

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Samir Salim Carvalho

**Respostas Auditivas Evocadas em Regime Permanente
para Avaliar Acoplamento Anormal em Modelo Animal de
Epilepsia do Lobo Temporal**

Belo Horizonte

2021

Samir Salim Carvalho

**Respostas Auditivas Evocadas em Regime Permanente
para Avaliar Acoplamento Anormal em Modelo Animal de
Epilepsia do Lobo Temporal**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de **Mestre**.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Coorientador: Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão

Belo Horizonte

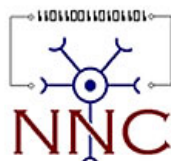
2021

Este trabalho foi desenvolvido no **Núcleo de Neurociências - NNC** (Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais), com o 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



043 Carvalho, Samir Salim.
Respostas auditivas evocadas em regime permanente para avaliar
acoplamento anormal em modelos animais de crises convulsivas [manuscrito] /
Samir Salim Carvalho. – 2021.
91 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes. Coorientador: Dr. Flávio
Afonso Gonçalves Mourão.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Epilepsia. 3. Convulsões. 4. Potenciais Evocados
Auditivos. 5. Epilepsia do Lobo Temporal. I. Moraes, Marcio Flavio Dutra. II.
Mourão, Flávio Afonso Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Respostas Auditivas Evocadas em Regime Permanente para Avaliar Acoplamento Anormal em Modelos Animais de Crises Convulsivas.

SAMIR SALIM CARVALHO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS.

Aprovada em 20 de abril de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Vinícius Rosa Cota

UFSJ

Prof(a). Victor Rodrigues Santos

UFMG

Prof(a). Flávio Afonso Gonçalves Mourão

UFMG

Prof(a). Márcio Flávio Dutra Moraes - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 20 de abril de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Flávio Afonso Gonçalves Mourão**, **Usuário Externo**, em 20/04/2021, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Vinícius Rosa Cota**, **Usuário Externo**, em 20/04/2021, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13](#)



de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor do Magistério Superior**, em 20/04/2021, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Flavio Dutra Moraes, Professor do Magistério Superior**, em 20/04/2021, às 23:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0659533** e o código CRC **E1CFF5EA**.

Dedico este trabalho à minha família.

Agradecimentos

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

Essa epígrafe mostra que as novas descobertas se apoiam sobre as anteriores e assim ocorre a construção do conhecimento e desenvolvimento científico. Nesse sentido, gostaria de agradecer às pessoas que auxiliaram no meu desenvolvimento pessoal, científico e humano ao longo do período do meu mestrado. Ao meu orientador, Professor Marcio e coorientador Flávio agradeço pelos ensinamentos e pelo auxílio na construção do raciocínio científico. Ao Leo pela ajuda com a técnica cirúrgica e no manejo dos animais de laboratório. Agradeço ao Flávio, Vinícius e Daniel pelo auxílio na análise dos dados. Aos meus colegas de bancada, Mateus e Larissa, sempre dispostos a ajudar e passar os apertos juntos. À Tom por ter me auxiliado nas histologias e apoio nos momentos difíceis. Aos membros do NNC de forma geral, incluindo Flavio, Vinicius, Daniel, Leo, Sérgio, Caio, Simões, Bia, Eduardo, Laura, Luciana, Gisele, Lorenas, Osman e professores do NNC (Marcio, Grace, Massensini, Bruno, Cleiton, Mazoni) pelas discussões, críticas construtivas e por me fazer uma pessoa melhor.

Gostaria de agradecer também às pessoas que me apoiaram nesse período do mestrado que não fazem parte do NNC e que são muito importantes para mim. Primeiramente aos meus pais, Antonio e Laila, pela força e pelo apoio diante de todas as dificuldades da vida e do mestrado. Vocês me auxiliaram ao longo dessa caminhada mesmo nos momentos de dificuldade e dúvida e por isso sou muito grato. Aos meus irmãos, Arthur e Augusto, pelo companheirismo e por fazerem dos meus momentos em casa mais leves. À minha avó Lucy, minha companheira de viagem, pelos ensinamentos e bons momentos juntos. Aos meus tios Samira, Roberto, Oscar e Patrícia que mesmo à distância se fizeram presentes. Aos meus primos que fizeram meus momentos em família melhores. À Brissa, pelo companheirismo e compreensão nos momentos de grande dificuldade e na minha ausência enquanto me dedicava a este trabalho. Obrigado por ter ficado ao meu

lado. Aos meus amigos do colégio que continuam presentes e me incentivando mesmo com todas as dificuldades da pandemia.

Resumo

Até 80% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal (TLE) não respondem adequadamente aos anticonvulsivantes e nos últimos trinta anos houve poucos avanços no tratamento farmacológico, de forma que se faz necessária nova forma de abordagem no estudo das epilepsias. Atualmente, entende-se a epilepsia como um desbalanço entre excitação e inibição e, recentemente, o hipersincronismo entre redes neurais na presença ou não desse desbalanço tem se mostrado uma nova forma de entender os motivos que predispõe o cérebro a desenvolver epilepsia. Neste trabalho foi utilizada a resposta auditiva evocada em regime permanente (ASSR) para avaliar o hipersincronismo entre redes neurais e as alterações de processamento cerebral que ocorrem em modelo animal de epilepsia do lobo temporal, utilizando ácido kaínico (KA) intrahipocampal. Foi demonstrado que há aumento do sincronismo entre as áreas estudadas (hipocampo, amígdala e colículo inferior) de forma progressiva no processo de epileptogênese, principalmente ipsilateral à injeção de KA em CA3 direito, além de alteração do processamento auditivo cerebral e da modulação de cima para baixo. Essas alterações mostram que mesmo lesões mais rostrais como a realizada no hipocampo são capazes de alterar o processamento sensorial primário do cérebro de estruturas mais caudais como o colículo inferior. Dessa forma, a ASSR mostrou que na TLE os animais apresentam um comprometimento do processamento cerebral de estruturas não diretamente envolvidas neste tipo de epilepsia. As alterações do processamento cerebral mostradas no presente trabalho são mais profundas do que anteriormente mostradas na literatura e poderiam ser responsáveis pelas comorbidades encontradas em pacientes epiléticos como, por exemplo, os distúrbios psiquiátricos que são mais frequentes nesta população. O hipersincronismo entre redes neurais encontrado neste trabalho e em outros trabalhos com diferentes tipos de epilepsia permite inferir que, caso o hipersincronismo seja uma propriedade geral das epilepsias, pode ser utilizado como um novo alvo terapêutico, e a ASSR como possível ferramenta de auxílio diagnóstico. Além disso, este trabalho mostrou que a ASSR tem potencial de auxiliar no diagnóstico da lateralidade da crise por apresentar diferentes respostas, dependendo do hemisfério inicialmente acometido.

Assim, novos estudos são necessários para avaliar o hipersincronismo em outros tipos de epilepsia além da replicação dos resultados em pacientes com TLE.

Palavras-chave: Epilepsia, Crises focais, Resposta evocada em regime permanente, Epilepsia de lobo temporal, hipersincronismo.

Abstract

Two thirds of patients with temporal lobe epilepsy (TLE) do not respond adequately to anticonvulsants and in the past thirty years there has been little progress in pharmacological treatment, so a new approach is needed in the epilepsies study. Currently, epilepsy is understood as an imbalance between excitation and inhibition and recently the hyper synchronism between neural networks in the presence or not of this imbalance has been shown to be a new way of understanding the reasons that predispose the brain to epilepsy development. In this work, the auditory steady-state-evoked response (ASSR) was used to assess the hyper-synchronism between neural networks and the changes in brain processing that occur in an animal model of temporal lobe epilepsy with intrahypocampal kainic acid (KA) injection. It has been demonstrated that there is an increase in the synchronism between the studied areas (hippocampus, amygdala and inferior colliculus) progressively in the process of epileptogenesis, mainly ipsilateral to the injection of KA in right CA3, in addition to impairment of the brain auditory processing and of top-down modulation. These changes show that even more rostral lesions such as the one performed in the hippocampus are capable of changing the brain's primary sensory processing of more caudal structures such as the inferior colliculus. Thus, ASSR showed that animals in TLE have impaired brain processing of structures not directly involved in this type of epilepsy. The changes in brain processing shown in the present study are more profound than previously shown in the literature and could be responsible for the comorbidities found in epileptic patients, such as the psychiatric disorders that are more frequent in this population. The hyper synchronism between neural networks found in this work and in other works with different types of epilepsy allows us to infer that hyper synchronism may be a general property of epilepsies and so it may be used as a new therapeutic target, and ASSR as a possible diagnostic aid tool. In addition, this study showed that ASSR has the potential to help diagnose the laterality of the crisis by presenting different responses, depending on the hemisphere initially affected. Thus, further studies are needed to assess hyper-synchronism in other types of epilepsy in addition to the replication of results in patients with TLE.

Keyword: Epilepsy, Focal seizures, Steady-state evoked response, Temporal lobe epilepsy, hypersynchronism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pós-operatório imediato

Figura 2: Desenho Experimental

Figura 3: Resposta evocada ao longo do protocolo de estimulação acústica em um animal do grupo salina.

Figura 4: Registro do LFP durante uma das crises convulsivas ao longo do tempo após injeção de KA no primeiro dia de registro.

Figura 5: LFP e energia total da crise convulsiva em CA3 direito ao longo do tempo após injeção de KA no primeiro dia de registro.

Figura 6: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo no colículo inferior direito.

Figura 7: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo no colículo inferior esquerdo.

Figura 8: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo em CA3 direito

Figura 9: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo em CA3 esquerdo.

Figura 10: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo na amígdala direita.

Figura 11: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo na amígdala esquerda.

Figura 12: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo salina antes da injeção sem estímulo sonoro e com esse estímulo no primeiro dia de registro.

Figura 13: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo salina após a injeção sem estímulo sonoro e com esse estímulo no primeiro dia de registro.

Figura 14: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo KA antes da injeção sem estímulo sonoro e com esse estímulo no primeiro dia de registro.

Figura 15: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo KA após a injeção sem estímulo sonoro e com esse estímulo no primeiro dia de registro.

Figura 16: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo KA com e sem estímulo sonoro no segundo dia de registro.

Figura 17: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo salina com e sem estímulo sonoro no segundo dia de registro.

Figura 18: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo KA com e sem estímulo sonoro no terceiro dia de registro.

Figura 19: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo salina com e sem estímulo sonoro no terceiro dia de registro.

Figura 20: Coerência entre o som e o colículo inferior esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 21: Coerência entre colículos inferiores direito e esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 22: Coerência entre colículo inferior esquerdo e CA3 esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 23: Coerência entre colículo inferior esquerdo e CA3 direito em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 24: Coerência entre colículo inferior esquerdo e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 25: Coerência entre colículo inferior esquerdo e amígdala direita em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 26: Coerência entre colículo inferior direito e o som em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 27: Coerência entre colículo inferior direito e CA3 esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 28: Coerência entre colículo inferior direito e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 29: Coerência entre colículo inferior direito e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 30: Coerência entre colículo inferior direito e amígdala direita em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 31: Coerência entre CA3 direito e esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 32: Coerência entre CA3 esquerdo e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 33: Coerência entre CA3 esquerdo e amígdala direita em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 34: Coerência entre CA3 direito e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 35: Coerência entre CA3 direito e amígdala direita em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura 36: Coerência entre amígdalas direita e esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia.

Figura S1: Aprovação do protocolo CEUA nº175/2018

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escala de Racine

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASSR	Resposta auditiva evocada em regime permanente
CA	Corno de Ammon
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CS	Estímulo condicionado
CFC	Acoplamento entre frequências
EEG	Eletroencefalograma
IC	Colículo inferior
ILAE	International League Against Epilepsy
LFP	Potencial de campo local
KA	Ácido Caínico
MTLE	Epilepsia de Lobo Temporal Mesial
SSR	Resposta evocada em regime permanente
TLE	Epilepsia de Lobo Temporal
US	Estímulo não condicionado
WAR	Ratos Wistar audiogênicos

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1 Classificação das Epilepsias	13
1.2 Epilepsia de Lobo Temporal	14
1.3 Anatomia Patológica da epilepsia de lobo temporal	16
1.4 Ictogênese e epileptogênese na epilepsia de lobo temporal	19
1.5 Processamento Dinâmico das Redes neurais	21
1.6 Potencial evocado e Potencial Evocado em regime permanente	23
1.7 Modelos animais de epilepsia	27
2. Justificativa do Estudo	29
3. Objetivos	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4. Materiais e Métodos	30
4.1 Sujeitos Experimentais	30
4.2 Cirurgia	31
4.3 Protocolo Experimental	32
4.4 Injeção de Ácido Kaínico	33
4.5 Estímulos Auditivos	34
4.6 Análise Histológica	34
4.7 Critérios de inclusão/exclusão	35
4.8 Análise do Sinal	35
4.9 Análise Estatística	36
5. Resultados	37
5.1 Potencial Evocado	37
5.2 Status Epilepticus	38
5.3 Análise de Energia da ASSR	40
5.4 Análise Qualitativa da Coerência da ASSR	46
5.5 Análise Quantitativa da Coerência da ASSR	54
6. Discussão	73
7. Conclusões	76
8. Referências Bibliográficas	77
9. Materiais Suplementares	85

1. INTRODUÇÃO

Convulsão epiléptica é a ocorrência de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormalmente excessiva e/ou sincronizada no cérebro (FISHER *et al.*, 2005). As convulsões podem ser não epiléticas quando ocorrem devido a tratamentos como eletrochoque e agentes químicos ou epiléticas quando ocorrem sem provocação aparente (MCNAMARA, 1994).

As epilepsias se diferenciam das convulsões por serem uma doença do cérebro definidas por qualquer das seguintes condições: 1. Pelo menos duas convulsões não provocadas (ou reflexas), ocorrendo com mais de 24 horas entre elas; 2. Uma convulsão não provocada (ou reflexa) com probabilidade de recorrência nos próximos 10 anos similar ao risco geral de recorrência (de pelo menos 60%) apresentado após duas crises epiléticas não provocadas; 3. Diagnóstico de síndrome epilética (FISHER *et al.*, 2014). A crise reflexa pode ser entendida como convulsão precipitada pelo estímulo sensorial (ENGEL, JEROME, 2001).

As epilepsias são doenças dinâmicas já que a manifestação epilética é caracterizada pela repentina ocorrência de aumento da sincronia entre grandes redes de neurônios. Esse aumento de sincronia pode se propagar para outras regiões do cérebro o que pode comprometer catastróficamente seu funcionamento normal. Esse evento pode ser desencadeado por mudanças endógenas na rede de neurônios bem como em suas entradas e demais processos moduladores (SILVA, FERNANDO H. LOPES DA; DA SILVA, 2009).

No estudo das epilepsias é importante fazer a distinção entre epileptogênese e ictogênese. A ictogênese é o processo dinâmico que gradualmente muda de um estado fisiológico e controlado, para outro estado patológico de disparo exacerbado e síncrono de populações de neurônios no sistema nervoso central. Esta evolução/dinâmica pode ocorrer de forma desordenada, rítmica e sincronizada com a possibilidade de haver recrutamento de grandes populações neurais, podendo se manifestar na forma de convulsão (MEDEIROS; MORAES, 2014; RICHARDSON, 2011).

Na ictogênese, acredita-se que se uma frequência oscilatória dominante é imposta a uma rede neural propensa a desenvolver epilepsia. O acoplamento anormal entre redes neurais neste caso seria responsável pela expansão da

população neuronal recrutada, implicando em uma crescente distribuição de atividade sincronizada (KHAMBHATI *et al.*, 2015; KORZENIEWSKA *et al.*, 2014; KRAMER *et al.*, 2012). A interação entre circuitos sincronizados e dessincronizados seria uma competição entre zonas de início da convulsão e tecido circundante. A competição, ao tender para o lado da sincronização, resultaria no recrutamento anormal de populações neurais que estariam acopladas a uma frequência osciladora dominante central. Após o início da convulsão, haveria uma sincronização progressiva enquanto a convulsão se propaga levando a um acoplamento geral das redes neurais (KHAMBHATI *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2017).

A epileptogênese pode ser definida como as alterações plásticas que predisõem o cérebro a apresentar esse padrão anormal de disparo das populações neuronais (ARONIADOU-ANDERJASKA *et al.*, 2008). Essas alterações plásticas podem prejudicar a atividade fisiológica das redes neurais mesmo no período interictal e gerar diferentes manifestações clínicas e doenças neurológicas comórbidas. Dessa forma, a epilepsia pode ser considerada uma síndrome e é classificada de acordo com o conjunto de sinais e sintomas (ENGEL, JEROME, 2001).

1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS

A classificação das crises inicia com a determinação se as manifestações iniciais são focais ou generalizadas. As crises focais são originadas em circuitos limitados a um hemisfério, podendo ocorrer em estruturas corticais ou subcorticais. Já as crises generalizadas são definidas como originadas em algum local de uma rede neuronal com rápido envolvimento de redes distribuídas em ambos os hemisférios. Apesar desta classificação, crises focais podem rapidamente envolver circuitos bilaterais e às vezes a distinção entre início focal e generalizado exige estudo cuidadoso do vídeo-EEG (FISHER *et al.*, 2017). As crises focais podem ser classificadas em perceptivas e disperceptivas. As crises focais perceptivas ocorrem sem o comprometimento da consciência que ocorre nas disperceptivas. Além das classificações já citadas, as crises ainda podem ser classificadas em início desconhecido se o início não for observado ou for obscuro. A categorização como

não classificada deve ser feita somente em situações excepcionais em que o clínico está seguro que o evento é uma crise, porém não consegue evoluir na classificação do evento. Devido a dificuldades na classificação das crises, um clínico pode dispor de exames complementares como vídeos, padrões eletroencefalográficos e neuroimagem para auxílio. (FISHER *et al.*, 2017).

As epilepsias podem também ser classificadas em síndromes clínicas específicas dependendo da suposta localização do foco epiléptico. Essas síndromes podem variar em padrão, tipo e frequência de crises. Um dos tipos de interesse é a epilepsia de lobo temporal (TLE) que compreende a maioria dos pacientes com epilepsia refratária ao uso de medicamentos e, portanto, muitas vezes exigem um tratamento cirúrgico (FRENCH *et al.*, 1993).

1.2 EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

A epilepsia de lobo temporal é um dos tipos comuns de epilepsia focal em adultos (FRENCH *et al.*, 1993). As crises na TLE são geradas predominantemente nas estruturas temporais límbicas e os tipos de crise incluem auras de sensações não usuais como medo, déjà vu, odores peculiares, sensação abdominal, olhar estático, automatismos da boca e extremidades, confusão pós-ictal e algumas vezes apresentam alterações da consciência (ENGEL, JEROME, 1996; FRENCH *et al.*, 1993). A TLE é uma das formas de epilepsia com maior número de pacientes apresentando resistência ao tratamento medicamentoso. A resistência medicamentosa pode chegar a até 80% dos pacientes com esse tipo de epilepsia enquanto em pacientes com epilepsia em geral esse número é de aproximadamente 25% ([Semah et al. 1998](#); [Sander 1993](#)). A TLE pode ser subdividida em epilepsia de lobo temporal mesial (MTLE) dentre outros tipos que é caracterizada pela geração de crises na parte mesial deste lobo (FALCONER; SERAFETINIDES; CORSELLIS, 1964).

As crises convulsivas na MTLE geralmente iniciam na infância e adolescência e, uma vez iniciadas, frequentemente respondem a drogas antiepilépticas, podendo entrar em remissão por muitos anos. Apesar disso, após esse período silencioso, as crises recorrem e podem se tornar resistentes a drogas (ENGEL, JEROME, 1996;

FRENCH *et al.*, 1993). Desta forma, é assumido que a epileptogênese é mantida e progride mesmo durante esse período de aparente controle clínico da doença (ONO; GALANOPOULOU, 2012). Dentre as estruturas do lobo temporal acometidas na MTLE, notavelmente a amígdala, o hipocampo e o córtex piriforme são as mais susceptíveis a ictogênese e epileptogênese e seus acometimentos podem ser os responsáveis por algumas das manifestações clínicas deste tipo de epilepsia (GIOVAGNOLI; AVANZINI, 1999). A amígdala está associada a reatividade emocional, aprendizado no condicionamento ao medo, reconhecimento de emoções, compreensão de expressões faciais (GALLAGHER; CHIBA, 1996; YOUNG *et al.*, 1995). O hipocampo está associado à memória declarativa incluindo memória episódica e de reconhecimento (MILNER, 1972; SCOVILLE; MILNER, 2000). Dentre as manifestações clínicas da TLE, pode-se citar comprometimento da performance cognitiva, do aprendizado e das memórias verbal, autobiográfica e de longo prazo (GIOVAGNOLI; AVANZINI, 1999). A frequência de convulsões e o tempo prolongado de duração da TLE apresenta um impacto negativo na cognição, sendo a memória o principal domínio cognitivo prejudicado (JOKEIT; EBNER, 1999). Dois terços dos pacientes com MTLE apresentam queixas de prejuízo da memória autobiográfica transiente de duração geralmente menor que uma hora que ocorrem associadas a convulsões. Nestes casos, estudos clínicos, eletrofisiológicos e de neuroimagem sugerem que o foco da crise origina-se no lobo temporal medial, particularmente na formação hipocampal (MOSBAH *et al.*, 2014).

