, com exceção do animal C3 (Figuras 51-58A). O z-score desse animal confirmou o que foi observado na análise visual do registro (capítulo 2), não sendo encontrado aumento de energia significativo e conseqüentemente nenhum evento ictal.

Obtivemos uma relação linear entre as duas formas de identificação com valores de p muito próximos de 1, demonstrando que a classificação visual dos eventos foi feita de forma correta e ambas as determinações puderam ser utilizadas para as análises seguintes. É interessante ressaltar que o objetivo da identificação utilizando o *findpeaks* não era automatizar o processo e sim confirmar de forma objetiva os achados pelo método visual. As metodologias que têm sido desenvolvidas com esse propósito utilizam diversas outras características do sinal além da energia (SHARMILA, 2018). Um fator preponderante do sucesso de utilizar somente o parâmetro Z-score da energia do sinal na detecção objetiva das crises foi a excelente relação sinal/ruído que obtivemos com os chips da INTAN e nosso desenho de capacete/conector.

14.2 ANÁLISE DE SIMILARIDADE

Realizamos análises de similaridade do registro como um todo para comparar as dinâmicas existentes antes e depois da injeção de ácido cáinico.

Nos dois primeiros animais do grupo controle, vemos uma grande correlação indiscriminada entre todas as combinações. Acreditamos que isso pode ter sido causado pela maior presença de ruído nesses animais do que nos demais. Como os

ruídos ocorrem em todos os canais amostrados simultaneamente, o valor de correlação tende a 1.

Em todos os animais, independente do grupo experimental, temos os maiores valores de p de *pearson* nas comparações intra-áreas. Esse padrão era o esperado já a probabilidade de correlação para quatro pontos de uma mesma área é maior quando comparado aos de áreas distintas. Contudo, fica nítido que a correlação HipD-HipD aumenta após a injeção de AK, como se esperaria de uma hiperconectividade local devido ao foco epiléptico. No mais, o grupo estimulado apresenta um aumento significativo de correlação entre AmyD-AmyD e, posteriormente, hiperconectividade contralateral. Uma análise estatística inter-grupo exige um n-amostral maior, que completaremos para a publicação do artigo.

As correlações inter-áreas apresentam bastante variação entre os animais, provavelmente fruto dos diferentes comportamentos que eles poderiam estar realizando na caixa durante o protocolo de registro. A porção basolateral do complexo amigdalóide apresenta alta conectividade inter-hemisférica (SCHMITT *et al.*, 2012), assim como CA3 (WITTER, 2007). Além disso, a BLA apresenta *outputs* para CA3. Assim, as áreas amostradas naturalmente já apresentam uma alta interconectividade o que propicia os altos valores de correlação encontrados em alguns dos animais.

14.3 ANÁLISE DE SIMILARIDADE POR EVENTO

As análises de energia e similaridade realizadas por evento ictal confirmaram os resultados observados no capítulo 2, reforçando a existência de padrões distintos de crises, com comportamentos de energia e correlações intra e inter-áreas que se diferenciam entre eles.

Nos animais de ambos os grupos, vemos um aumento da conectividade entre amígdala e hipocampo após a injeção de ácido caínico.

Essas áreas apresentam uma forte conectividade, amplamente reconhecido na clínica. Em muitos casos de cirurgia de retirada de foco em TLE, são feitas concomitantemente ressecções seletivas da amígdala, com melhores resultados na eliminação das crises (ALONSO-VANEGAS *et al.*, 2018; WEST *et al.*, 2019).

14.3.1 Grupo Controle

A dinâmica de energia dos animais pertencentes ao grupo controle seguiu o esperado, com aumento progressivo de energia demonstrado pelas curvas de Z-score durante o período ictal somente nas áreas envolvidas na atividade epileptiforme. No final das crises, os disparos tendem a ficar mais esparsos, com uma diminuição visível na frequência, porém com amplitudes ainda altas. Esse é o padrão de evolução de crises de lobo temporal, tendo sido descrito tanto em pacientes (ENGEL, J., 2001) quanto em modelos experimentais (LI *et al.*, 2018).

As correlações intra-áreas também possuem um padrão geral com aumento nos valores de R^2 durante o período ictal em todas os eventos dos animais desse grupo. Somente não é visto esse comportamento em crises em que nem todos os canais da área analisada foram recrutados (ex: C1_01, hipocampo esquerdo) ou quando a presença de canais ruidosos na região reduz a similaridade entre eles (ex: C4_03, amígdala direita, hipocampo direito e esquerdo).