Diversos testes cognitivos têm sido utilizados para avaliar o prejuízo da memória em pacientes com TLE. Há, por exemplo, o teste de nomeação visual de objetos que apresenta uma conhecida relação entre baixa performance neste teste e TLE intratável (MAYEUX *et al.*, 1980). Apesar desta relação, o teste de nomeação auditiva, em que os participantes nomeiam objetos a partir da sua definição verbal, apresentou-se mais sensível que o teste de nomeação visual de objetos em prever perdas cognitivas associadas a memória em pacientes com TLE (BELL *et al.*, 2003; HAMBERGER; TAMNY, 1999).

A MTLE pode ser subclassificada histopatologicamente em epilepsia de lobo temporal paradoxal ou esclerose hipocampal dentre outros subtipos (FALCONER; SERAFETINIDES; CORSELLIS, 1964; ZAVERI *et al.*, 2001). A primeira apresenta

uma perda uniforme em torno de 25% dos neurônios principais em todo hipocampo e de células granulosas do giro denteado além de responder pior à ressecção cirúrgica. Já a segunda possui esclerose hipocampal com perda maior de neurônios, gliose, atrofia, reorganização do giro denteado com brotamento de fibras nervosas anormais (DU *et al.*, 1993; ZAVERI *et al.*, 2001). O padrão de perda neuronal na esclerose hipocampal ocorre geralmente no hilo do giro denteado e em CA1 (DU *et al.*, 1993). O desenvolvimento da esclerose hipocampal e do comprometimento cognitivo em pacientes crônicos com MTLE tem correlação com a duração da epilepsia, implicando num processo progressivo e neurodegenerativo nos pacientes com essa condição e, portanto, mostrando que a esclerose hipocampal não é alteração histológica obrigatória para a ocorrência de MTLE (DU *et al.*, 1993; ONO; GALANOPOULOU, 2012). Uma vez que as estruturas envolvidas na MTLE apresentam uma relação com as manifestações clínicas da doença, faz-se necessário uma descrição anatômica e funcional.

1.3 ANATOMIA PATOLÓGICA DA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

A formação hipocampal é composta pelo hipocampo e pelo subiculum. No roedor o hipocampo é achatado e alongado situando-se entre a parte mesial (medial) do lobo temporal e o tálamo abaixo e numerosas fibras o conectam com outras estruturas límbicas como amígdala, córtex entorrinal e subiculum.(SHARMA *et al.*, 2007; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009). A região parahipocampal situa-se adjacente ao subiculum da formação hipocampal e é dividida em cinco subregiões: o presubiculum, o parasubiculum, o córtex entorrinal, o córtex perirrinal e o córtex posrrinal (VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009).

O hipocampo é composto por duas partes entrepostas em forma de “C” chamadas corno de Ammon (CA) e é composto principalmente por células piramidais. Já no giro denteado destaca-se as células granulosas. O corno de ammon é subdividido em três subespaços numerados de CA1 a CA3. CA1 se estende do subiculum dorso medial até uma banda mais grossa, CA2. CA3 compreende a porção ventro-medial do hipocampo e sua porção terminal que se

projeta para o hilo denteado é algumas vezes referida como CA4 (SHARMA *et al.*, 2007).

O córtex da formação hipocampal é constituído de três camadas. A primeira camada, que é mais profunda, é composta de uma mistura de fibras aferentes e eferentes, além de interneurônios. No giro denteado, essa camada é chamada de hilo e possui neurônios musgosos glutamatérgicos (SHARMA *et al.*, 2007; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009). Já nas regiões de CA1 a CA3 a primeira camada é denominada stratum oriens. Superficial a essa camada encontra-se a camada de células que é composta de células principais e interneurônios (VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009). No giro denteado essa camada é conhecida como camada granulosa e possui uma população de neurônios GABAérgicos chamada de células em cesto entremeada nas células granulosas deste local (SHARMA *et al.*, 2007; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009). Já nas regiões de CA e no subiculum denomina-se de camada de células piramidais (stratum pyramidale). A camada mais superficial é denominada camada molecular (stratum moleculare) no giro denteado e subiculum. Nas regiões de CA, a camada molecular é dividida em várias subcamadas. Em CA3 três subcamadas podem ser distinguidas: a stratum lucidum que apresenta aferências do giro denteado; stratum radiatum que compreende os dendritos apicais dos neurônios localizados na stratum pyramidale e mais superficialmente stratum lacunosum-moleculare que compreende os tufos apicais dos dendritos apicais. As camadas em CA1 e CA2 são semelhantes exceto pela ausência da stratum lucidum (VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009).

O hipocampo forma uma rede unidirecional com axônios vindo do córtex entorrinal que forma conexões com o giro denteado e com as células piramidais de CA3 pela via perfurante (SHARMA *et al.*, 2007). Os neurônios de CA3 recebem axônios das células granulosas do giro denteado via fibras musgosas e enviam axônios para CA1 ipsilateral via colaterais de Schaffer e para CA1 contralateral via comissura associativa (LAURBERG; SØRENSEN, 1981). CA1 recebe axônios diretamente da via perfurante e envia projeções para o subiculum, porém a principal saída do hipocampo provém de CA1 com destino ao córtex entorrinal, formando um ciclo (SHARMA *et al.*, 2007). A projeção excitatória vinda do córtex entorrinal pela

via perforante é capaz de iniciar uma ativação sequencial excitatória das células granulosas do giro denteado que por sua vez excita as células piramidais de CA3 via projeções das fibras musgosas. As células piramidais de CA3, por fim, excitam as células piramidais de CA1 via colaterais de Schaffer. Esse circuito é fundamental para a fisiologia da região e é conhecido como circuito tri-sináptico hipocampal (BASU; SIEGELBAUM, 2015; YECKEL; BERGER, 1990).

Essa anatomia funcional do hipocampo é importante para sua função de formação e consolidação da memória. Em estudo com cérebros de pacientes com amnésia, a região temporal medial geralmente estava danificada principalmente no hipocampo e, em modelos animais, a lesão bilateral da amígdala e da formação hipocampal levou a importante prejuízo da memória de reconhecimento de objeto (SQUIRE, 1986). Como já dito, pacientes com TLE apresentam prejuízo na memória auditiva que pode ser testada por meio do teste de nomeação auditiva. Desta forma se faz necessária a descrição do atual entendimento da formação da memória auditiva e das estruturas envolvidas neste processo.

Estudos utilizando memória em modelos animais frequentemente usam experiências emocionais em que um estímulo condicionado (CS) como, por exemplo, um som, luz ou odor é associado a um estímulo não condicionado (US). O estímulo não condicionado pode ser do tipo aversivo como um choque na pata, som alto ou jato de ar ou um reforço positivo como comida, bebida ou drogas de abuso. Em ambos os tipos de US há um pareamento entre CS e o US em que o CS recebe as qualidades afetivas do US. Assim, posteriormente ao pareamento, a presença do CS evoca uma resposta emocional condicionada na ausência do US (WINDHOLZ, 1986). Acredita-se que a memória formada neste tipo de experimento seja codificada pelo menos em parte no córtex sensitivo. Lesões no córtex auditivo de animais não preveniram a formação de memórias auditivas associadas ao medo nem a sua retenção mesmo quando a lesão foi feita logo após o treino (CAMPEAU; DAVIS, 1995; ROMANSKI; LEDOUX, 1992). Apesar desses achados, o córtex auditivo é responsável pelo aumento da habilidade de discriminar as frequências de estímulos auditórios simples como tons associados ao condicionamento ao medo em camundongos (AIZENBERG; GEFFEN, 2013). A amígdala é um componente crítico no circuito neural do condicionamento ao medo (DAVIS, 2000). Por outro lado, o

hipocampo participa da formação de outros tipos de memória, como a episódica e a espacial (AGGLETON; BROWN, 1999).

Duas projeções sensoriais são associadas a memória auditiva condicionada ao medo, projeções tálamo-córtico-amígdala e tálamo-amígdala, porém sugere-se que a primeira seja a via principal para o aprendizado do condicionamento ao medo auditivo (BOATMAN; KIM, 2006; LEDOUX, 2000). Por outro lado, projeções da amígdala para o córtex auditivo também têm papel relevante na consolidação da memória. A estimulação elétrica da amígdala de ratos pareada à apresentação de um tom sonoro aumenta a resposta neuronal à frequência do tom pareado. Essa resposta aumenta ao longo do tempo e dura vários dias. Assim, a amígdala seria responsável por fortalecer traços de memória emocional auditiva no córtex auditivo (CHAVEZ; MCGAUGH; WEINBERGER, 2009, 2013). A anatomofisiologia permite o melhor entendimento da ictogênese e epileptogênese na TLE além das teorias existentes que procuram as explicar.

1.4 ICTOGÊNESE E EPILEPTOGÊNESE NA EPILEPSIA DE LOBO TEMPORAL

A epileptogênese e a ictogênese na MTLE possuem diversas teorias. Uma das teorias seria o aumento da excitabilidade nos circuitos límbicos por meio do brotamento aberrante das fibras musgosas. Esta teoria se baseia no achado que pacientes com MTLE geralmente apresentam um rearranjo da rede neural límbica com novos brotamentos e formação de colaterais aberrantes das fibras musgosas da camada granular para a molecular do giro denteado. Esse brotamento seria responsável por uma excitação monossináptica recorrente que poderia provocar crises (BABB *et al.*, 1991; NADLER, J. V.; PERRY; COTMAN, 1980). Por outro lado, ratos que receberam injeção de pilocarpina em um modelo animal de TLE associado a restrição dietética proteica e calórica apresentaram inibição da formação de colaterais aberrantes das fibras musgosas e mesmo assim mantiveram a mesma latência para recorrência de crise convulsiva, o mesmo número de crises convulsivas no período estudado e o mesmo padrão de descarga eletrográfica no eletroencefalograma (REZENDE *et al.*, 2015). As mesmas alterações estruturais encontradas em humanos com MTLE foram reproduzidas após a injeção

intraventricular em ratos de ácido kaínico (KA), um agonista glutamatérgico, que provocou a perda de células piramidais em CA3 e CA4 e o rearranjo das fibras musgosas (NADLER, J. V.; PERRY; COTMAN, 1980).

Uma hipótese para o rearranjo das redes neurais na MTLE em humanos seria que pacientes com esse tipo de epilepsia passariam por um insulto no início da vida que seria responsável ao longo do tempo pela mudança nos circuitos neurais, tendendo a hiperexcitabilidade e adquirindo a capacidade de gerar convulsões. Assim, o insulto como, por exemplo, uma convulsão febril, não seria responsável imediatamente pela ocorrência de convulsões, mas seria o gatilho para, após um período de latência variado, haverem crises convulsivas (FRENCH *et al.*, 1993).

Apesar do aumento da excitabilidade da rede após um insulto inicial ser potencialmente epileptogênica (BABB *et al.*, 1991), há evidências de que circuitos locais inibitórios atuam para evitar a ocorrência de crises em ratos (CRONIN *et al.*, 1992). Por outro lado, a redução da inibição mediada pelo receptor GABA-A dos circuitos locais em animais leva a ocorrência espontânea e sincronizada de atividade epileptiforme (CRONIN *et al.*, 1992).

Outra teoria seria a das células em cesto dormentes que se baseia na perda das células musgosas hilares durante a epileptogênese. No hipocampo normalmente as células musgosas hilares induzem inibição por meio da estimulação das células em cesto que por sua vez inibem as células granulosas. A perda das células musgosas hilares causaria dormência nas células em cesto e perda da inibição das células granulosas do giro denteado, facilitando a ocorrência de crises (SLOVITER, 1991, 1994).

Além das já descritas teorias que tentam explicar a epileptogênese e a ictogênese baseadas no aumento da excitabilidade de redes neurais e/ou diminuição da inibição destas, recentemente um novo interesse tem ocorrido no sincronismo entre populações neuronais. Pacientes com TLE apresentam com frequência disparos interictais em microrregiões cerebrais (MATSUMOTO; MARSAN, 1964; SCHEVON *et al.*, 2008). O real papel dos disparos interictais na ocorrência de crises é controverso com alguns trabalhos mostrando que teriam a capacidade de engatilhar uma crise (CHAMBERLIN; DINGLEDINE, 1988). Neste caso, os disparos interictais seriam responsáveis pela expansão rápida da área de recrutamento,

trazendo o sistema de um estado inicialmente dessincronizado para um hipersincronismo entre redes de forma progressiva no período ictal (BRAGIN, A.; WILSON; ENGEL, 2000; JIRUSKA *et al.*, 2010). Por outro lado, outro trabalho mostrou que os disparos interictais seriam gerados em local distinto do foco epiléptico e que poderiam suprimir os eventos ictais através da dessincronização da rede neural (DE CURTIS; AVANZINI, 2001). A ocorrência repetitiva de convulsões é responsável por fortalecer e expandir a sincronização entre regiões de crescentes distâncias sugerindo um papel importante da conectividade anormal entre áreas no processo de ictogênese (SCHEVON *et al.*, 2008; STEAD *et al.*, 2010).

Postula-se que os circuitos neurais já alterados na epilepsia facilitariam a ocorrência de convulsões e que a anatomia funcional do circuito poderia ser dividida de forma didática em quatro componentes principais: um foco epiléptico, o circuito de iniciação, os caminhos de espalhamento ou recrutamento e os centros modulatórios (BERTRAM, 2013; NADLER, J. VICTOR; SPENCER, 2014; ROSENOW; LÜDERS, 2001). O foco epiléptico seria onde o processo de ictogênese se inicia e não necessariamente corresponderia sempre ao mesmo local em todas as crises. Os circuitos de iniciação são as regiões interconectadas ao foco necessárias para manter a atividade elétrica anômala e convertê-la em convulsão. Se a convulsão se espalha além dos circuitos de iniciação, há o recrutamento de novas regiões por meio de caminhos específicos. A região moduladora é qualquer região fora do circuito de iniciação ou das regiões de espalhamento que influenciam no limiar convulsivo (BERTRAM, 2013). As convulsões podem ser estudadas por meio da análise do campo elétrico gerado por uma diferença de potencial entre duas áreas do cérebro (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012).

1.5 PROCESSAMENTO DINÂMICO DAS REDES NEURAIS

Os campos eletromagnéticos extracelulares são formados pela superposição de processos iônicos transmembrana como as correntes que atravessam a membrana plasmática e recebem contribuições de todas as membranas excitáveis, seja dendritos, espinhas dendríticas, corpo celular, axônio ou terminal axônico (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012). Os campos eletromagnéticos podem ser

monitorados por eletrodos extracelulares com resolução temporal menor que milissegundos. Quando esses eletrodos se encontram no escalpo, refere-se como eletroencefalograma (EEG) e quando eles se encontram no cérebro, chama-se de potencial de campo local (LFP) (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012). No cérebro, esses campos sofrem oscilações ao longo do tempo gerando ritmos de diferentes frequências que foram denominados inicialmente como delta (1,5-4Hz), teta (4-10Hz), beta (10-30 Hz) e gama (30-80Hz) com posterior realização de subdivisões (BUZSÁKI, 2006). Apesar dessa denominação, o exato mecanismo da maioria das oscilações não é conhecido e sua denominação foi feita de forma arbitrária para facilitar o seu estudo. Acredita-se que cada ciclo oscilatório é uma janela de processamento temporal cerebral, sinalizando o começo e o término de uma mensagem. Dessa forma, o cérebro teria um processamento simultâneo e descontínuo de várias informações codificadas em diferentes frequências na forma de pacotes temporais (BUZSÁKI, 2006; ECKHORN *et al.*, 1988; KÖNIG; ENGEL, 1995; NELSON *et al.*, 1992). De forma geral, altas frequências seriam responsáveis por processar informações locais e menores frequências seriam usadas para interação entre áreas mais afastadas espacialmente (SILVA, FERNANDO LOPES DA *et al.*, 2003).

Apesar dos diferentes ritmos existentes, duas frequências podem interagir entre si no processamento de informações e essa interação pode ser analisada por diversas métricas como, por exemplo, por meio dos diferentes tipos de acoplamento entre frequências (CFC) e da coerência (HYAFIL *et al.*, 2015). A coerência indica interdependência entre sinais, porém não separa os efeitos de amplitude e fase, além de assumir que os sinais são estacionários. Já o método CFC fase-fase assume que os sinais são dinâmicos e analisa somente as fases. Esse método procura pela latência em que a diferença entre fases é menor entre os dois sinais (LACHAUX *et al.*, 1999). Esse tipo de acoplamento fase-fase tem sido relacionado a mecanismos fisiológicos que ocorrem em velocidades diferentes. Por exemplo, um estudo mostrou que o padrão de disparo neuronal observado durante o aprendizado de uma tarefa se repete no sono não REM, mas em uma velocidade seis a sete vezes maior (EUSTON; TATSUNO; MCNAUGHTON, 2007). O método CFC fase-amplitude descreve a dependência estatística entre a fase, por exemplo, de

uma frequência baixa e a amplitude de uma frequência alta na atividade cerebral. Acredita-se que essa relação seria importante para o funcionamento do cérebro, já que ritmos cerebrais de baixa frequência estão frequentemente acoplados a eventos sensórios e motores externos, assim como processos cognitivos internos associados a tomada de decisões, motivação e memória (SCHROEDER; LAKATOS, 2009). No CFC amplitude-amplitude acredita-se haver uma correlação com comportamento e memória (SHIRVALKAR; RAPP; SHAPIRO, 2010).

O processamento fisiológico de informações pelo cérebro descrito acima pode sofrer alterações importantes não adaptativas nos estados patológicos como, por exemplo, nas crises convulsivas. Neste caso, as crises seriam responsáveis por recrutar áreas cerebrais outra hora funcionais, forçando um sincronismo anormal entre populações neuronais. Esse acoplamento anormal, mesmo em pequena escala, pode prejudicar o processamento normal cerebral e levar às manifestações clínicas encontradas na epilepsia (SHIRVALKAR; RAPP; SHAPIRO, 2010; SILVA, FERNANDO LOPES DA *et al.*, 2003). Em linha com essa teoria de alteração do processamento normal cerebral nas crises convulsivas, estudos têm empregado os potenciais evocados, os potenciais evocados em regime permanente e os potenciais relacionados a eventos (ABUBAKR; WAMBACQ, 2003; SIMÕES *et al.*, 2020).

1.6 POTENCIAL EVOCADO E POTENCIAL EVOCADO EM REGIME PERMANENTE

Potencial evocado é uma resposta cerebral de natureza elétrica direta à algum estímulo externo como luz ou som, já o potencial relacionado a evento depende do estímulo externo e adicionalmente do estado de processamento cerebral. Em um estudo, pacientes com TLE refratária receberam estimulação sonora nos períodos pré-ictal, pos-ictal e interictal e apresentaram alteração do potencial relacionado ao evento somente no período pós-ictal imediato (ABUBAKR; WAMBACQ, 2003). Esse resultado difere do encontrado com potenciais evocados em regime permanente auditivos, pois os potenciais evocados transientes possuem a desvantagem de não avaliarem apropriadamente as modulações das oscilações de baixo para cima (do inglês, bottom-up) e de cima para baixo (do inglês, top-down) (PINTO *et al.*, 2017; REGAN, 1989).

Essas duas formas de modulação no processamento de informações, de cima para baixo e de baixo para cima são bastante usadas como forma de abordagem de problemas em neurociências. De maneira geral, o modo de cima para baixo representa a influência do processamento cerebral de alto nível nos níveis mais simples antecedentes, modulando sua resposta por meio de projeções neurais. Um exemplo desse tipo de influência seria o efeito da atenção modulando circuitos locais de processamento visual (GILBERT; SIGMAN, 2007). Por outro lado, a abordagem de baixo para cima seria a análise e envio de informações de níveis mais simples de processamento para locais de processamento de maior complexidade. Como exemplo, pode-se citar os neurônios da retina que enviam projeções para o córtex visual com o intuito de processamento visual neste local (ENGEL, A. K.; FRIES; SINGER, 2001; GILBERT; SIGMAN, 2007). Outro exemplo é a organização da via auditiva, em que as informações provenientes da cóclea são desmembradas baseadas nas características do sinal e enviadas para o colículo inferior para processamento (MERZENICH; REID, 1974).

A resposta evocada em regime permanente (SSR) é a resposta eletrográfica de um potencial evocado cuja frequência específica constituinte possui fase e amplitude constantes por um período infinitamente longo e dura um período de tempo maior que um único ciclo de estímulo externo. Além disso, os estímulos na SSR possuem uma frequência de ocorrência suficientemente rápida para que a resposta transiente a um estímulo externo se sobreponha à dos estímulos subsequentes, recebendo a denominação de resposta evocada em regime permanente. Essa propriedade da SSR produz uma resposta evocada previsível no cérebro diante do estímulo externo e, por isso, variações dessa resposta podem ser usadas para análises de cima para baixo, enquanto a SSR também permite análises de baixo para cima de forma independente (PICTON *et al.*, 2003). Essa possibilidade de análise de forma independente de projeções de cima para baixo e de baixo para cima aliada à SSR possuir uma assinatura eletrográfica previsível permitem testar a hipótese de acoplamento anormal em um cérebro portador de epilepsia (PINTO *et al.*, 2017). Na resposta auditiva evocada em regime permanente (ASSR), o estímulo sonoro é modulado em amplitude com a frequência moduladora ditando a fase e a

frequência de disparo neuronal e a frequência portadora determinando o local de estimulação da membrana basilar (PICTON *et al.*, 2003).