As correlações inter-áreas tendem a ser maiores nos pares que são encontrados em um mesmo hemisfério ou que correspondem à comunicação inter-hemisférica entre a mesma estrutura. Esse padrão faz sentido ao observar as conexões sinápticas entre essas áreas, com alta interconectividade inter-hemisférica entre as amígdalas (SCHMITT *et al.*, 2012), entre as áreas CA3 via comissura (WITTER, 2007) e da amígdala basolateral para CA3 (PITKÄNEN *et al.*, 2006).

14.3.2 Grupo estimulado

O comportamento da energia nos animais pertencentes ao grupo estimulado é semelhante ao encontrado no grupo controle, com aumento do valor do Z-score durante o período ictal somente nas áreas que apresentaram disparos epileptiformes.

Porém em relação às correlações intra-áreas, em todos os animais pertencentes a esse grupo foram encontrados valores de R^2 da amígdala direita, local da estimulação, muito altos (superiores à 0,8). Esse resultado é um indício de que o estímulo aplicado durante o período basal não seja inócua no que diz respeito a um estado de sistema mais hiper-acoplado.

O protocolo de estimulação utilizado é o mesmo de outros projetos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa e já foi visto que o estímulo aplicado durante o período basal não é capaz de modificar a gravidade, duração, latência para início das crises nem a distribuição das energias em um espectro de frequência durante o período ictal (DE CASTRO MEDEIROS *et al.*, 2018; MEDEIROS, D. C. *et al.*, 2014). Porém, anteriormente não foram analisados os impactos desse protocolo na conexão local da área alvo. De acordo com os nossos dados, sugere-se uma série de 2 minutos de estímulo durante o período basal faz com que exista um maior acoplamentos nos circuitos locais.

Esse efeito da estimulação também é observado nas correlações inter-áreas em que na maioria dos eventos ictais dos animais estimulados, vemos os maiores valores de R^2 nos pares que envolvem a amígdala direita. Esse aumento de correlação inter-hemisférica sugere novamente que o estímulo utilizado possui a capacidade de modificar os padrões de conectividade durante a crise.

Nossa hipótese central foi a de que os disparos interictais agem como promotores de conectividade em cérebros acometidos pela epilepsia e utilizamos a estimulação elétrica como um simulador desses disparos. Nossos resultados indicam que esses eventos sincronizantes realmente modificam a conectividade entre os circuitos associados à crise. Isso sugere que o tratamento visando apenas inibir ou retirar o foco epiléptico pode não ser a melhor abordagem, tendo em vista a capacidade de modificação que os disparos inter-ictais possuem no circuito.

Encarando a epilepsia como um problema dinâmico, esses achados corroboram a ideia de que os estados do sistema como um todo são determinantes para a geração dos eventos epileptiformes onde fenômenos que facilitam a comunicação entre áreas podem agir como promotores da ocorrência de disparos fora do foco epiléptico inicial (CHVOJKA *et al.*, 2019).

Partindo da premissa de que eventos plásticos ocorrem durante as crises, sejam de curta duração via STDP (FELDMAN, 2012), ou longa duração via consolidação associada a crises (do inglês *seizure-related consolidation*) (BOWER *et al.*, 2015, 2017), esperaria-se que as áreas envolvidas no desenvolvimento crônico de crises seja diferente entre os animais dos dois grupos. Acreditamos que esses eventos poderão gerar, a longo prazo, crises que, além de recorrentes,

tenham múltiplos focos de origem, com maior espalhamento do que o esperado para o grupo controle. Tal hipótese necessita da observação desses animais após o período de latência para o início das crises e registro de diferentes 'áreas durante o processo.

14.4 IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES ICTAIS

Como uma forma de identificar a existência de padrões de crise e de diferença entre os grupos controle e estimulados, realizamos a análise de componentes principais.

Na maioria dos animais analisados, a PCA resultou em mais padrões de comportamento de crise do que foram definidos pela identificação visual. Isso ocorreu pois classificação feita no capítulo 2, somente o formato dos disparos epileptiformes e o número de áreas que foram recrutadas foram levadas em consideração para tal. Já a PCA cruza as características do registro, como amplitude e a correlação dos diferentes pares de áreas e contrasta com as características dos períodos pré e pós ictais. O somatório desses fatores resulta em uma classificação mais refinada do que a simples observação de eventos isolados.

Um comportamento interessante evidenciado pela PCA foi a de evolução dos tipos de crise. Em animais que apresentam mais de um padrão de comportamento ictal, observa-se uma sucessão progressiva nesses padrões, em que os primeiros tipos nunca aparecem em momentos mais tardios do registro. Isso pode indicar que ao longo da ocorrência dos eventos ictais, os agrupamentos de neurônios envolvidos sofrem alterações, possivelmente envolvendo efeitos plásticos, e não retornam para o padrão inicial.