Outra vantagem do uso da SSR no estudo do cérebro portador de epilepsia é que a abordagem tradicional, registrando passivamente o eletroencefalograma, em geral, não é capaz de avaliar com acurácia a suscetibilidade a convulsões (SUFFCZYNSKI *et al.*, 2008). A SSR, por outro lado, faz uma sondagem ativa de redes neurais o que permite a monitorização contínua do processamento sensorial e a avaliar mudanças no balanço excitação e inibição que ocorre minutos antes de uma convulsão em locais como, por exemplo, o hipocampo (SILVA, FERNANDO LOPES DA *et al.*, 2003; SUFFCZYNSKI *et al.*, 2008).

No estudo da ASSR, faz-se necessário a descrição da via auditiva para melhor entendimento do processamento sonoro. As vias auditivas começam com a transformação do estímulo acústico em disparo neural na cóclea (WINER; SCHREINER, 2005) em local específico da membrana basilar determinado pela frequência portadora da ASSR. Já a frequência de disparo neural é determinada pela frequência moduladora da ASSR (PICTON *et al.*, 2003). Essa organização tonotópica encontrada na membrana basilar é uma propriedade de diversas estruturas ao longo das vias auditivas como complexo olivar (SANES; RUBEL, 1988), colículo inferior (MERZENICH; REID, 1974), corpo geniculado medial (RODRIGUES-DAGAEFF *et al.*, 1989) e córtex auditivo (ROMANI; WILLIAMSON; KAUFMAN, 1982). O estímulo coclear é levado até uma das primeiras partes do sistema auditivo central, o núcleo coclear na medula, via nervo coclear. Em seguida, o próximo elemento da via é o complexo olivar seguido pelo núcleo do lemnisco lateral que envia projeções para o colículo inferior. O colículo inferior envia projeções para o corpo geniculado medial e por fim, este local envia axônios até o córtex auditivo (KAAS; HACKETT, 2000; WINER; SCHREINER, 2005). Como a memória auditiva está alterada nos pacientes com TLE, a sondagem ativa da via auditiva utilizando ASSR pode ajudar a estudar as alterações dos circuitos neurais envolvidas neste tipo de epilepsia (HAMBERGER; TAMNY, 1999; PINTO *et al.*, 2017).

Com intuito de aplicar a sondagem ativa no estudo da epilepsia, o estudo de Pinto *et al.* (2017) utilizou a ASSR em ratos Wistar (controle) e ratos wistar

audiogênicos (WAR), ou seja, ratos geneticamente selecionados que apresentam convulsões tônico-clônicas generalizadas induzidas por estimulação acústica de 110dB ou mais. Os ratos receberam estimulação sonora em 85dB e 110dB, ambos com frequência carreadora de 10.000 Hz e frequência moduladora de 53,71Hz com o intuito de testar a hipótese de acoplamento anormal no cérebro portador de epilepsia. Neste estudo foi utilizado medições no colículo inferior de energia total, energia das bandas de frequência cerebrais e variância circular. A variância circular é uma medida da dispersão angular ao longo do tempo e pode ser interpretada como uma estimativa do aumento de sincronização de fase entre redes neurais e, conseqüentemente menor sincronização com a ASSR. Como resultado do estudo, ao receberem estimulação sonora a 85dB, os ratos WAR apresentaram uma hiperexcitabilidade com aumento da ASSR em relação ao controle, sem aumento da energia total, da variância circular ou das bandas de frequência cerebrais. Esse resultado e a marcação com c-fos mostraram que, em um modelo geneticamente selecionado de crises reflexas, o cérebro é mais propenso ao acoplamento neural e que há um recrutamento anormal de redes neurais na via auditiva primária mesmo com estimulações sublimiares.

Por outro lado, os ratos WAR ao receberem estimulação sonora a 110dB imediatamente antes de uma convulsão apresentaram uma redução da energia da ASSR e aumento da variância circular e da banda delta. Isso mostra que houve uma dessincronização entre o colículo inferior e o estímulo sonoro externo neste período. Já no período ictal, os ratos WAR tiveram um aumento da energia na ASSR juntamente com as bandas alfa, beta e gama sem alteração estatisticamente significativa da variância circular em relação ao controle.

No período pós-ictal, houve a manutenção do aumento da ASSR até a interrupção da estimulação sonora, além de redução na energia de todas as bandas de frequência, com exceção da banda delta. Além disso, não houve alterações na variância circular neste período. Por fim, o estudo conclui que se o acoplamento anormal for uma propriedade geral das redes neurais epileptogênicas, o uso de um oscilador externo como, por exemplo, a ASSR pode permitir avaliar quão propensas as redes neurais estão ao acoplamento. Isso pode ser usado como ferramenta diagnóstica ou até permitir avaliar mudanças no estado cerebral que levam a

convulsões (PINTO *et al.*, 2017). Assim como o uso dos ratos WAR no estudo de Pinto *et al.* (2017) que apresentam crises convulsivas reflexas, vários modelos animais de epilepsia são utilizados hoje com suas vantagens e desvantagens.

1.7 MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIA

Os modelos animais de epilepsia foram desenvolvidos em uma tentativa de mimetizar, mesmo que parcialmente, a ampla quantidade de causas, sinais e sintomas da epilepsia em humanos (CASTRO *et al.*, 2017). Um desses exemplos é o rato WAR que possui epilepsia audiogênica reflexa, ou seja, apresenta convulsões tônico-clônicas ao ser submetido a estímulos acústicos de alta intensidade (CASTRO *et al.*, 2017).

No estudo da epilepsia temporal mesial, os dois quimioconvulsivantes mais usados são a pilocarpina e o KA (SHARMA *et al.*, 2007). Eles induzem status epilépticus logo após a sua injeção e este é o insulto precipitante que inicia mudanças histopatológicas em regiões temporais e permite a ocorrência de convulsões espontâneas recorrentes semanas depois. Assim, esse modelo permite o estudo tanto da ictogênese quanto da epileptogênese (RAEDT; VAN DYCKE, 2009). Além desta semelhança com a ocorrência de crises em pacientes com MTLE, a injeção desses quimioconvulsivantes leva à esclerose hipocampal e à padrões de atividade eletrofisiológica semelhantes às encontradas em humanos com epilepsia temporal mesial, principalmente com o uso de KA (BEENHAKKER; HUGUENARD, 2009; SHARMA *et al.*, 2007). Em testes comportamentais esses animais apresentaram um prejuízo da memória e do aprendizado assim como já descrito para humanos com MTLE (RATTKA; BRANDT; LÖSCHER, 2013).

O KA é um agonista glutamatérgico dos receptores ionotrópicos não NMDA do tipo AMPA e receptor de ácido kaínico que pode ser injetado sistemicamente ou intracerebral para causar despolarização neuronal sustentada. A vantagem da injeção intracerebral é a menor taxa de mortalidade se comparado aos modelos de injeção sistêmica (SHARMA *et al.*, 2007). Semanas após a injeção intrahipocampal de KA, 83% dos ratos desenvolvem crises convulsivas espontâneas recorrentes, sendo que metade desenvolve essas crises num período de até quatro semanas. (RATTKA; BRANDT; LÖSCHER, 2013). Essas crises variam conforme a gravidade e

podem ser medidas nos modelos animais por meio da escala modificada de Racine (RACINE, 1972), conforme abaixo:

Tabela 1: Escala de Racine

Valor	Comportamento
0	Atitude estacionária com a cabeça estendida
1	Automatismos Faciais
2	Mioclonias da Cabeça
3	Mioclonia unilateral/bilateral das patas anteriores
4	Mioclonia das patas anteriores com sustentação do corpo sobre as patas posteriores (rearing)
5	Mioclonia das patas anteriores com sustentação do corpo sobre as patas posteriores (rearing) seguida por perda de equilíbrio e generalização

No presente estudo, utilizou-se um modelo animal de epilepsia de lobo temporal com injeção intrahipocampal de KA.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A epilepsia de lobo temporal apresenta importante morbidade para o paciente e até 80% não respondem de forma satisfatória aos anticonvulsivantes (SEMAH *et al.*, 1998). Nos últimos trinta anos, apesar do desenvolvimento de novas drogas, somente uma pequena proporção de pacientes resistentes às drogas antigas alcançaram controle com os novos medicamentos (GAZZOLA; BALCER; FRENCH, 2007). Assim, faz-se necessário uma mudança nas formas tradicionais de abordagem no estudo das epilepsias e da ictogênese focando não somente em um desbalanço entre excitação e inibição (BABB *et al.*, 1991; CRONIN *et al.*, 1992) como causa da convulsão, mas também no sincronismo patológico entre redes neurais (KHAMBHATI *et al.*, 2015). Se o sincronismo anormal for uma propriedade geral das redes neurais epileptogênicas, o uso da ASSR pode permitir avaliar quão propensas as redes neurais estão acopladas. Isso pode ser usado como ferramenta diagnóstica ou até permitir avaliar mudanças no estado cerebral que levam a convulsões (PINTO *et al.*, 2017). Na avaliação do hipersincronismo entre redes neurais, foi utilizado no presente trabalho a sondagem ativa das redes neurais em modelo animal de epilepsia do lobo temporal, por meio da medição do potencial evocado auditivo em regime permanente com a hipótese de que há um acoplamento anormal entre estruturas envolvidas na TLE.

As mudanças no processamento cerebral normal em um cérebro portador de epilepsias podem levar a prejuízos na memória, atenção, linguagem, funções executivas e resolução de problemas (HAMBERGER; TAMNY, 1999; SHIRVALKAR; RAPP; SHAPIRO, 2010) e sabe-se que há alterações morfológicas em estruturas como hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e o tálamo (BERNASCONI *et al.*, 2003), porém quão caudal pode chegar a influência de um foco prosencefálico no processamento de um sistema sensorial permanece uma questão não respondida. Assim, para avaliar a hipótese que há prejuízo do processamento sensorial auditivo em um modelo focal de TLE foi utilizado no presente trabalho a ASSR.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar o acoplamento de redes neurais utilizando resposta auditiva evocada em regime permanente e o efeito de um foco no lobo temporal no processamento auditivo em modelo animal de epilepsia do lobo temporal.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Reproduzir o modelo animal focal unilateral de TLE utilizando KA.

Avaliar os efeitos da injeção de KA na energia do LFP e da ASSR no status epilepticus.

Avaliar as alterações da ASSR em áreas envolvidas com a TLE no período latente pós status.

Comparar alterações da ASSR bilateralmente em áreas envolvidas com a TLE em um modelo animal com foco unilateral.

Avaliar o sincronismo entre redes neurais com e sem ASSR no processo de ictogênese e epileptogênese.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar do sexo masculino fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CeBIO-ICB/UFMG) com a idade de oito semanas e peso aproximado de 280g. Os animais foram mantidos em biotério com ciclo claro/escuro de 12h, temperatura ambiente e foram agrupados em caixas com 04 animais com comida e água sem restrições. Os animais foram manipulados por dois dias antes da cirurgia para habituação. O desenho experimental foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da UFMG (CEUA) sob o protocolo nº175/2018 anexado na figura S1.

4.2. CIRURGIA

Os ratos foram anestesiados com uma solução de isoflurano/oxigênio a 5% para indução e manutenção com 2%, de acordo com as recomendações do comitê de ética no uso de animais da UFMG (CEUA-UFMG). A profundidade anestésica foi considerada suficiente quando houve supressão do reflexo de retirada da cauda quando pressionada. Após a indução anestésica foi realizada tricotomia da cabeça. O animal foi posicionado em aparelho estereotáxico e fixado por meio de barras auriculares maciças. Esse procedimento foi seguido pela degermação da parte superior da cabeça do animal [solução de povidone-iodine (7.5%, tópico)] seguido da aplicação de anestesia local com solução de lidocaína e epinefrina (2%; 0,2 mL).

Foi realizada uma excisão elíptica da pele a partir da linha interauricular que se estendeu por aproximadamente 0,8 centímetros anteriormente e com largura de aproximadamente 0,5 centímetros. Após a excisão, foi realizada a limpeza da região com cloreto de sódio 0,9% estéril para melhor visualização das suturas cranianas.

A cirurgia estereotáxica iniciou-se com o nivelamento dorso ventral das suturas lambda e bregma, seguido da trepanação para inserção de três parafusos de aço (Fine Science Tools, nº19010-00), sendo dois no osso frontal bilateralmente, terra à direita e referência à esquerda, e um no osso parietal à direita para melhor fixação do implante. Após esse procedimento, foi feito mais seis trepanações para a implantação de eletrodos de registro nas localizações: colículo inferior bilateralmente (AP -9,0; LL 1,8; DV -4,0), amígdala bilateralmente (AP -2,52; LL 4,0; DV -8,2) e em CA3 bilateralmente (AP -5,6; LL 4,3; DV -5,5). Além disso, foi implantada uma cânula unilateral na região CA3 direita na mesma coordenada de CA3 com profundidade 1mm menor do que do eletrodo de registro (Atlas Paxinos & Watson 2001). A parte proximal dos eletrodos foi soldada aos fios de cobre do conector RJ-45 de oito contatos, que por sua vez, foi fixado ao crânio com massa acrílica. Os eletrodos foram desenvolvidos manualmente a partir de um par trançado de fios de aço inoxidável revestidos por teflon (0.127 mm de diâmetro interno; Modelo: 791400, A-M Systems®). A cânula para infusão foi feita a partir de agulhas 24G, cortadas com tamanho de 1,5 cm. Um pequeno filamento de aço foi soldado perpendicularmente à cânula para aumentar sua aderência ao acrílico de fixação

usado na cirurgia. Ao final da cirurgia foi injetado 1mL de solução salina 0,9% via intraperitoneal para hidratação e solução analgésica opiácea via subcutânea (Tramadol®; 12 mg/Kg). O resultado pós-operatório pode ser visto na figura 1 abaixo.

No primeiro dia pós-operatório, os animais receberam por via subcutânea reforço de Tramadol 12 mg/kg. No perioperatório foi usada dose única penicilina-G benzatina, coquetel antibiótico de amplo espectro (Baytril®, 5 mg/kg) via intramuscular. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas isoladas, porém com tampas elevadas o que permite o contato social com os animais de outras gaiolas. Após um período de sete dias de recuperação, os animais foram encaminhados aos experimentos.



Figura 1: Pós-operatório imediato.

4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

No período experimental os animais foram posicionados em uma caixa de acrílico com 3 faces pretas e uma transparente (30 x 30 x 25 cm), que foi limpa entre cada experimento com álcool 70%. Os animais foram conectados ao sistema de registro e após um período de habituação de aproximadamente 15 minutos em silêncio, foram submetidos a cinco estimulações sonoras. A partir deste ponto, os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos: KA e Salina. Imediatamente após os tratamentos, os animais receberam estimulação auditiva por

períodos de 1 minuto, por 40 vezes, onde cada estímulo foi intervalado por 30 segundos.

Ao final do experimento, os animais foram registrados por mais dez minutos em silêncio. Após esse último registro, caso o animal fosse do grupo que tenha recebido injeção de KA, foi administrada uma dose de diazepam intraperitoneal 20 mg/kg intraperitoneal (Ben-Ari, Tremblay et al. 1979) para interromper o status epiléptico. Os animais foram estudados ao longo de três semanas, com registros na presença de estimulação auditiva a cada 7 dias conforme mostrado na figura 2.

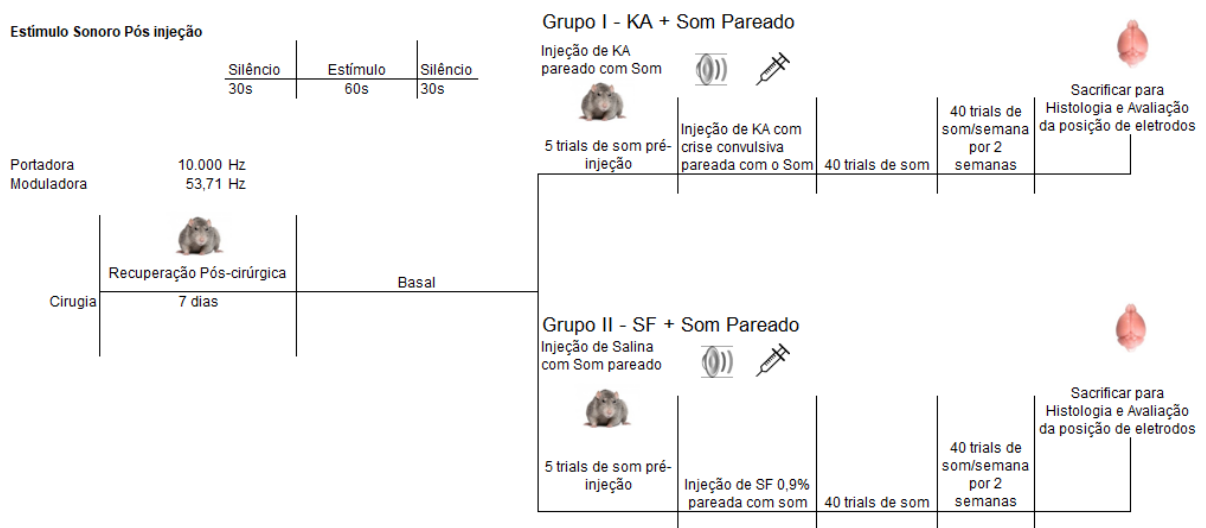


Figura 2: Desenho Experimental. SF: solução fisiológica 0,9% (salina); KA: ácido kaínico. A figura representa o início do protocolo experimental em que ocorre a cirurgia, seguido pelo período de recuperação pós-cirúrgica de sete dias. Ao final desse período os animais foram separados em dois grupos, um KA e outro SF. Cada um deles recebeu cinco estimulações sonoras e injeção de KA ou SF a depender do grupo. Após a injeção, receberam quarenta estímulos sonoros em cada um dos três dias de registro que foram intercalados por sete dias. Ao final do terceiro dia de registro os animais foram sacrificados e o posicionamento dos eletrodos e da cânula foram conferidos por histologia.

4.4. INJEÇÃO DE ÁCIDO KAÍNICO

Os animais do grupo KA receberam a injeção (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,2 μL em um tempo total de infusão de 5 minutos) no CA3 direito, utilizando um tubo de sílica fundida de

75 µm diâmetro interno e 155 µm diâmetro externo (Polymicro Technologies). Com os animais contidos pelo experimentador, a injeção foi realizada utilizando uma bomba injetora por um período de cinco minutos, seguido por uma pausa de mais cinco minutos antes da retirada da agulha para evitar refluxo.

A injeção de KA induz status epilepticus comportamental caracterizado por movimentos da cabeça, respiração estereotipada, movimentos de “cachorro molhado”, roer, movimentos da cauda ou diminuição da resposta que podem ser interrompidos por convulsões secundariamente generalizadas (Rattka, Brandt et al. 2013). A intensidade da crise foi quantificada pela escala de Racine já descrita. No grupo salina os estímulos auditivos ocorreram logo após a injeção de solução fisiológica (NaCl 0,9%; volume 0,2 µL).

4.5. ESTÍMULOS AUDITIVOS

O estímulo auditivo consistiu de um tom puro de 10 kHz, modulado em amplitude por uma onda senoidal de 53,71 Hz (100% de profundidade de modulação) (PINTO *et al.*, 2017), amplificado por um aparelho comercial (AB100, 100WRMS, 4Ω, NCA) e ajustado a 85 dB APL no centro superior da caixa (decibelímetro Bruel & Kjaer tipo 2238) (MALMIERCA *et al.*, 2008; MEEREN *et al.*, 2001). O conversor digital-analógico de um Arduino Due foi usado para gerar os estímulos auditivos (AMARAL-JÚNIOR *et al.*, 2019; PICTON *et al.*, 2003). O algoritmo por trás da geração de tons está disponível aqui: <https://cutt.ly/FzHgv7H>.

4.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após os três registros eletrográficos, os animais foram eutanasiados de acordo com as recomendações do comitê de ética no uso de animais da UFMG (CEUA-UFMG) com uma overdose de Cetamina 30mg/Kg + Xilazina 1,5mg/Kg intraperitoneal e os cérebros foram coletados para confirmação histológica da localização dos eletrodos. Os cérebros foram fatiados em criostato com fatias de 50-100 µm coradas com vermelho neutro a 2%. Só foram utilizados animais que apresentavam correto posicionamento dos eletrodos e da cânula.

4.7. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO

Animais que perderam o conector, a cânula ou que apresentaram eletrodos mal posicionados foram excluídos do estudo. Animais que apresentaram perda de pelos ou sinais de dor intensa também foram excluídos dos experimentos. Em um total de vinte animais que participaram do trabalho, quatro animais de cada grupo foram utilizados para as análises.

4.8. ANÁLISE DO SINAL

Os sinais foram obtidos através de um estágio de ganho pré-amplificado (ganho 1x. Adaptador ZCA-AMN16. Omnetics Tucker-Davis Technologies) acoplado a um cabo comercial de registro (ZIF-CLIP - 16 canais). Um pequeno adaptador foi embutido em uma placa de circuito impresso para que a unidade comercial pré-amplificada se adaptasse a um conector RJ-45, implantado cirurgicamente nos animais experimentais. Os sinais foram filtrados entre 1 e 300 Hz, amplificados por 24.000 V/V e amostrados em aproximadamente 3 kHz através do sistema de registro da *Tucker-Davis Technologies* (TDT RZ2 BioAmp e pré-amplificador RZ2)

Os *timestamps* referentes aos picos e os vales da frequência de modulação foram registrados em uma entrada digital do sistema de registro. Por meio de uma interpolação linear, esses valores de tempo foram usados para obter as fases instantâneas, que por sua vez, foram usadas para reconstruir/estimar o sinal de modulação.

Os dados foram analisados *off-line* usando códigos personalizados e funções padrão do MATLAB (MATLAB R2020a Signal Processing Toolbox e EEGLab toolbox - <https://sccn.ucsd.edu/eeglab/index.php>). Durante a análise dos potenciais de campo locais, a energia do sinal, na banda de 53.71 ± 0.6 Hz, foi estimada através da função *spectrogram* (janela de Hamming, 32.768 pontos, 50% de sobreposição)

Os valores de energia analisados consideraram apenas o período do estímulo auditivo (antes e depois da injeção de ácido caínico), normalizado por um período de registro basal de silêncio. O período basal foi definido no primeiro dia experimental, como uma janela de cinco minutos, com menor incidência de ruídos, dentro dos 15 minutos de habituação.

A atividade oscilatória sincronizada na banda de 53.71 Hz, entre os pares de canais foi calculada pela coerência de magnitude quadrada, através da função padrão do Matlab *mscohere* (32.768 pontos, 50% de sobreposição). A coerência de magnitude quadrada é uma análise de coerência de fase ponderada pela amplitude do sinal que pode ser calculada conforme a equação 1 abaixo. Como a coerência de magnitude quadrada aumenta segundo a energia, que muda conforme a frequência, tempo e outras variáveis, optou-se por normalizar o resultado. Essa normalização foi realizada pela subtração dos valores de coerência calculados no período basal, o mesmo período definido para as análises de energia. A coerência de magnitude quadrada apresenta valores entre zero e um, sendo um completamente coerente e zero sendo completamente independente. Quanto maior a coerência entre duas áreas, maior a sincronia de fase entre elas (COHEN, 2014).

$$C_{xy} = \left| n^{-1} \sum_{t=1}^n |m_{tx}| |m_{ty}| e^{i\phi_{txy}} \right|^2$$

Equação 1: Cálculo da coerência de magnitude quadrada entre sinais de dois eletrodos.

Os valores de coerência entre os canais foram representados de duas maneiras: através de uma matriz convencional e através de grafos. Para essa última representação, foi utilizada a função `circularGraph`:

(<https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/48576-circulargraph>)

que traça um gráfico circular interativo para ilustrar as conexões da rede.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações estatísticas foram feitas com análise de variância de medidas repetidas de duas vias (ANOVA). Apesar do pequeno tamanho amostral com limitação dos graus de liberdade, foi realizado post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados usando o GraphPad prism 8.0a.

5. RESULTADOS

5.1. POTENCIAL EVOCADO

A ASSR foi obtida nos colículos inferiores em todos os animais dos dois grupos e está exemplificada na forma de espectrogramas ao longo do tempo na figura 3 abaixo. Conforme organização tonotópica da via auditiva, a membrana basilar coclear vibra em local específico, dependendo da frequência portadora da ASSR, e a frequência de disparo neural coclear é definida pela frequência moduladora da ASSR (PICTON *et al.*, 2003). A frequência de disparo coclear é transmitida via ascendente, passando pela região do colículo inferior (MERZENICH; REID, 1974), o que justifica a obtenção de um aumento de disparo neuronal na frequência de 53,71 Hz nesta região. Esse aumento de disparo pode ser visto na figura 3 no colículo inferior esquerdo (C e D) e no colículo inferior direito (G e H) por um aumento da amplitude do LFP durante a estimulação auditiva. Durante o mesmo período, pode-se notar barras horizontais nos espectrogramas que são a ASSR no período de estimulação auditiva e a quantidade de energia está representada pela intensidade da cor no gráfico. Acima dos espectrogramas, encontra-se a energia do sinal que aumenta durante o som. As figuras da esquerda representam os cinco períodos de estimulação auditiva anteriores à injeção e as figuras da direita representam os quarenta períodos de estimulação após a injeção no primeiro dia de registro.

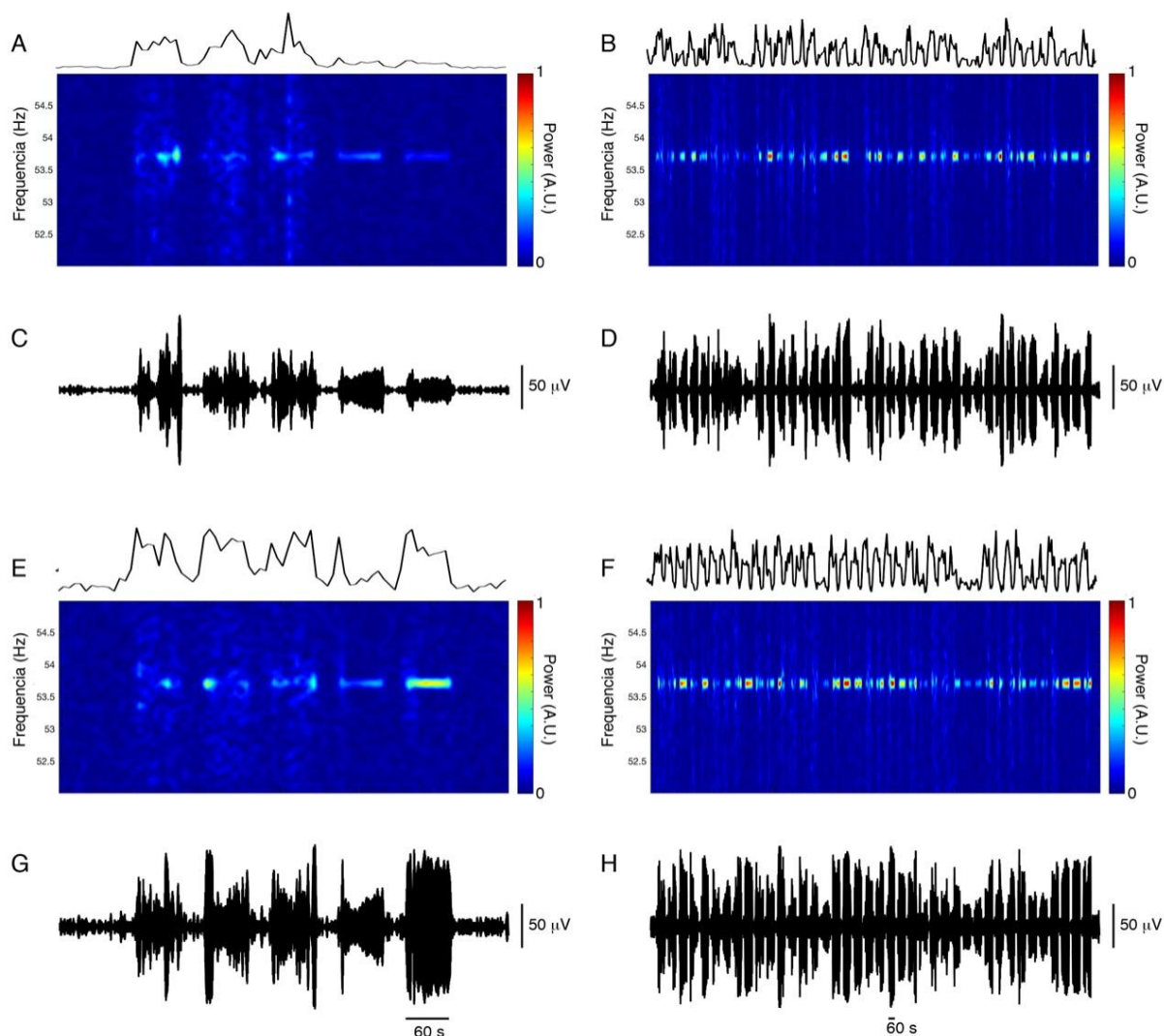


Figura 3: Resposta evocada ao longo do protocolo de estimulação acústica em um animal do grupo salina. A até D - resposta eletrográfica no colículo inferior esquerdo. E até H - resposta eletrográfica no colículo inferior direito. As figuras da esquerda representam o período antes da injeção e as da direita após a injeção. As figuras C, D, G e H representam o LFP filtrado em $53,71 \pm 2$ Hz. Acima de cada espectrograma está representada a energia do sinal. A intensidade da cor nos espectrogramas representa a energia.

5.2. STATUS EPILEPTICUS

A figura 4 exemplifica a ocorrência de uma das crises convulsivas após a injeção de KA em um dos animais do grupo KA. A crise ocorre com aumento progressivo da amplitude do LFP e da energia total culminando em descargas

epileptiformes repetidas de alta amplitude e frequência. Essas descargas foram acompanhadas por manifestações comportamentais como atitude estacionária com a cabeça estendida, automatismos faciais, mioclonias da cabeça, mioclonia bilateral das patas anteriores com sustentação do corpo sob as patas posteriores chegando até a perda de equilíbrio e generalização. Três animais do grupo KA chegaram a apresentar crises convulsivas classificadas como racine cinco e um que apresentou somente crises até racine quatro. As crises tanto eletrográficas como comportamentais apresentaram recorrência ao longo do primeiro dia de registro com períodos de registro com aparente normalidade. Nenhum animal do grupo salina apresentou crise convulsiva.

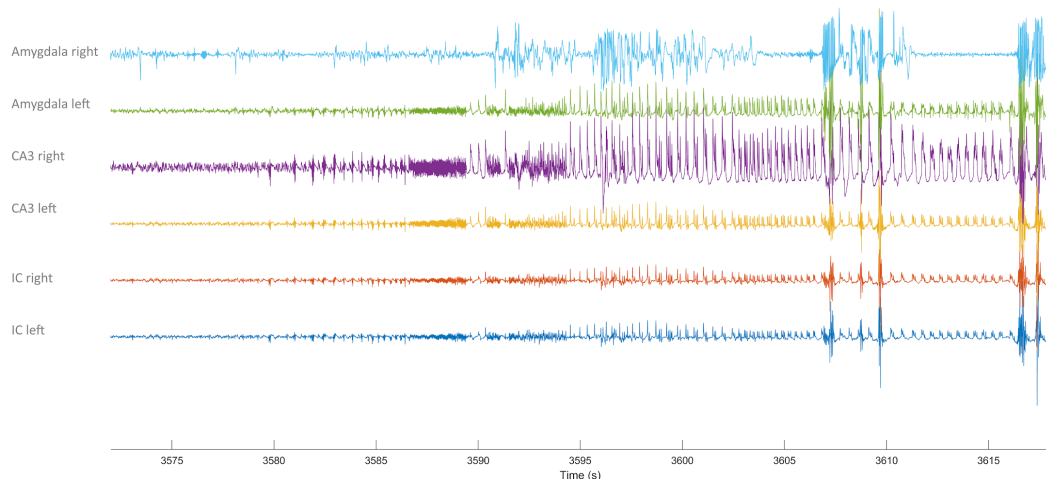


Figura 4: Registro do LFP durante uma das crises convulsivas ao longo do tempo após injeção de KA no primeiro dia de registro. IC right: colículo inferior direito; IC left: colículo inferior esquerdo; CA3 right: CA3 direito; CA3 left: CA3 esquerdo; Amygdala right: amígdala direita; Amygdala left: amígdala esquerda.

A figura 5 mostra o LFP antes da injeção do KA em CA3 direito e um aumento de energia que ocorre após essa injeção. Esses dados vão ao encontro dos apresentados em crise convulsiva em modelos animais agudos pela injeção de KA em outros trabalhos (KLEE *et al.*, 2017; RATTKA; BRANDT; LÖSCHER, 2013). Assim, as figuras 4 e 5 exemplificam a execução do protocolo experimental com a

obtenção de status epilepticus após injeção de KA conforme esperado em um modelo animal focal de TLE.

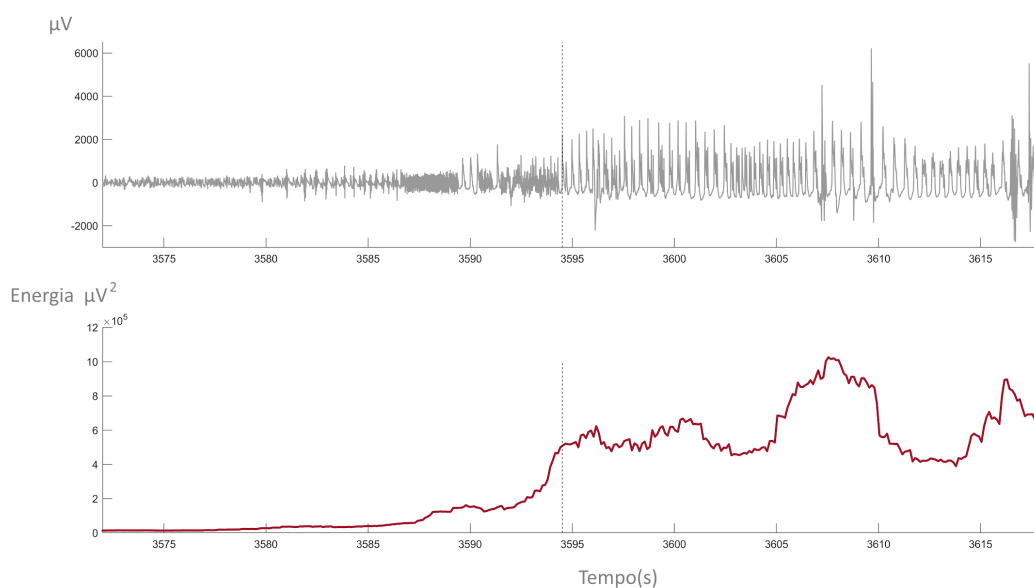


Figura 5: LFP e energia total da crise convulsiva em CA3 direito ao longo do tempo após injeção de KA no primeiro dia de registro. O gráfico de cima representa o LFP e abaixo está representado a energia total em um mesmo período de tempo. A linha pontilhada representa o momento do início da crise convulsiva eletrográfica em que pode-se perceber atividade epileptiforme no gráfico de cima e aumento da energia no gráfico de baixo.

5.3. ANÁLISE DE ENERGIA DA ASSR

Na análise da energia na banda da moduladora na figura 6 [$F(3,18) = 5,608$; $p = 0,0068$] percebe-se um aumento da energia na banda da ASSR no colículo inferior direito no segundo e terceiro dias de registro em relação ao primeiro dia antes da injeção ($p = 0,018$ e $p = 0,0014$) e depois da injeção ($p = 0,0109$ e $p = 0,0008$). Essa diferença pode representar uma redução da inibição de cima para baixo após a injeção de KA o que permitiria o aumento de energia nesta banda de frequência.

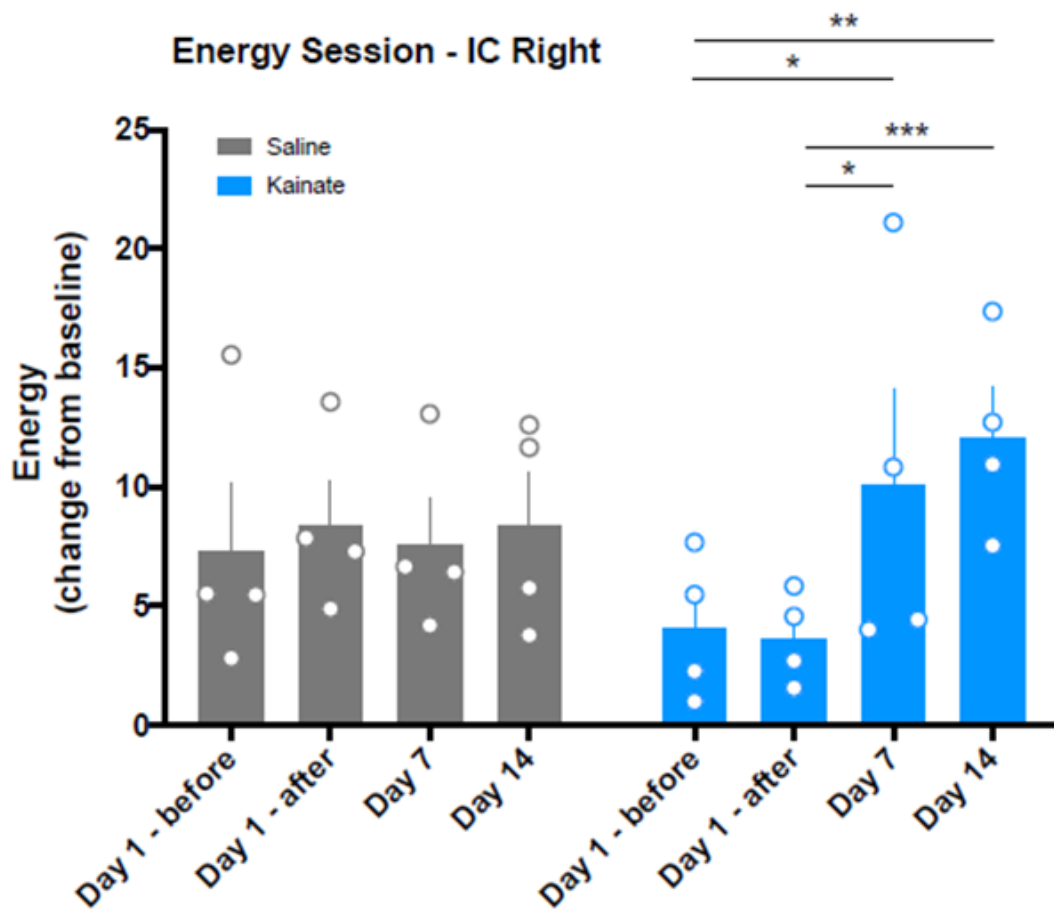


Figura 6: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo no colículo inferior direito. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

A análise do colículo inferior esquerdo não apresentou diferença estatística (figura 7) [$F(3,18) = 0,2841$; $p = 0,8362$].

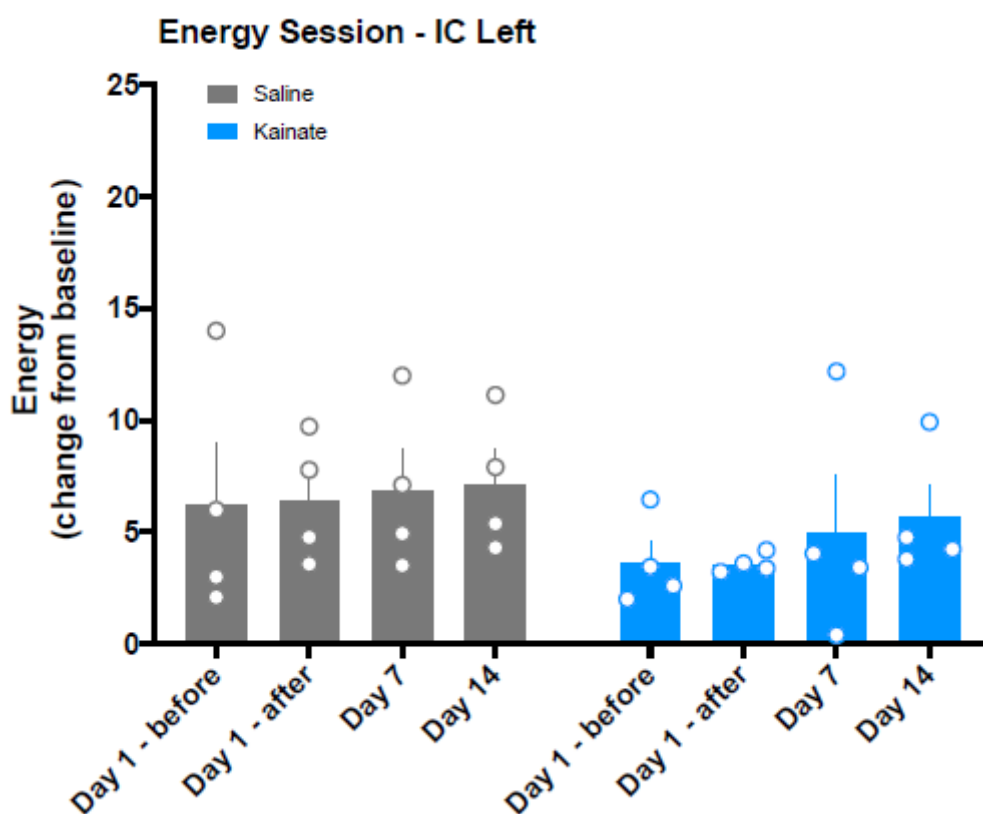


Figura 7: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo no colículo inferior esquerdo. Não houve diferenças estatísticas intra ou inter grupo. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

A energia da ASSR em CA3 direito no grupo KA (figura 8) [$F(3,18) = 11,99$; $p = 0,0002$] apresenta um aumento no primeiro dia após a injeção ($p = 0,0009$) e redução no segundo ($p = 0,0592$) e terceiro dias ($p = 0,1885$) de registro em relação ao período anterior à injeção. A energia do primeiro dia após a injeção de KA apresenta redução no segundo ($p < 0001$) e terceiro dias ($p < 0001$) de registro no grupo KA e em comparação ao grupo controle no primeiro dia após injeção ($p = 0,0572$). Essa mudança na energia, provavelmente ocorreu devido a reorganização das redes neurais após o insulto inicial.