14.4.1 Grupo Controle

Todos os animais do grupo controle apresentaram dois comportamentos de crise distintos, que diferem entre si de acordo com o nível de clusterização dos pontos correspondentes ao período ictal. Porém, a distribuição desses tipos de crise não se organiza em um padrão claro em relação à ocorrência sucessiva dos eventos ictais.

14.4.1 Grupo Estimulado

As crises dos animais estimulados, antes do segundo protocolo de estimulação, também se distinguem em 2 ou 3 comportamentos, agrupados pelo nível de clusterização dos pontos referentes ao período ictal. Após a estimulação, temos uma mudança visível no comportamento dos pontos nos animais E1 e E4, porém essa variação não é visível nos demais animais do mesmo grupo.

Provavelmente, um número maior de animais em cada um dos grupos se faz necessário para a observação desses padrões ictais, especialmente pois o número de crises depois do estímulo no presente trabalho é muito restrito, tendo animais com somente um evento ictal pós-Es.

15. CONCLUSÃO

- Fomos capazes de desenvolver os aparatos necessários para a realização de estímulos de pulsos programáveis e registros em diversas áreas com 16 pontos de amostragem
- Conseguimos reproduzir o modelo agudo de ictogênese por injeção de ácido caínico intra hipocampal
- Obtivemos registros de alta qualidade e longa duração de animais durante a crise em livre movimento
- Os métodos de identificação de eventos ictais e visual e automático são ambos eficientes
- Os padrões de comunicação intra-área e inter-área dos animais pertencentes ao grupo estimulado é distinto do grupo controle
- O estímulo elétrico é capaz de aumentar o acoplamento de circuitos locais
- Se faz necessário um aumento do n amostral para maiores conclusões

16. REFERÊNCIAS

AKAIKE, K. *et al.* Kainic acid-induced dorsal and ventral hippocampal seizures in rats. *Brain research*, v. 900, n. 1, p. 65–71, 4 maio 2001.

ALBRECHT, M. *et al.* Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Veterinary Research*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-014-0198-3>>. , 2014

ALONSO-VANEGAS, M. A. *et al.* Parahippocampectomy as a New Surgical Approach to Mesial Temporal Lobe Epilepsy Caused By Hippocampal Sclerosis: A Pilot Randomized Comparative Clinical Trial. *World neurosurgery*, v. 110, p. e1063–e1071, fev. 2018.

AMIT, D. J.; AMIT, D. J. *Modeling Brain Function: The World of Attractor Neural Networks*. [S.l.]: Cambridge University Press, 1992.

AVOLI, M.; DE CURTIS, M.; KÖHLING, R. Does interictal synchronization influence ictogenesis? *Neuropharmacology*, v. 69, p. 37–44, jun. 2013.

BENABID, A. L. *et al.* Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Applied neurophysiology*, v. 50, n. 1-6, p. 344–346, 1987.

BEN-ARI, Y.; LAGOWSKA, J. [Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, v. 287, n. 8, p. 813–816, 9 out. 1978.

BERTRAM, E. H. Neuronal circuits in epilepsy: do they matter? *Experimental neurology*, v. 244, p. 67–74, jun. 2013.

BI, G. Q.; POO, M. M. Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 18, n. 24, p. 10464–10472, 15 dez. 1998.

BOWER, M. R. *et al.* Evidence for consolidation of neuronal assemblies after seizures in humans. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 35, n. 3, p. 999–1010, 21 jan. 2015.

BOWER, M. R. *et al.* Reactivation of seizure-related changes to interictal spike shape and synchrony during postseizure sleep in patients. *Epilepsia*, v. 58, n. 1, p. 94–104, jan. 2017.

BRAGIN, A. *et al.* Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 15, n. 1 Pt 1, p. 47–60, jan. 1995.

BRAGIN, A. *et al.* Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100–500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid--treated rats with chronic

- seizures. *Epilepsia*, v. 40, n. 2, p. 127–137, fev. 1999.
- BRAGIN, A.; WILSON, C. L.; ENGEL, J., Jr. Chronic epileptogenesis requires development of a network of pathologically interconnected neuron clusters: a hypothesis. *Epilepsia*, v. 41 Suppl 6, p. S144–52, 2000.
- BREAKSPEAR, M. Dynamic models of large-scale brain activity. *Nature neuroscience*, v. 20, n. 3, p. 340–352, 23 fev. 2017.
- BRESSLER, S. L.; MENON, V. Large-scale brain networks in cognition: emerging methods and principles. *Trends in cognitive sciences*, v. 14, n. 6, p. 277–290, jun. 2010.
- BUONACCORSI, J. P. *et al.* MEASURING AND TESTING FOR SPATIAL SYNCHRONY. *Ecology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[1668:matfss\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[1668:matfss]2.0.co;2)>. , 2001
- BUZSAKI, G. *Rhythms of the Brain*. [S.l.]: Oxford University Press, 2006.
- BUZSÁKI, G.; LOGOTHETIS, N.; SINGER, W. Scaling brain size, keeping timing: evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron*, v. 80, n. 3, p. 751–764, 30 out. 2013.
- BUZSÁKI, G.; WATSON, B. O. Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, v. 14, n. 4, p. 345–367, dez. 2012.
- CANNON, C. Z. *et al.* Evaluation of dosages and routes of administration of tramadol analgesia in rats using hot-plate and tail-flick tests. *Lab animal*, v. 39, n. 11, p. 342–351, nov. 2010.
- CANNON, J. *et al.* Neurosystems: brain rhythms and cognitive processing. *The European journal of neuroscience*, v. 39, n. 5, p. 705–719, mar. 2014.
- CATANI, M. *et al.* Connectomic approaches before the connectome. *NeuroImage*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.109>>. , 2013
- CAVALHEIRO, E. A.; RICHE, D. A.; LE GAL LA SALLE, G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, v. 53, n. 6, p. 581–589, jun. 1982.
- CHROBAK, J. J.; BUZSÁKI, G. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 16, n. 9, p. 3056–3066, 1 maio 1996.
- CHVOJKA, J. *et al.* The role of interictal discharges in ictogenesis — A dynamical perspective. *Epilepsy & Behavior*. [S.l.: s.n.]. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106591>>. , 2019

CLARKE, V. R. *et al.* A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature*, v. 389, n. 6651, p. 599–603, 9 out. 1997.

COENEN, A.; ZAYACHKIVSKA, O. *Adolf Beck: A pioneer in electroencephalography in between Richard Caton and Hans Berger. Advances in Cognitive Psychology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5709/acp-0148-3>>. , 2013

COHEN, M. R.; KOHN, A. Measuring and interpreting neuronal correlations. *Nature neuroscience*, v. 14, n. 7, p. 811–819, 27 jun. 2011.

COTA, V. R. *et al.* Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylentetrazole seizure outcome. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 14 Suppl 1, p. 26–31, jan. 2009.

DE CASTRO MEDEIROS, D. *et al.* Deep brain stimulation probing performance is enhanced by pairing stimulus with epileptic seizure. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 88, p. 380–387, nov. 2018.

DECHANDT, C. R. P. *et al.* Energy Metabolism and Redox State in Brains of Wistar Audiogenic Rats, a Genetic Model of Epilepsy. *Frontiers in neurology*, v. 10, p. 1007, 1 out. 2019.

DE CURTIS, M.; AVANZINI, G. Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Progress in neurobiology*, v. 63, n. 5, p. 541–567, abr. 2001.

DENNIS, C. *Biologists launch “open-source movement”*. *Nature*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/431494a>>. , 2004

DE OLIVEIRA, J. C. *et al.* Asynchronous, bilateral, and biphasic temporally unstructured electrical stimulation of amygdalae enhances the suppression of pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Epilepsy research*, v. 146, p. 1–8, out. 2018.

DE OLIVEIRA, J. C. *et al.* Temporally unstructured electrical stimulation to the amygdala suppresses behavioral chronic seizures of the pilocarpine animal model. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 36, p. 159–164, jul. 2014.

DREXEL, M.; PREIDT, A. P.; SPERK, G. Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. *Neuropharmacology*, v. 63, n. 5, p. 806–817, out. 2012.

DÜMPELMANN, M.; JACOBS, J.; SCHULZE-BONHAGE, A. Temporal and spatial characteristics of high frequency oscillations as a new biomarker in epilepsy. *Epilepsia*, v. 56, n. 2, p. 197–206, fev. 2015.

ENGEL, A. K. *et al.* Interhemispheric synchronization of oscillatory neuronal responses in cat visual cortex. *Science*, v. 252, n. 5009, p. 1177–1179, 24 maio

1991.

ENGEL, J. *Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? The Neuroscientist*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/107385840100700410>>. , 2001

FELDMAN, D. E. *The Spike-Timing Dependence of Plasticity*. *Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.001>>. , 2012

FELDT MULDOON, S.; SOLTESZ, I.; COSSART, R. Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 9, p. 3567–3572, 26 fev. 2013.