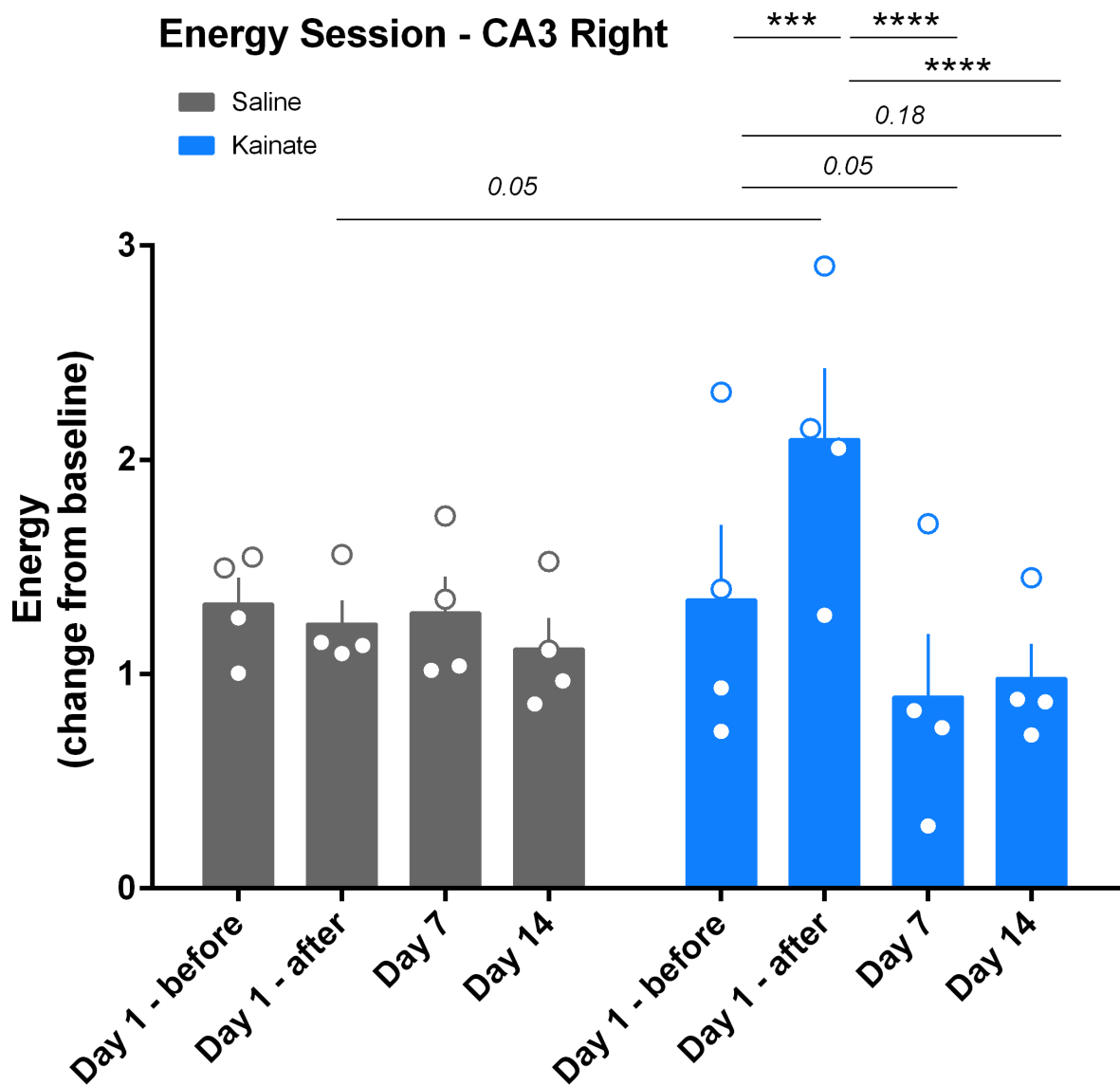


Figura 8: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo em CA3 direito. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Ao analisar a energia da banda moduladora de CA3 esquerdo (figura 9) [$F(3,18) = 1,041$; $p = 0,3984$], apesar de não ter um resultado estatisticamente significativo, observa-se uma tendência à um aumento da energia na banda da ASSR no dia sete no grupo KA em relação ao grupo salina no mesmo período ($p = 0,2612$). De forma semelhante, há uma tendência à redução dessa energia do segundo dia de registro em relação ao terceiro dia no grupo KA ($p = 0,2677$). Pode-se especular que essas diferenças ocorrem por um aumento da atividade

desta região após a lesão do CA3 direito, como forma de compensação das alterações nas redes neurais, devido ao insulto, seguido de posterior normalização.

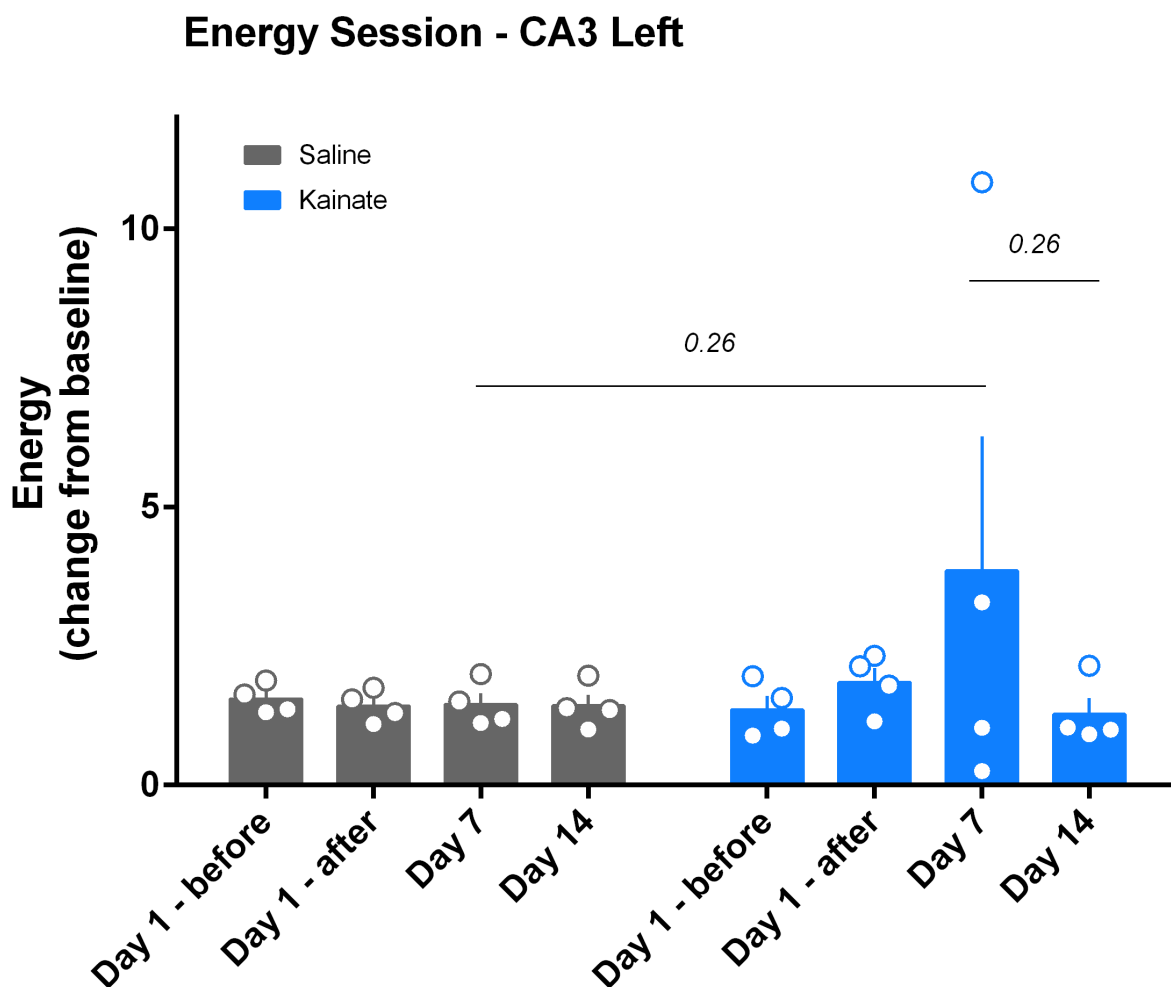


Figura 9: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo em CA3 esquerdo. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

A energia da ASSR na amígdala direita (figura 10) [$F(3,18) = 1,472$; $p = 0,2555$] mostra uma tendência a uma redução da energia do terceiro dia de registro do grupo KA em relação ao primeiro dia após a injeção de KA ($p = 0,13$) e em relação ao terceiro dia do grupo salina ($p = 0,1979$).

Energy Session - AMY Right

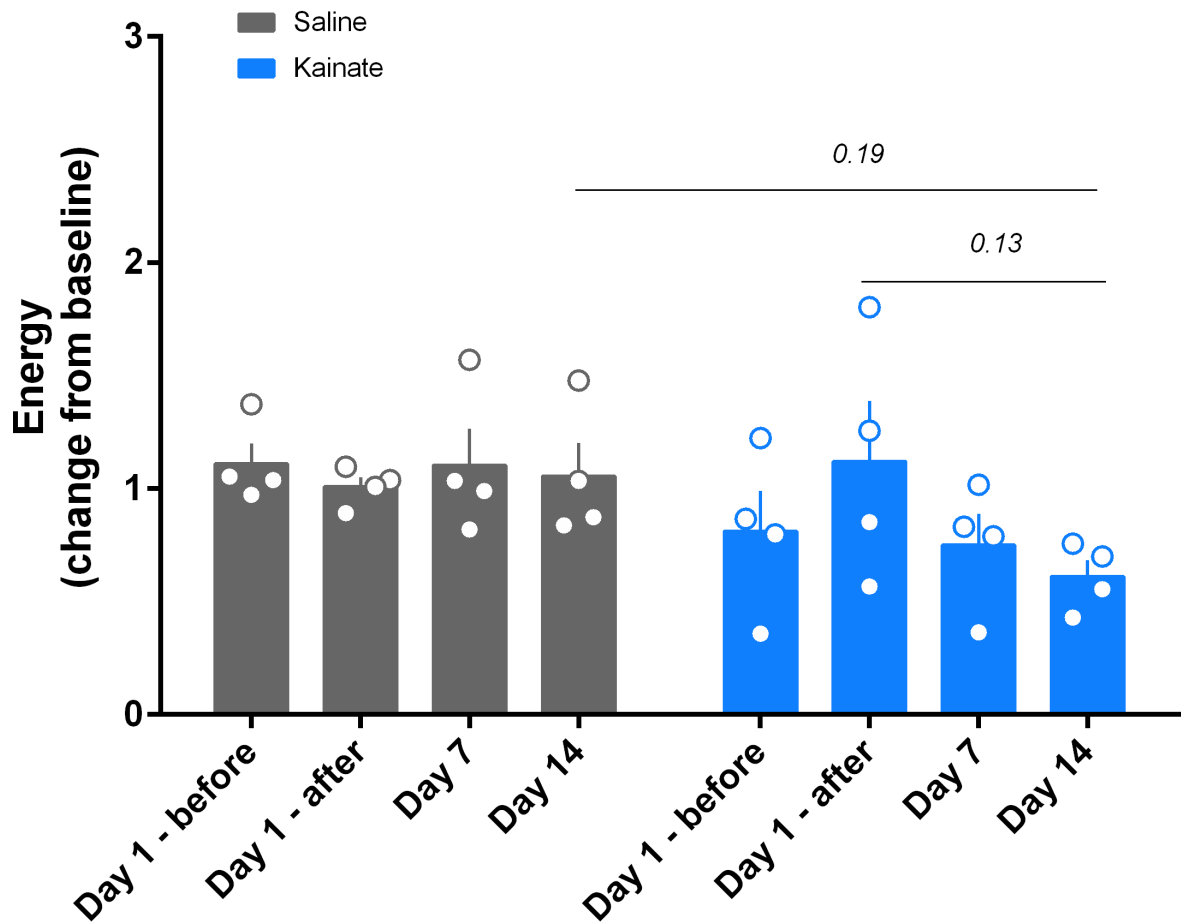


Figura 10: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo na amígdala direita. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

Na análise da energia na banda da moduladora na amígdala esquerda (figura 11) [$F(3,18) = 2,550$; $p = 0,0880$] é possível perceber uma tendência a um aumento de energia no primeiro dia após a injeção de KA em relação ao período anterior ($p = 0,2696$). A energia após a injeção de KA no primeiro dia apresenta uma tendência de redução no segundo ($p = 0,0684$) e terceiro dias ($p = 0,0796$). Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

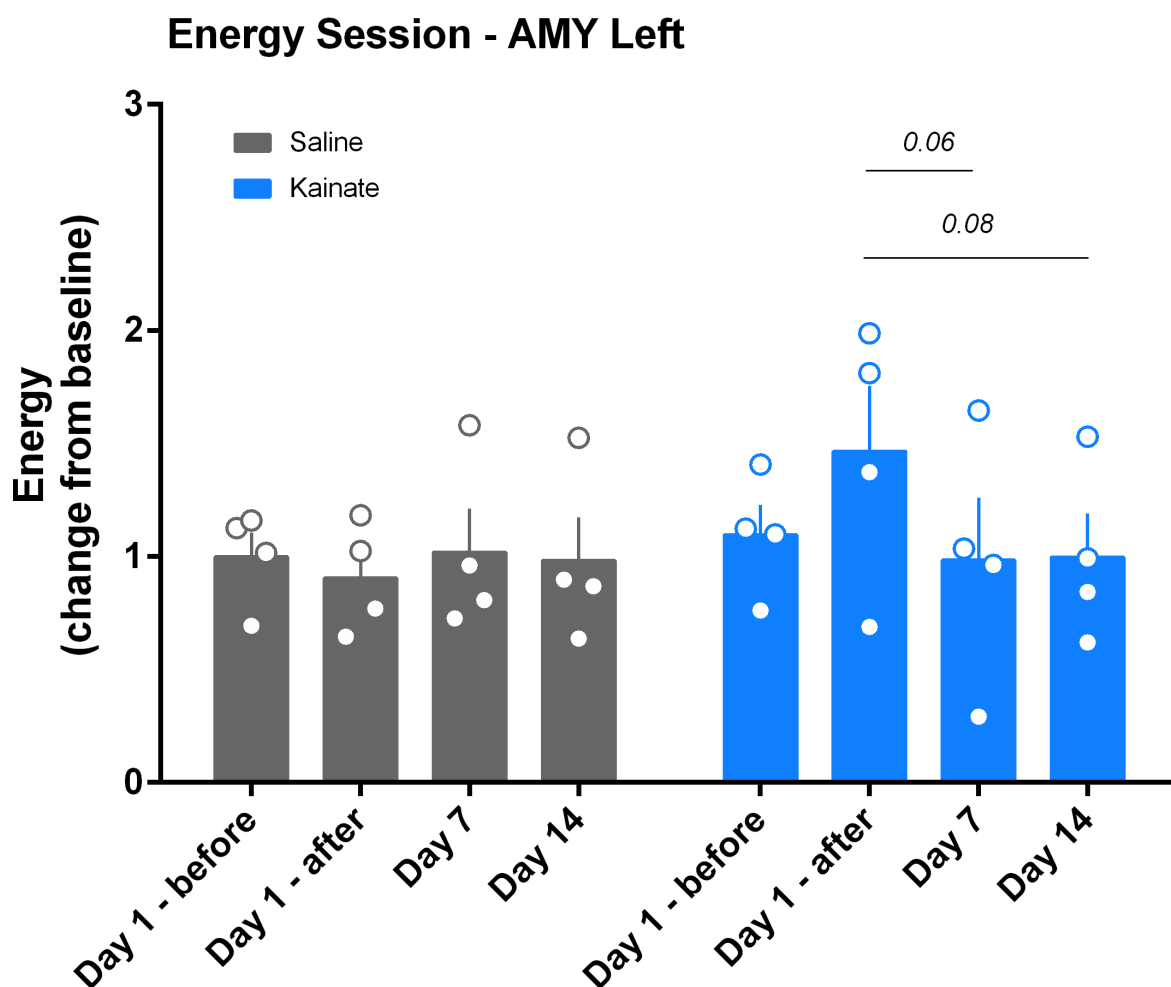


Figura 11: Energia da ASSR no grupo salina e KA ao longo do tempo na amígdala esquerda. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

5.4. ANÁLISE QUALITATIVA DA COERÊNCIA DA ASSR

Outra forma de análise dos resultados é a análise de coerência. Assim como já citado, a análise de coerência permite avaliar o sincronismo entre áreas diferentes. No período pré-injeção do primeiro dia de registro, há uma baixa coerência entre as estruturas estudadas na frequência de 53,71 Hz no grupo salina sem e com estímulo sonoro (figura 12). Observa-se uma coerência um pouco maior entre os colículos inferiores por participarem do processamento sonoro no começo da via auditiva e receberem projeções semelhantes de estruturas mais baixas.

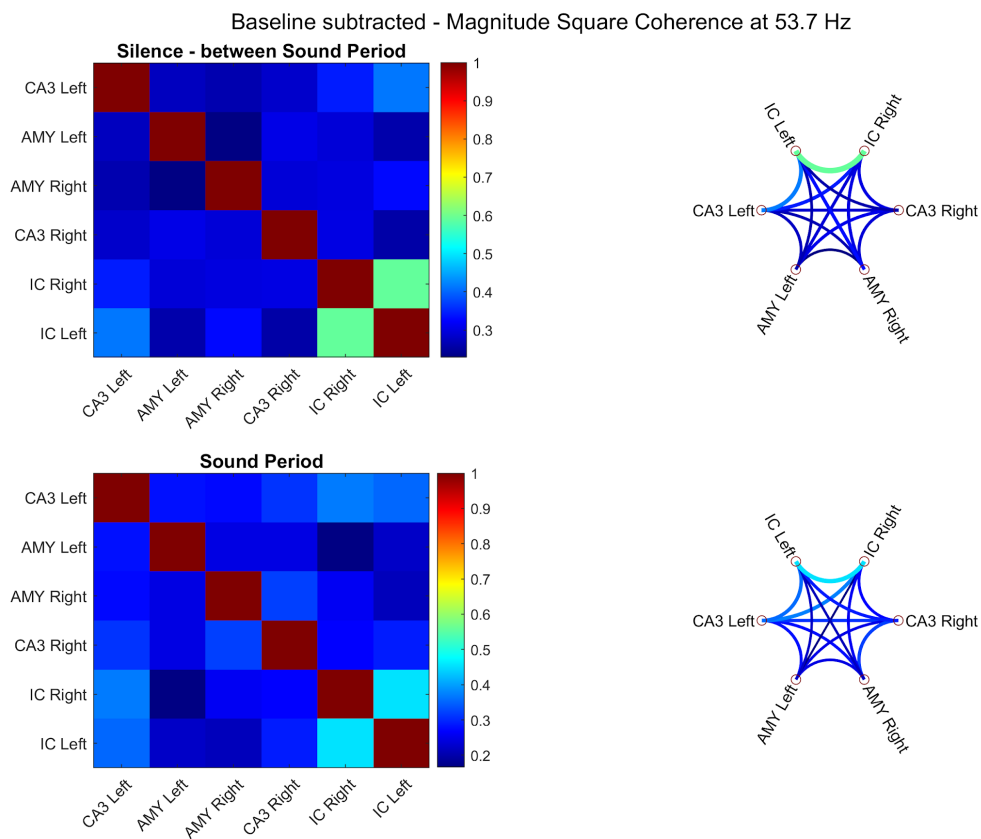


Figura 12: Coerência e conectograma em 53,71 Hz no grupo salina antes da injeção sem estímulo sonoro e com esse estímulo no primeiro dia de registro.

No período pós injeção no grupo salina (figura 13) não se observam alterações importantes na coerência em 53,71 Hz entre as estruturas e ao se comparar com a figura 12, mesmo na vigência de som. Esse resultado é esperado já que se trata do grupo controle do experimento e mostrando que a injeção de solução salina pouco altera a dinâmica cerebral.