FELL, J.; AXMACHER, N. The role of phase synchronization in memory processes. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 12, n. 2, p. 105–118, fev. 2011.

FISHER, R. S. *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, v. 46, n. 4, p. 470–472, abr. 2005.

FREESTONE, D. R. *et al.* Probing for cortical excitability. *Conference proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, v. 2011, p. 1644–1647, 2011.

FRÖHLICH, F.; MCCORMICK, D. A. Endogenous electric fields may guide neocortical network activity. *Neuron*, v. 67, n. 1, p. 129–143, 15 jul. 2010.

GAULT, J. M. *et al.* Approaches to neuromodulation for schizophrenia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, v. 89, n. 7, p. 777–787, jul. 2018.

GLASS, L. *Dynamical disease: Challenges for nonlinear dynamics and medicine*. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.4915529>>. , 2015

GRAY, C. M.; MCCORMICK, D. A. Chattering cells: superficial pyramidal neurons contributing to the generation of synchronous oscillations in the visual cortex. *Science*, v. 274, n. 5284, p. 109–113, 4 out. 1996.

GREICIUS, M. D. *et al.* Functional connectivity in the resting brain: A network analysis of the default mode hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0135058100>>. , 2003

GRILLNER, S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron*, v. 52, n. 5, p. 751–766, 7 dez. 2006.

GUIDINE, P. A. M. *et al.* Vesicular acetylcholine transporter knock-down mice are more susceptible to pilocarpine induced status epilepticus. *Neuroscience Letters*.

- [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.020>>. , 2008
- HARTMANN, C. J. *et al.* An update on best practice of deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Therapeutic advances in neurological disorders*, v. 12, p. 1756286419838096, 28 mar. 2019.
- HEATH, R. G.; MONROE, R. R.; MICKLE, W. A. *STIMULATION OF THE AMYGDALOID NUCLEUS IN A SCHIZOPHRENIC PATIENT*. *American Journal of Psychiatry*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1176/ajp.111.11.862>>. , 1955
- HEBB, D. O. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. [S.l.]: Psychology Press, 2002.
- HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. 1952. *Bulletin of mathematical biology*, v. 52, n. 1-2, p. 25–71; discussion 5–23, 1990.
- HOUSTON, A. *et al.* *Dynamic models in behavioural and evolutionary ecology*. *Nature*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/332029a0>>. , 1988
- HYAFIL, A. *et al.* Neural Cross-Frequency Coupling: Connecting Architectures, Mechanisms, and Functions. *Trends in neurosciences*, v. 38, n. 11, p. 725–740, nov. 2015.
- ISAACSON, J. S.; SCANZIANI, M. *How Inhibition Shapes Cortical Activity*. *Neuron*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.027>>. , 2011
- JAN, M. M.; SADLER, M.; RAHEY, S. R. Electroencephalographic features of temporal lobe epilepsy. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, v. 37, n. 4, p. 439–448, jul. 2010.
- JEFFERYS, J. G. R. *et al.* *Mechanisms of physiological and epileptic HFO generation*. *Progress in Neurobiology*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.02.005>>. , 2012
- JIRUSKA, P. *et al.* Synchronization and desynchronization in epilepsy: controversies and hypotheses. *The Journal of physiology*, v. 591, n. 4, p. 787–797, 15 fev. 2013.
- JONES, E. G. *Neurotransmitters in the cerebral cortex*. *Journal of Neurosurgery*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3171/jns.1986.65.2.0135>>. , 1986
- KALITZIN, S. *et al.* Electrical brain-stimulation paradigm for estimating the seizure onset site and the time to ictal transition in temporal lobe epilepsy. *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, v. 116, n. 3, p. 718–728, mar. 2005.
- KALITZIN, S. *et al.* Reply to “Electrical stimulation to assess brain dynamics and the probability of inter-ictal to ictal transitions could give Penfield and Heisenberg ‘fits’” by Osorio *et al.* *Clinical Neurophysiology*. [S.l: s.n.]. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2005.10.026>>. , 2006

KAMIYA, H.; OZAWA, S. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *The Journal of physiology*, v. 523 Pt 3, p. 653–665, 15 mar. 2000.

KAROLY, P. J. *et al.* Seizure pathways: A model-based investigation. *PLoS computational biology*, v. 14, n. 10, p. e1006403, out. 2018.

KLEE, R. *et al.* Various modifications of the intrahippocampal kainate model of mesial temporal lobe epilepsy in rats fail to resolve the marked rat-to-mouse differences in type and frequency of spontaneous seizures in this model. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 68, p. 129–140, mar. 2017.

KOPELL, N. J. *et al.* Beyond the connectome: the dynamome. *Neuron*, v. 83, n. 6, p. 1319–1328, 17 set. 2014.

LACKMY-VALLEE, A.; GIBOIN, L.-S.; MARCHAND-PAUVERT, V. Non-linear input-output properties of the cortical networks mediating TMS-induced short-interval intracortical inhibition in humans. *The European journal of neuroscience*, v. 35, n. 3, p. 457–467, fev. 2012.

LARSON-PRIOR, L. J. *et al.* Adding dynamics to the Human Connectome Project with MEG. *NeuroImage*, v. 80, p. 190–201, 15 out. 2013.

LI, L. *et al.* Seizure development in the acute intrahippocampal epileptic focus. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1423, 23 jan. 2018.

LIMA, I. V. DE A. *et al.* Postictal alterations induced by intrahippocampal injection of pilocarpine in C57BL/6 mice. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 64, n. Pt A, p. 83–89, nov. 2016.

LOPES DA SILVA, F. H. *et al.* Dynamical diseases of brain systems: different routes to epileptic seizures. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, v. 50, n. 5, p. 540–548, maio 2003.

LOPES DA SILVA, F. H.; PIJN, J. P.; WADMAN, W. J. Dynamics of local neuronal networks: control parameters and state bifurcations in epileptogenesis. *Progress in brain research*, v. 102, p. 359–370, 1994.

LOZANO, A. M.; LIPSMAN, N. Probing and regulating dysfunctional circuits using deep brain stimulation. *Neuron*, v. 77, n. 3, p. 406–424, 6 fev. 2013.

MACDONALD, K. D. *et al.* Focal stimulation of the thalamic reticular nucleus induces focal gamma waves in cortex. *Journal of neurophysiology*, v. 79, n. 1, p. 474–477, jan. 1998.

MACHADO, A. B. M.; HAERTEL, L. M. *Neuroanatomia funcional*. [S.l.: s.n.], 2014.

MAIA, C. *et al.* Risk of recurrence after a first unprovoked seizure in children. *Jornal*

de pediatria, v. 93, n. 3, p. 281–286, maio 2017.

MATHALON, D. H.; SOHAL, V. S. *Neural Oscillations and Synchrony in Brain Dysfunction and Neuropsychiatric Disorders*. *JAMA Psychiatry*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.0483>>. , 2015

MEDEIROS, D. C. *et al.* Temporal rearrangement of pre-ictal PTZ induced spike discharges by low frequency electrical stimulation to the amygdaloid complex. *Brain stimulation*, v. 7, n. 2, p. 170–178, mar. 2014.

MEDEIROS, D. DE C.; MORAES, M. F. D. Focus on desynchronization rather than excitability: a new strategy for intraencephalic electrical stimulation. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 38, p. 32–36, set. 2014.

MERRILL, M. A. *et al.* Localization of the serotonergic terminal fields modulating seizures in the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Research*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.07.002>>. , 2007

MESULAM, M.-M. *Large-scale neurocognitive networks and distributed processing for attention, language, and memory*. *Annals of Neurology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ana.410280502>>. , 1990

MILLER, L. P. *et al.* The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain—II. Kainic acid receptors. *Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90118-n](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(90)90118-n)>. , 1990

MILLER, P. Dynamical systems, attractors, and neural circuits. *F1000Research*, v. 5, 24 maio 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.7698.1>>.

MORAES, M. F. D.; CHAVALI, M.; *et al.* A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures of GEPR-9s. *Brain Research*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.10.066>>. , 2005

MORAES, M. F. D.; MISHRA, P. K.; *et al.* An electrographic analysis of the synchronous discharge patterns of GEPR-9s generalized seizures. *Brain Research*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.035>>. , 2005

MORMANN, F. *et al.* Seizure prediction: the long and winding road. *Brain*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/brain/awl241>>. , 2007

NADLER, J. V.; VICTOR NADLER, J. *Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy*. *Life Sciences*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90659-7](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(81)90659-7)>. , 1981

NEHLIG, A.; PEREIRA DE VASCONCELOS, A. The model of pentylenetetrazol-induced status epilepticus in the immature rat: short- and long-term effects. *Epilepsy research*, v. 26, n. 1, p. 93–103, dez. 1996.