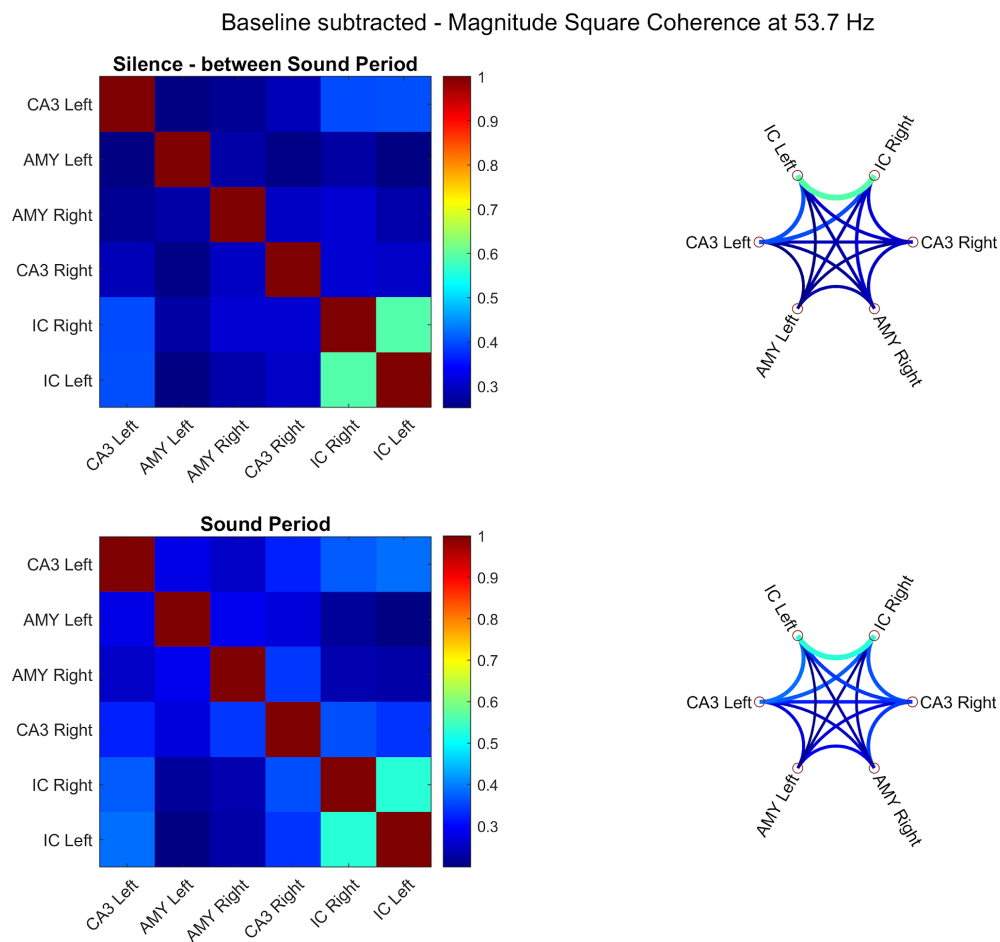


Figura 13: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo salina após a injeção sem estímulo sonoro e com esse estímulo no primeiro dia de registro.

Ao comparar o grupo KA no período pré injeção (parte de cima da figura 14), que representa o período sem estímulo sonoro com o período com estímulo sonoro (parte de baixo da figura 14) percebe-se um aumento da coerência nos colículos inferiores. Ao avaliar a figura 15, ou seja, avaliar o grupo KA após a injeção, pode-se notar que há o mesmo aumento de coerência nos colículos inferiores na vigência de som em relação ao grupo KA antes da injeção (figura 14). Além disso, o grupo após a injeção de KA na vigência de som apresenta um aumento de coerência entre CA3 direito e amígdala direita.

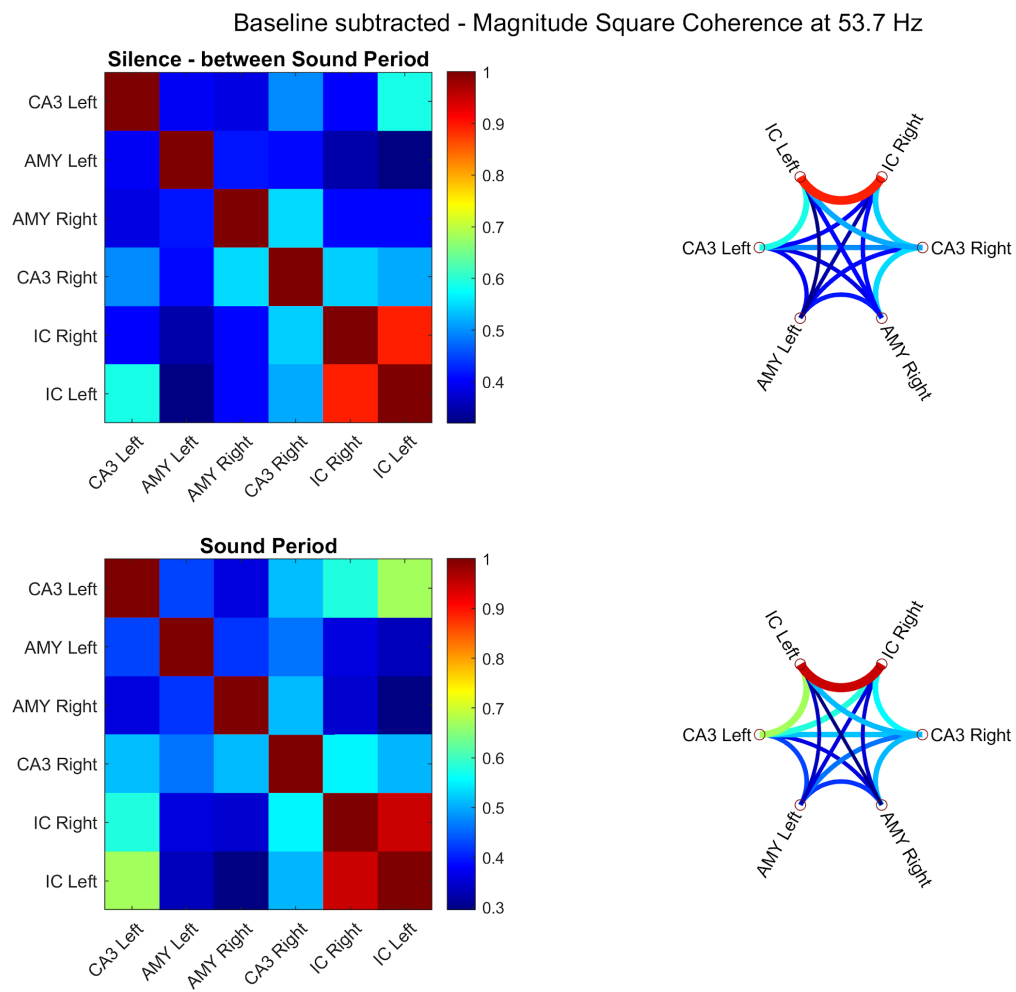


Figura 14: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo KA antes da injeção sem estímulo sonoro e com esse estímulo no primeiro dia de registro.

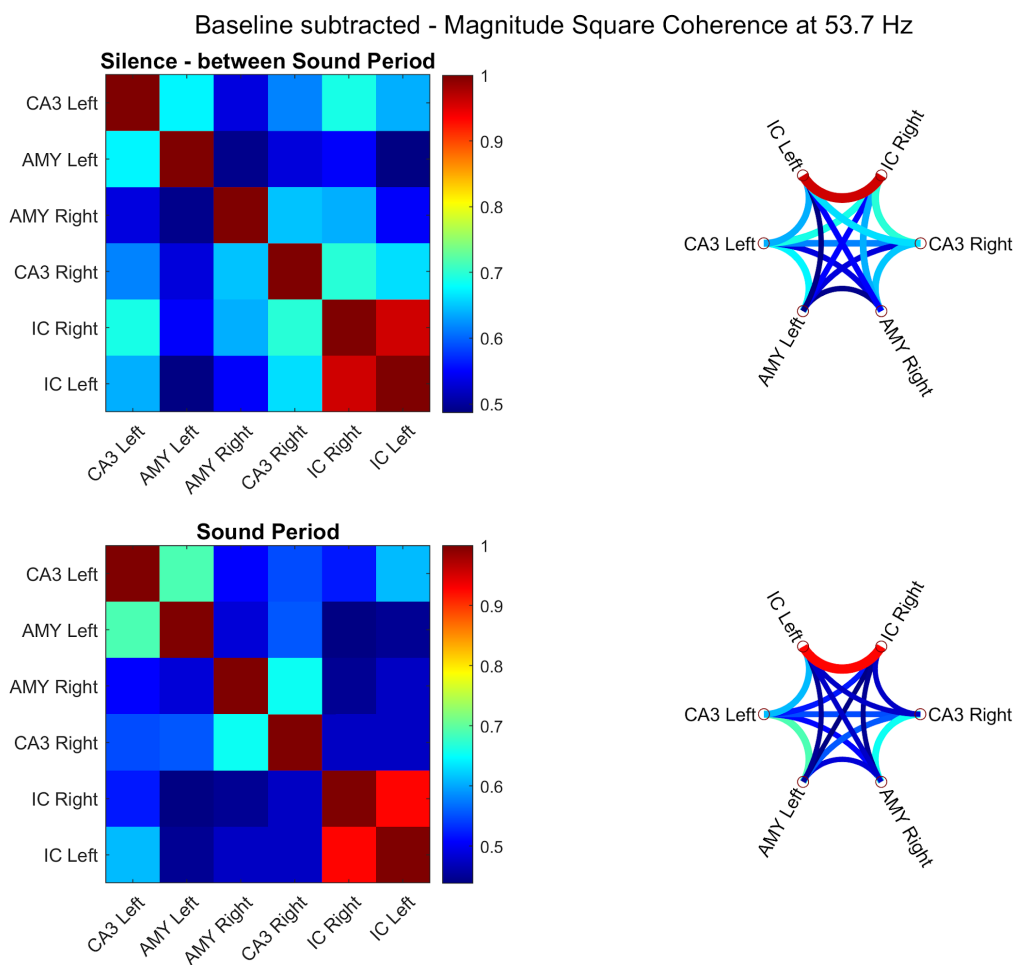


Figura 15: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo KA após a injeção sem estímulo sonoro e com esse estímulo no primeiro dia de registro.

O segundo dia de registro ocorreu sete dias após o primeiro e representa alterações eletrográficas importantes no grupo KA. Este grupo apresenta um aumento da coerência entre estruturas do lado direito, conforme mostra a parte de cima da figura 16, notadamente entre colículo inferior direito e CA3 direito, entre este e a amígdala direita e com menor intensidade entre colículo inferior direito e amígdala direita no período sem estímulo sonoro em comparação ao primeiro dia de registro. Já no período na presença da ASSR que pode ser visto na parte de baixo da figura 9 há uma diminuição da coerência em relação ao período de silêncio, exceto pelos colículos inferiores. Ao comparar o período na ausência de som deste dia com o primeiro dia de registro, há um aumento de coerência principalmente entre colículo inferior direito e CA3 direito no segundo dia de registro.

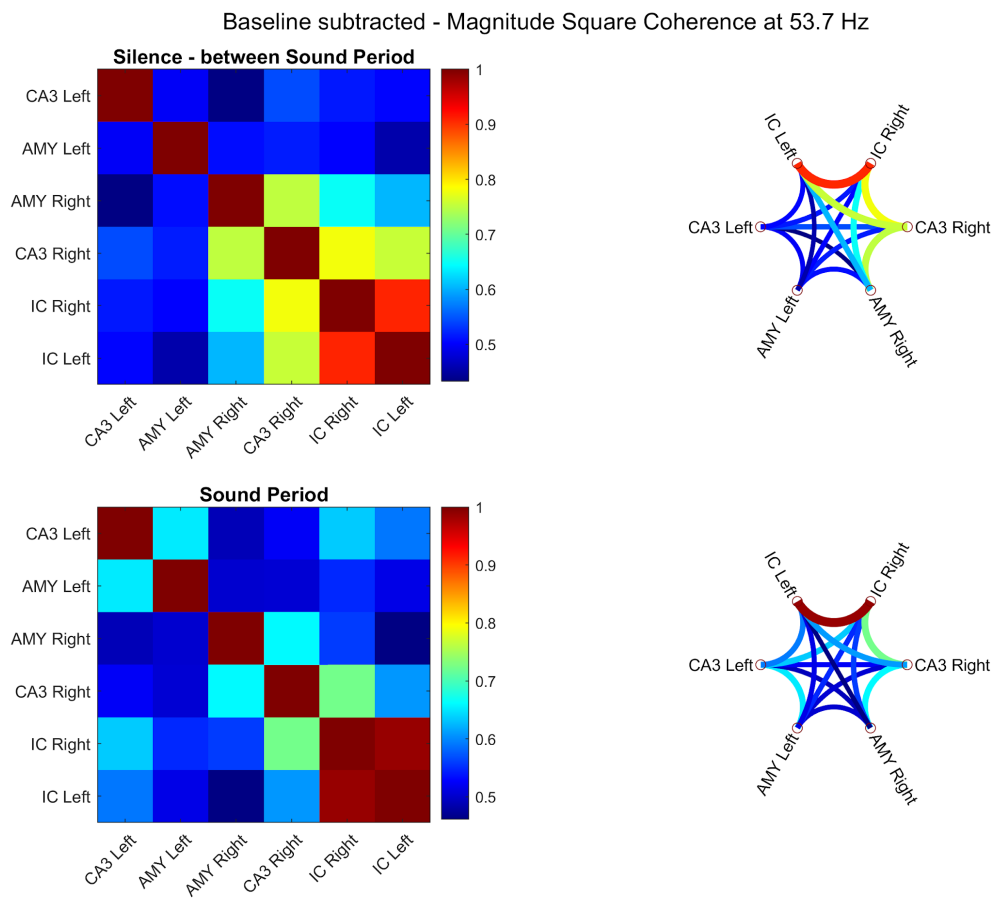


Figura 16: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo KA com e sem estímulo sonoro no segundo dia de registro.

Em relação ao grupo salina (figura 17), não há diferenças importantes na coerência em relação ao primeiro dia de registro.

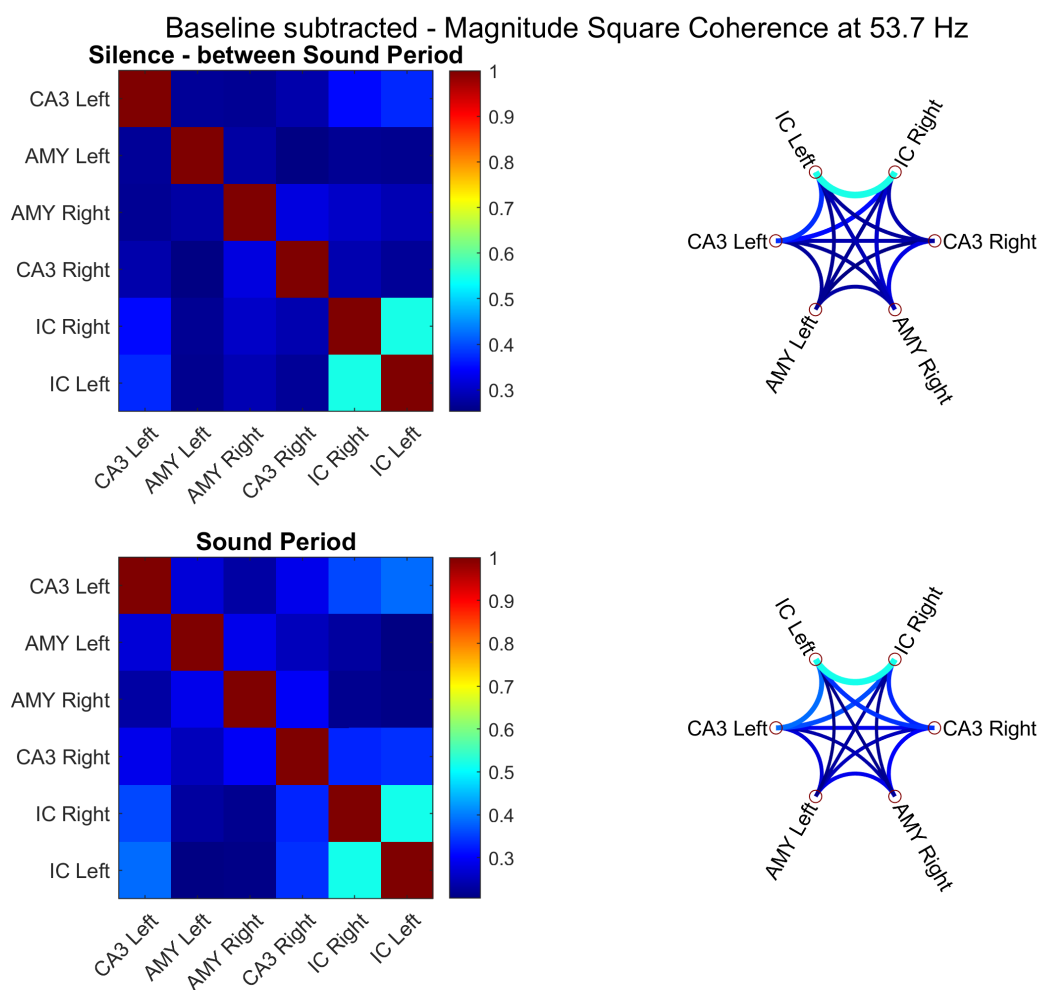


Figura 17: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo salina com e sem estímulo sonoro no segundo dia de registro.

No terceiro dia de registro, o grupo KA se diferencia ainda mais na coerência entre áreas em relação ao grupo salina. Há um aumento da coerência entre estruturas ipsilaterais em relação ao sítio de injeção, notadamente entre CA3 direito e amígdala direita na presença e ausência de som no grupo KA (figura 18). O grupo salina apresenta coerência semelhante ao dos outros dias de registro (figura 19).

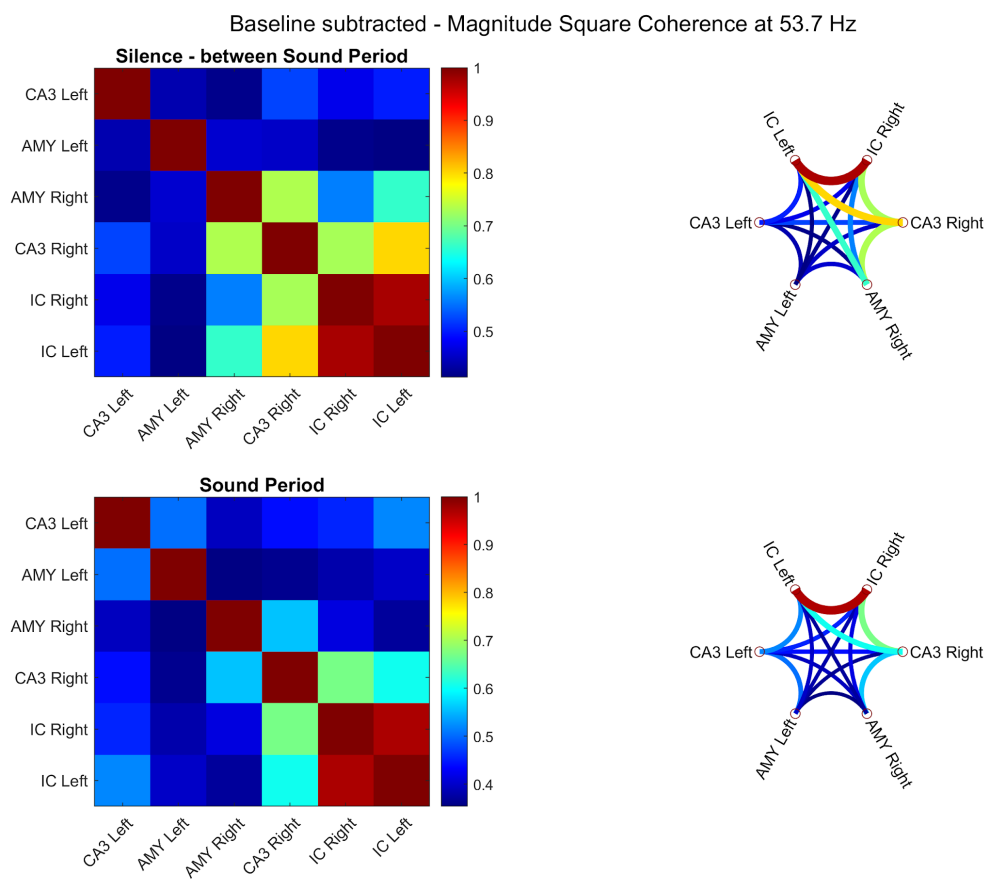


Figura 18: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo KA com e sem estímulo sonoro no terceiro dia de registro.