OSORIO, I.; BHAVARAJU, N. C.; FREI, M. G. *Electrical stimulation to assess brain dynamics and the probability of inter-ictal to ictal transitions could give Penfield and*

- Heisenberg “fits”. *Clinical Neurophysiology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2005.09.028>>. , 2006
- PARK, H.-J.; -J. PARK, H.; FRISTON, K. *Structural and Functional Brain Networks: From Connections to Cognition*. *Science*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1238411>>. , 2013
- PASQUETTI, M. V. *et al.* Hippocampal CA1 and cortical interictal oscillations in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain research*, v. 1722, p. 146351, 1 nov. 2019.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. [S.l.]: Academic Press, 2013.
- PENFIELD, W.; JASPER, H. *EPILEPSY AND THE FUNCTIONAL ANATOMY OF THE HUMAN BRAIN*. *Southern Medical Journal*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/00007611-195407000-00024>>. , 1954
- PENTTONEN, M.; BUZSÁKI, G. *Natural logarithmic relationship between brain oscillators*. *Thalamus and Related Systems*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/s1472928803000074>>. , 2003
- PINTO, H. P. P. *et al.* Seizure Susceptibility Corrupts Inferior Colliculus Acoustic Integration. *Frontiers in systems neuroscience*, v. 13, p. 63, 6 nov. 2019.
- PITKÄNEN, A. *et al.* *Epileptogenesis in Experimental Models*. *Epilepsia*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01063.x>>. , 2007
- PITKÄNEN, A. *et al.* *Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation, Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat: A Review*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06738.x>>. , 2006
- RAEDT, R. *et al.* Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta neurologica Scandinavica*, v. 119, n. 5, p. 293–303, maio 2009.
- RATTKA, M.; BRANDT, C.; LÖSCHER, W. The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. *Epilepsy research*, v. 103, n. 2-3, p. 135–152, fev. 2013.
- RICHARDSON, D. E.; AKIL, H. Pain reduction by electrical brain stimulation in man. Part 1: Acute administration in periaqueductal and periventricular sites. *Journal of neurosurgery*, v. 47, n. 2, p. 178–183, ago. 1977a.
- RICHARDSON, D. E.; AKIL, H. Pain reduction by electrical brain stimulation in man. Part 2: Chronic self-administration in the periventricular gray matter. *Journal of neurosurgery*, v. 47, n. 2, p. 184–194, ago. 1977b.
- RICHARDSON, M. P. Large scale brain models of epilepsy: dynamics meets connectomics. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, v. 83, n. 12, p.

1238–1248, dez. 2012.

RICKLES, D.; HAWE, P.; SHIELL, A. A simple guide to chaos and complexity. *Journal of epidemiology and community health*, v. 61, n. 11, p. 933–937, nov. 2007.

RODRÍGUEZ-MORENO, A.; HERRERAS, O.; LERMA, J. Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron*, v. 19, n. 4, p. 893–901, out. 1997.

RODRIGUEZ-MORENO, A.; LOPEZ-GARCIA, J. C.; LERMA, J. *Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. Proceedings of the National Academy of Sciences*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.3.1293>>. , 2000

ROELFSEMA, P. R. *et al.* Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas. *Nature*, v. 385, n. 6612, p. 157–161, 9 jan. 1997.

SCHARFMAN, H. E. Epilepsy as an example of neural plasticity. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, v. 8, n. 2, p. 154–173, abr. 2002.

SCHMITT, O. *et al.* The Intrinsic Connectome of the Rat Amygdala. *Frontiers in neural circuits*, v. 6, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518970/>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

SHARMA, A. K. *et al.* Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicologic pathology*, v. 35, n. 7, p. 984–999, dez. 2007.

SHARMILA, A. Epilepsy detection from EEG signals: a review. *Journal of medical engineering & technology*, v. 42, n. 5, p. 368–380, jul. 2018.

SIK, A. *et al.* Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *The Journal of Neuroscience*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.15-10-06651.1995>>. , 1995

SMITH, S. J. M. *EEG in the diagnosis, classification, and management of patients with epilepsy. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2005.069245>>. , 2005

SPORNS, O. *Discovering the Human Connectome*. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7551/mitpress/9266.001.0001>>. , 2012

SPORNS, O.; TONONI, G.; KÖTTER, R. *The Human Connectome: A Structural Description of the Human Brain. PLoS Computational Biology*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010042>>. , 2005a

SPORNS, O.; TONONI, G.; KÖTTER, R. The human connectome: A structural description of the human brain. *PLoS computational biology*, v. 1, n. 4, p. e42, set.

2005b.

STAFSTROM, C. E.; CARMANT, L. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 5, n. 6, 1 jun. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a022426>>.