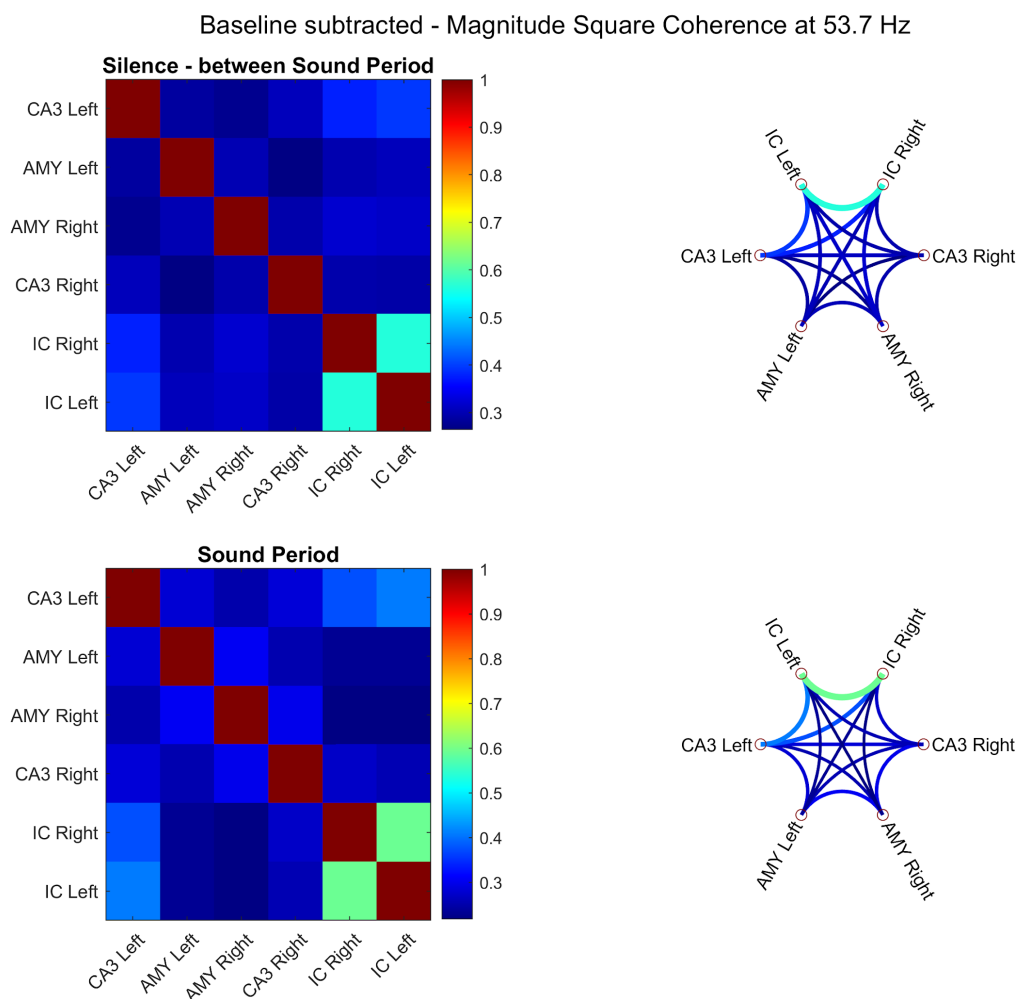


Figura 19: Coerência e conectograma em 53,71Hz no grupo salina com e sem estímulo sonoro no terceiro dia de registro.

5.5. ANÁLISE QUANTITATIVA DA COERÊNCIA DA ASSR

A análise da coerência no grupo salina (figura 20) entre o estímulo sonoro e o colículo inferior esquerdo mostrou diferença estatística entre os períodos com e sem estimulação sonora antes da injeção de salina ($p = 0,0008$), depois da injeção de salina ($p = 0,0026$), no segundo dia de registro ($p = 0,0023$) e no terceiro dia de registro ($p = 0,0006$) com aumento da coerência no período com som. No grupo KA, da mesma forma, a análise de coerência mostrou diferença entre os períodos com e sem estimulação sonora antes da injeção de KA ($p = 0,0092$), no segundo dia de registro ($p = 0,0012$) e no terceiro dia ($p < 0,0001$) com aumento da coerência no período com som. Não houve diferença estatística entre o período após injeção de

KA com e sem som ($p = 0,8838$), provavelmente devido à ocorrência do status epilepticus durante esse período, o que pode levar ao recrutamento anormal de populações neurais (KHAMBHATI *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2017; SILVA, FERNANDO LOPES DA *et al.*, 2003), prejudicando o normal processamento cerebral do período com som. Além disso, no grupo KA, o período do primeiro dia de registro após injeção com som apresenta diferença estatisticamente significativa com o terceiro dia de registro com som ($p = 0,0154$). Na análise entre grupos [$F(7,42) = 0,9350$; $p = 0,4901$] o período com som após injeção de KA apresenta tendência a ter a coerência menor que os períodos com som após injeção ($p = 0,1861$) do grupo salina.

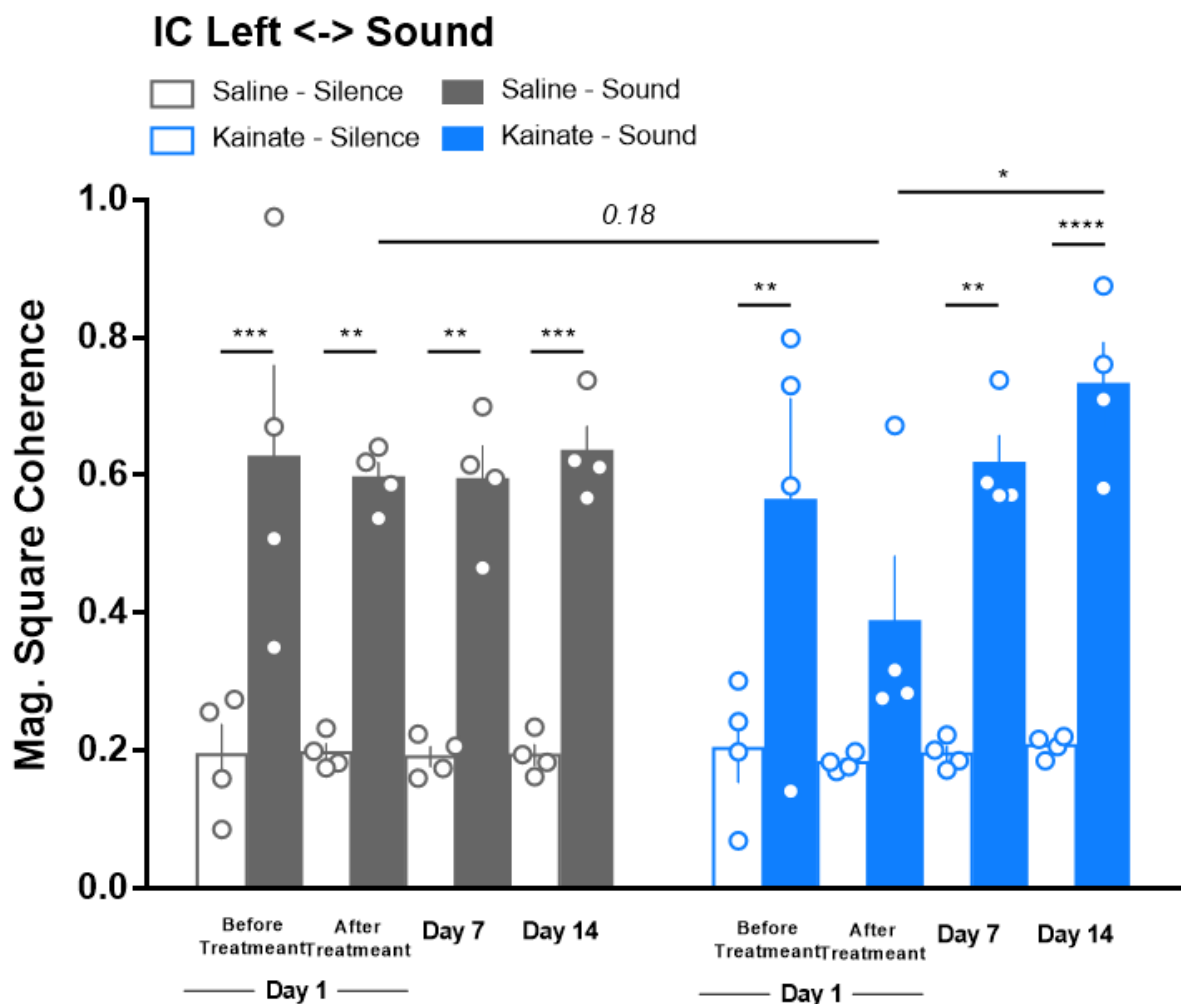


Figura 20: Coerência entre o som e o colículo inferior esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de

post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

A coerência entre colículos inferiores direito e esquerdo na frequência da moduladora (figura 21) não apresentou diferenças estatísticas intra ou intergrupos [F (7,42) = 0,4335; $p = 0,8756$]. Da mesma forma, a coerência entre colículo inferior esquerdo e CA3 esquerdo na frequência da moduladora (figura 22) não apresentou diferenças estatísticas intra ou intergrupos [F (7,42) = 0,65; $p = 0,7122$].

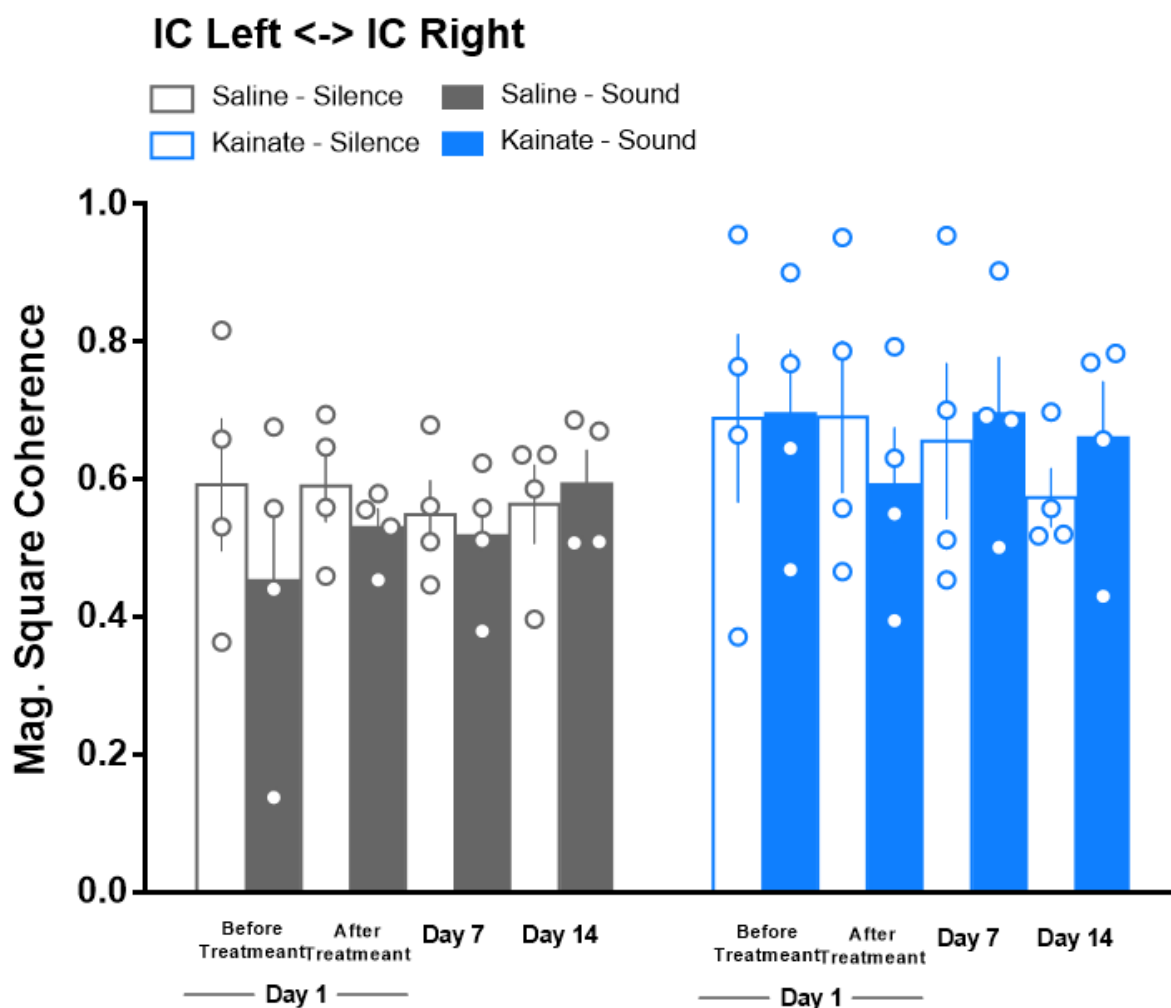


Figura 21: Coerência entre colículos inferiores direito e esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

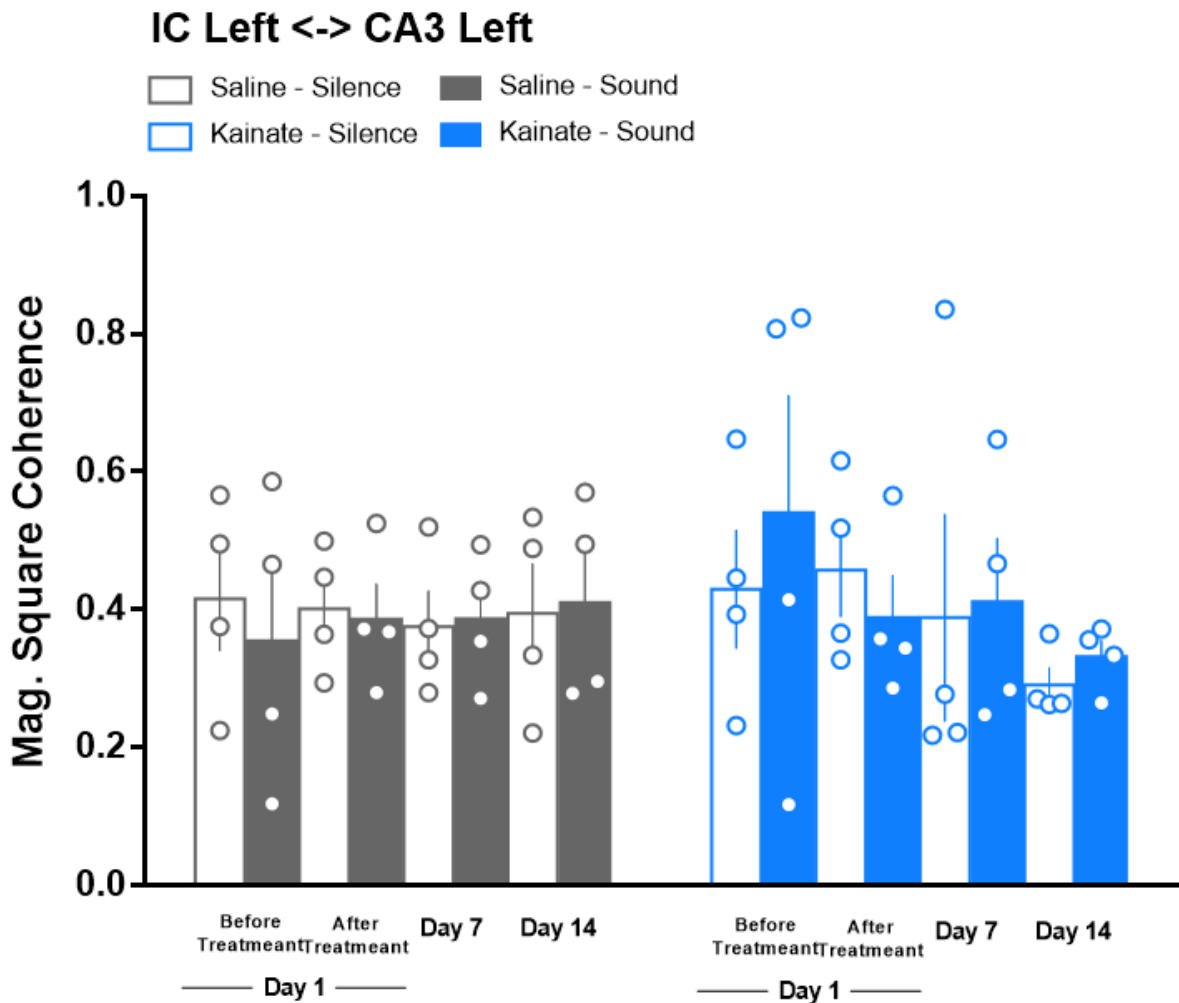


Figura 22: Coerência entre colículo inferior esquerdo e CA3 esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

Ao analisar a coerência entre colículo inferior esquerdo e CA3 direito na frequência da moduladora (figura 23) percebe-se um aumento da coerência no grupo KA do primeiro dia de registro após injeção de KA com som com o período sem som do segundo dia ($p = 0,0192$). Na comparação entre grupos [$F(7,42) = 1,748$; $p = 0,1239$], há uma menor coerência no segundo dia de registro no silêncio do grupo salina em relação ao mesmo período do grupo KA ($p = 0,0028$).

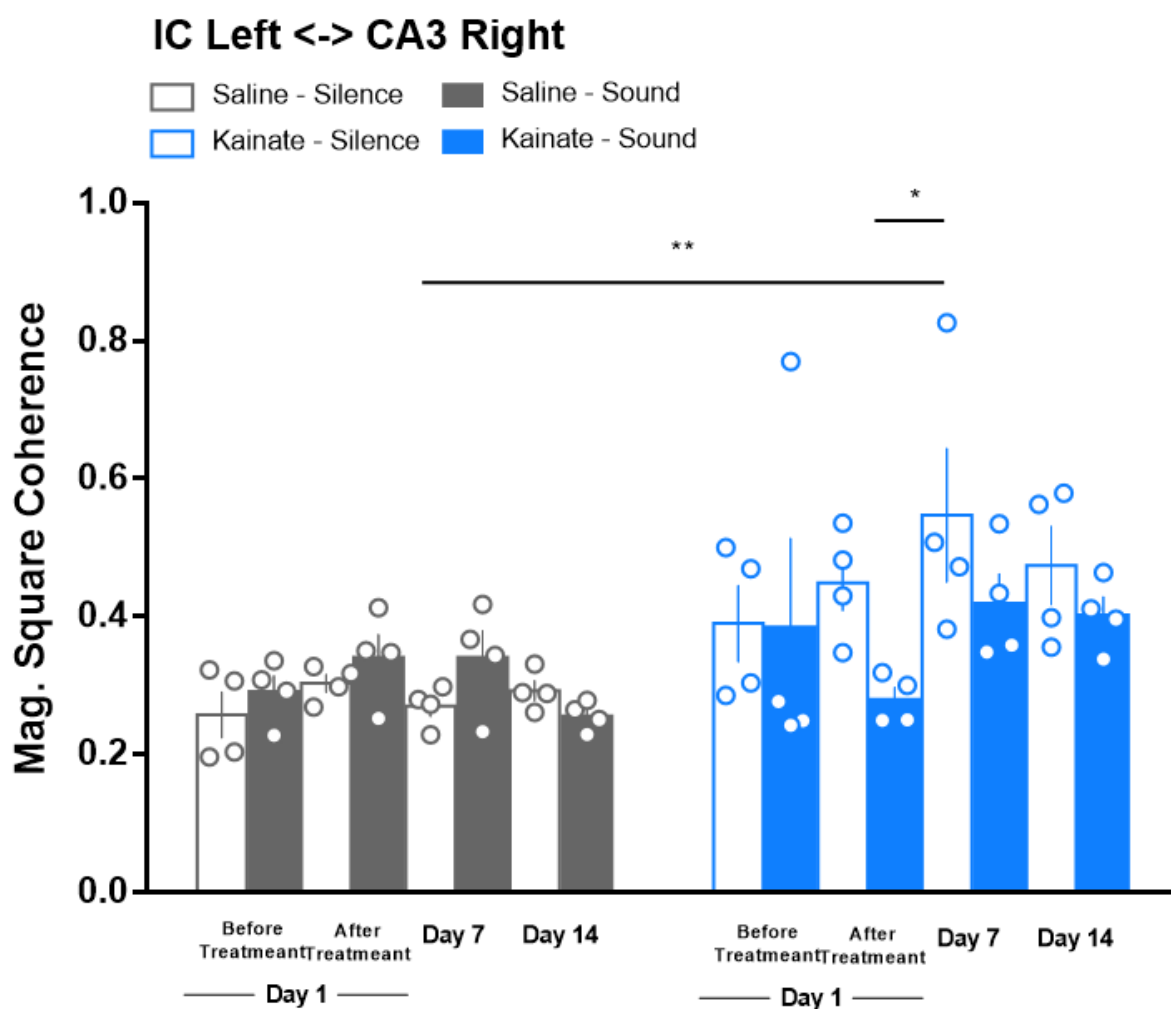


Figura 23: Coerência entre colículo inferior esquerdo e CA3 direito em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (* $p < 0,05$).

A coerência entre colículo inferior esquerdo e amígdala esquerda na frequência da moduladora (figura 24) não apresentou diferenças estatísticas intra ou intergrupos [$F(7,42) = 1,276$; $p = 0,2852$].