STALEY, K. *Molecular mechanisms of epilepsy*. *Nature Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.3947>>. , 2015

STANLEY, M. L. *et al.* Defining nodes in complex brain networks. *Frontiers in computational neuroscience*, v. 7, p. 169, 22 nov. 2013.

STEIN, A. VON; VON STEIN, A.; SARNTHEIN, J. *Different frequencies for different scales of cortical integration: from local gamma to long range alpha/theta synchronization*. *International Journal of Psychophysiology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0167-8760\(00\)00172-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-8760(00)00172-0)>. , 2000

SUFFCZYNSKI, P. *et al.* Active paradigms of seizure anticipation: computer model evidence for necessity of stimulation. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, v. 78, n. 5 Pt 1, p. 051917, nov. 2008.

SWANSON, L. W.; LICHTMAN, J. W. From Cajal to Connectome and Beyond. *Annual review of neuroscience*, v. 39, p. 197–216, 8 jul. 2016.

TEHOVNIK, E. J. Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. *Journal of neuroscience methods*, v. 65, n. 1, p. 1–17, mar. 1996.

TÉLLEZ-ZENTENO, J. F.; HERNÁNDEZ-RONQUILLO, L. *A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy*. *Epilepsy Research and Treatment*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/630853>>. , 2012

THOM, M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and applied neurobiology*, v. 40, n. 5, p. 520–543, ago. 2014.

TONONI, G.; KOCH, C. Consciousness: here, there and everywhere? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 370, n. 1668, 19 maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0167>>.

UVA, L.; AVOLI, M.; DE CURTIS, M. Synchronous GABA-receptor-dependent potentials in limbic areas of the in-vitro isolated adult guinea pig brain. *The European journal of neuroscience*, v. 29, n. 5, p. 911–920, mar. 2009.

VALENTÍN, A. *et al.* Single pulse electrical stimulation for identification of structural abnormalities and prediction of seizure outcome after epilepsy surgery: a prospective study. *Lancet neurology*, v. 4, n. 11, p. 718–726, nov. 2005.

VALLBO, Å. B. Microneurography: how it started and how it works. *Journal of neurophysiology*, v. 120, n. 3, p. 1415–1427, 1 set. 2018.

VAN DEN HEUVEL, M. P.; SPORNS, O. Network hubs in the human brain. *Trends in*

cognitive sciences, v. 17, n. 12, p. 683–696, dez. 2013.

VARELA, F. *et al.* The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 2, n. 4, p. 229–239, abr. 2001.

VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V. History of electrophysiology and the patch clamp. *Methods in molecular biology*, v. 1183, p. 1–19, 2014.

VILELA, L. R. *et al.* Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylentetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 75, p. 29–35, out. 2017.

VON STEIN, A.; CHIANG, C.; KÖNIG, P. Top-down processing mediated by interareal synchronization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 26, p. 14748–14753, 19 dez. 2000.

WANG, X.-J. Attractor Network Models. *Encyclopedia of Neuroscience*. [S.l.]: Elsevier, 2009. p. 667–679.

WEST, S. *et al.* Surgery for epilepsy. *Cochrane database of systematic reviews*, v. 6, p. CD010541, 25 jun. 2019.

WHITTINGTON, M. A. *et al.* Inhibition-based rhythms: experimental and mathematical observations on network dynamics. *International journal of psychophysiology: official journal of the International Organization of Psychophysiology*, v. 38, n. 3, p. 315–336, 1 dez. 2000.

WITTER, M. P. Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: indications for connectional heterogeneity. *Learning & memory*, v. 14, n. 11, p. 705–713, nov. 2007.

ZENG, H. Mesoscale connectomics. *Current opinion in neurobiology*, v. 50, p. 154–162, jun. 2018.

ZHANG, E. Q.; KNIGHT, C. G.; PANG, D. S. Heating Pad Performance and Efficacy of 2 Durations of Warming after Isoflurane Anesthesia of Sprague-Dawley Rats (). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, v. 56, n. 6, p. 786–791, 1 nov. 2017.

17. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite **CEUA** que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 381/2017

Título do projeto: Sondagem do processo epileptogênico e ictogênico por estimulação elétrica profunda em um modelo de epilepsia de lobo temporal

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Marcio Flavio Dutra Moraes

Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas

Departamento: Departamento de Fisiologia e Biofisica

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado com recomendação na reunião do dia 09/04/2018. Validade: 09/04/2018 à 08/04/2023
Recomendação: Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.

Belo Horizonte, 09/04/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite **CEUA** UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br