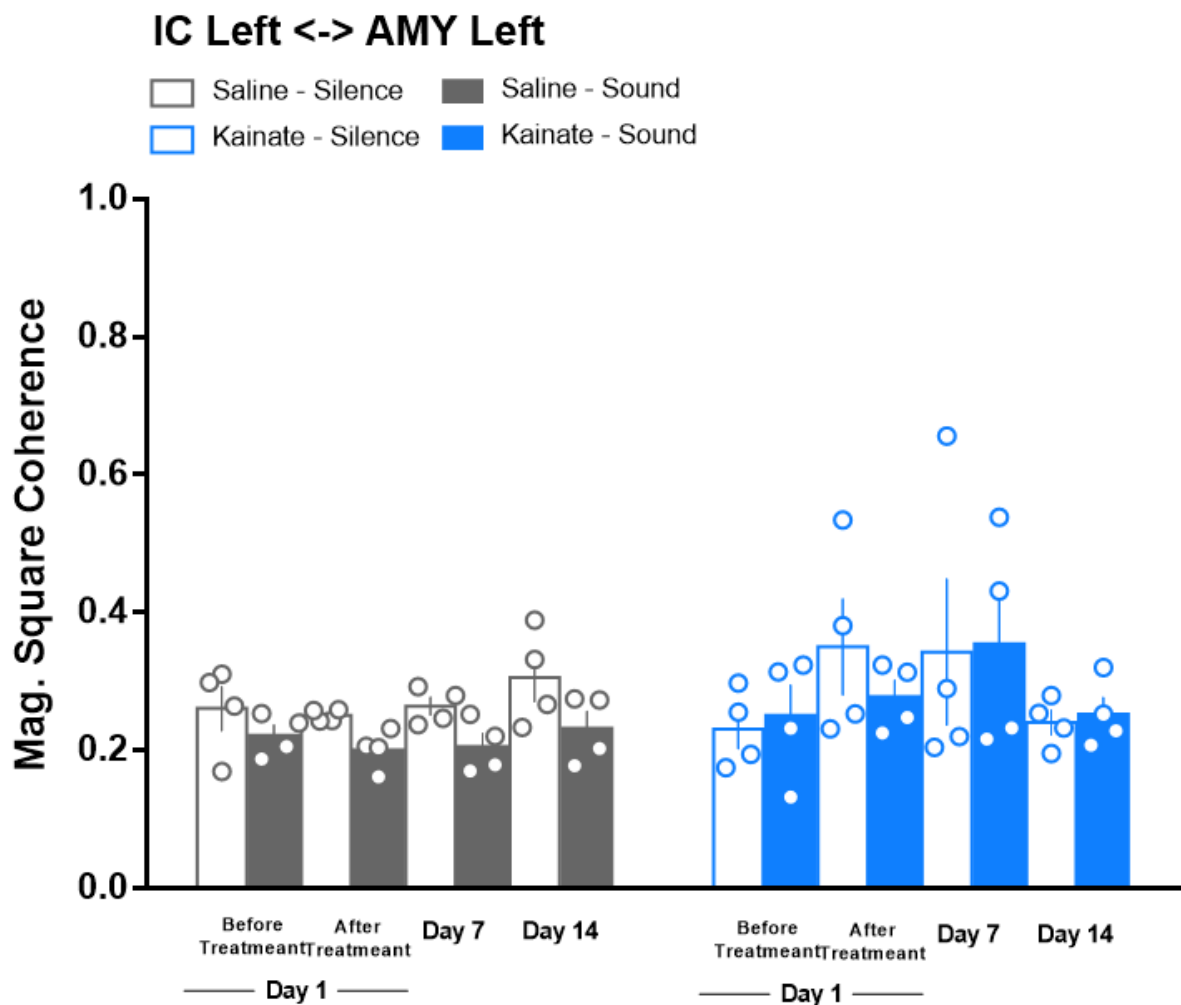


Figura 24: Coerência entre colículo inferior esquerdo e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

A análise da coerência na frequência de 53,71 Hz entre colículo inferior esquerdo e amígdala direita (figura 25) mostra um aumento da coerência no grupo KA entre o primeiro dia de registro com som antes da injeção com o período de silêncio após a injeção ($p = 0,0507$), o período de silêncio do segundo dia de registro ($p = 0,0059$) e o período de silêncio do terceiro dia de registro ($p = 0,0413$). Além disso, há uma redução da coerência no terceiro dia de registro com som em relação ao segundo dia de registro no silêncio ($p = 0,0246$). Não há diferença estatística entre grupos [$F(7,42) = 1,284$; $p = 0,2815$].

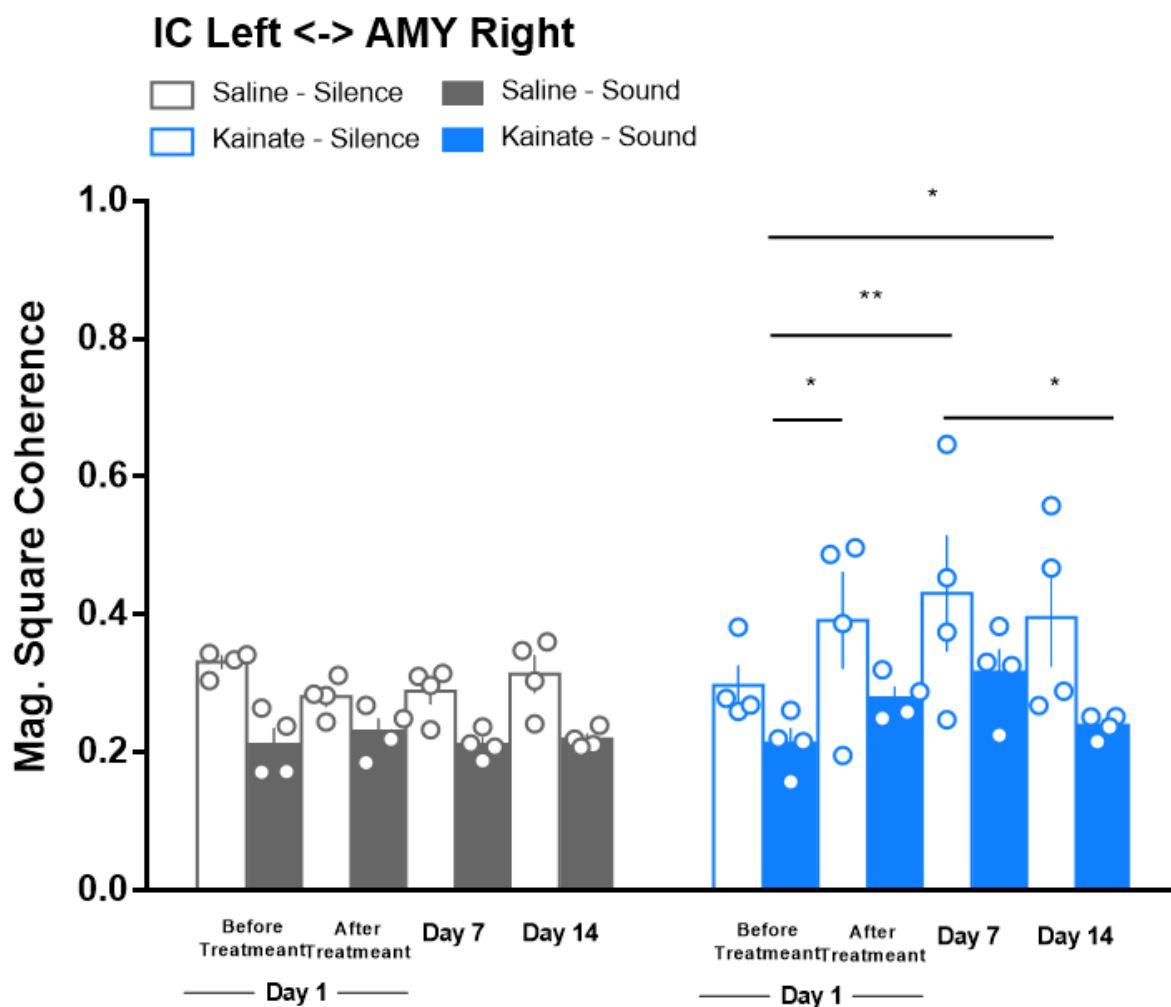


Figura 25: Coerência entre colículo inferior esquerdo e amígdala direita em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

A análise da coerência na frequência da moduladora entre colículo inferior direito e o som (figura 26) mostrou aumento da coerência na vigência de som em relação ao mesmo período sem som do grupo salina nos seguintes momentos: antes da injeção de salina ($p = 0,007$), após a injeção de salina ($p < 0,0001$), segundo dia de registro ($p = 0,0002$), terceiro dia ($p < 0,0001$).

Em relação ao grupo KA na figura 26, há um aumento da coerência na vigência de som em relação ao mesmo período sem som nos seguintes momentos: antes da injeção de KA ($p = 0,0301$), no segundo dia de registro ($p = 0,0001$) e no

terceiro dia de registro ($p < 0,0001$). Ainda em relação ao grupo KA, não houve diferença estatisticamente significativa entre o período após a injeção no primeiro dia na presença e ausência de som ($p = 0,4079$), o que é semelhante ao resultado encontrado no lado contralateral (figura 20) provavelmente devido ao recrutamento anormal de populações neurais envolvidas com o processamento normal cerebral na região do colículo inferior direito durante o status epilepticus (KHAMBHATI *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2017; SILVA, FERNANDO LOPES DA *et al.*, 2003). Há uma tendência a um aumento da coerência no segundo dia de registro na presença de som em relação ao primeiro dia após injeção na presença de som ($p = 0,1181$) no grupo KA. O primeiro dia após a injeção de KA na presença de som apresenta uma coerência menor que no terceiro dia de registro na presença de som ($p = 0,0062$) o que pode ocorrer devido a uma redução da modulação de cima para baixo após a injeção de KA (ANDERSON; MALMIERCA, 2013; SUN *et al.*, 2007).

Na comparação entre grupos [$F(7,42) = 1,567$; $p = 0,1720$] da figura 26 há diferença estatisticamente significativa entre o período após injeção com som entre os grupos salina e KA ($p = 0,008$), provavelmente devido ao status epilepticus no grupo KA nesse período.

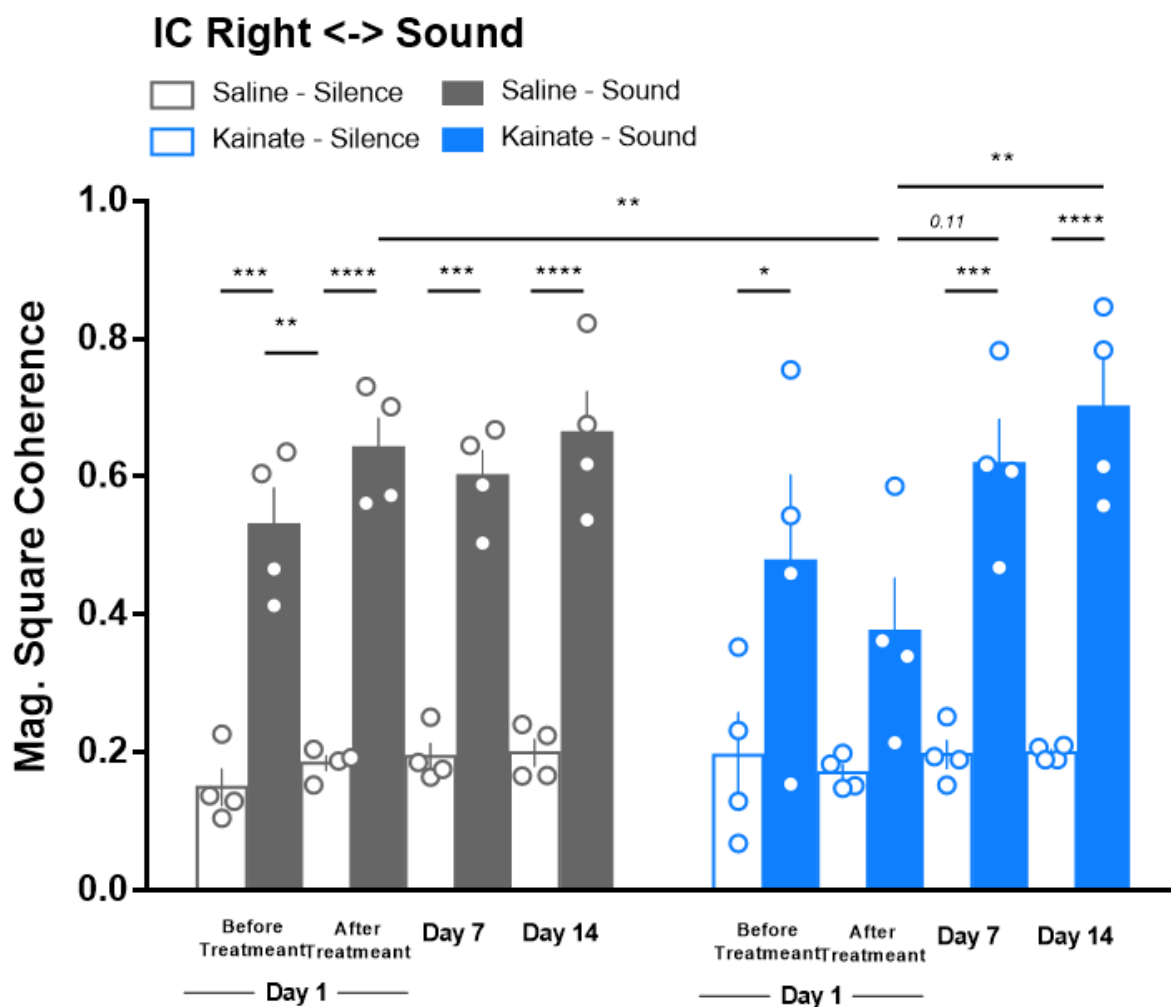


Figura 26: Coerência entre colículo inferior direito e o som em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

A coerência entre colículo inferior direito e CA3 esquerdo na frequência da moduladora (figura 27) não apresentou diferenças estatísticas intra ou intergrupos [F(7,42) = 0,7464; $p = 0,6344$].

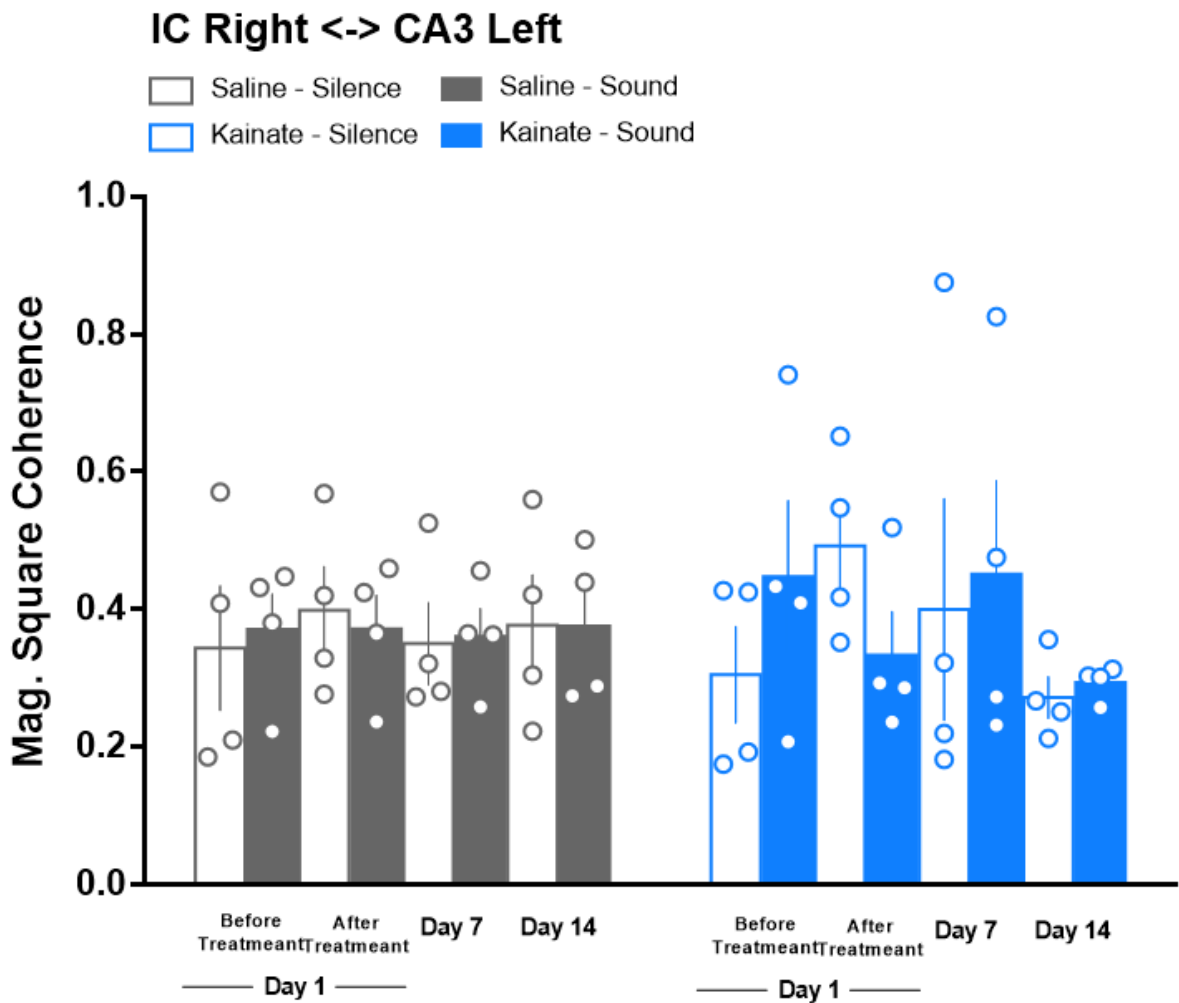


Figura 27: Coerência entre colículo inferior direito e CA3 esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

A coerência no grupo KA entre colículo inferior direito e CA3 direito (figura 28) na frequência de 53,71 Hz aumenta no segundo dia de registro na presença ($p = 0,1257$) e ausência de som ($p = 0,0120$) em relação ao período do primeiro dia após injeção de KA com som. Na comparação entre grupos [$F(7,42) = 1,850$; $p = 0,1028$], a coerência no período com som do segundo dia de registro do grupo KA é maior do que o no mesmo período no grupo salina ($p = 0,0086$).

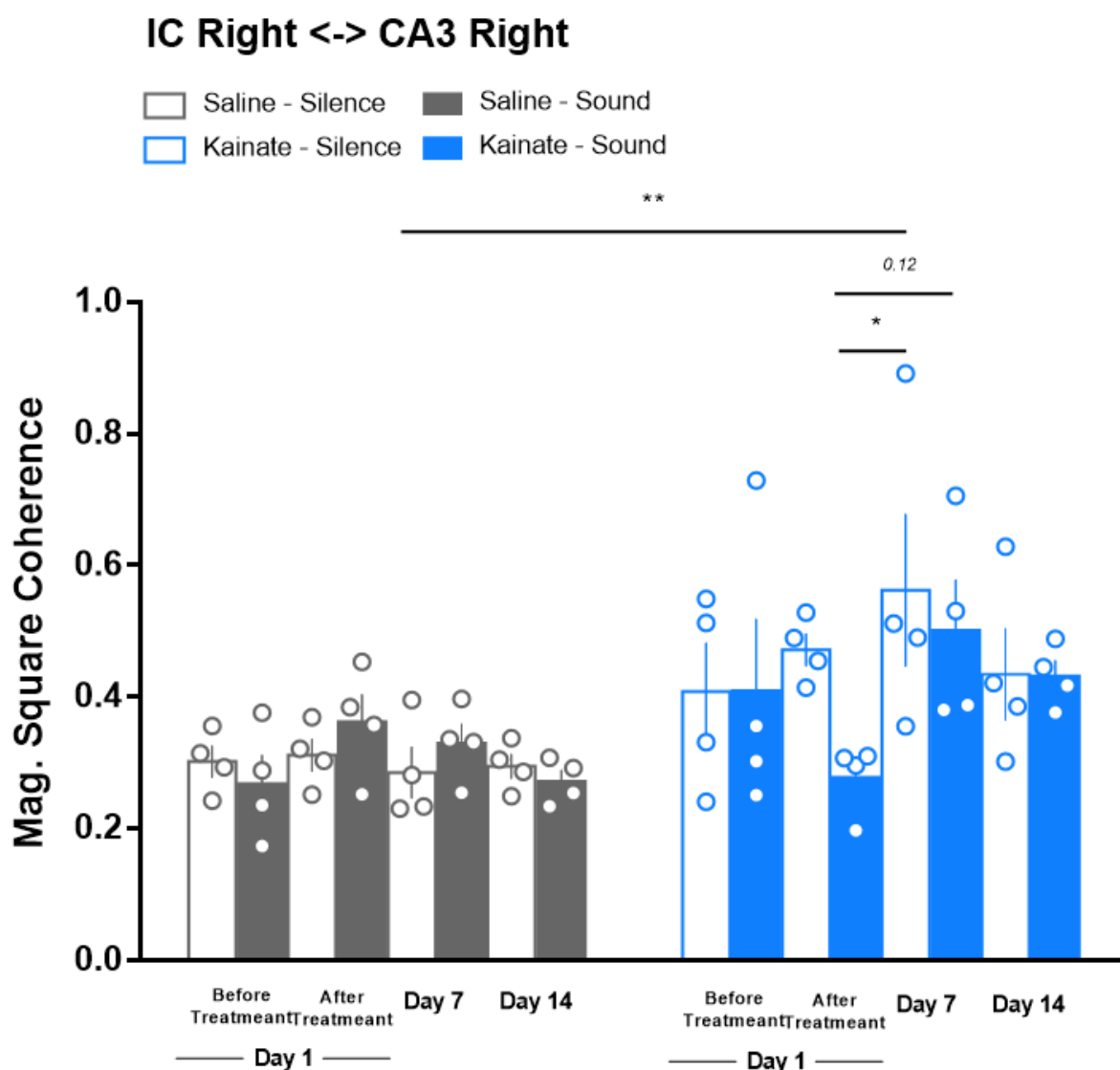


Figura 28: Coerência entre colículo inferior direito e CA3 direito em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Na análise de coerência intragrupos e intergrupos entre colículo inferior direito e amígdala esquerda (figura 29) na frequência da moduladora não há diferenças estatísticas [$F(7,42) = 1,478$; $p = 0,2012$].

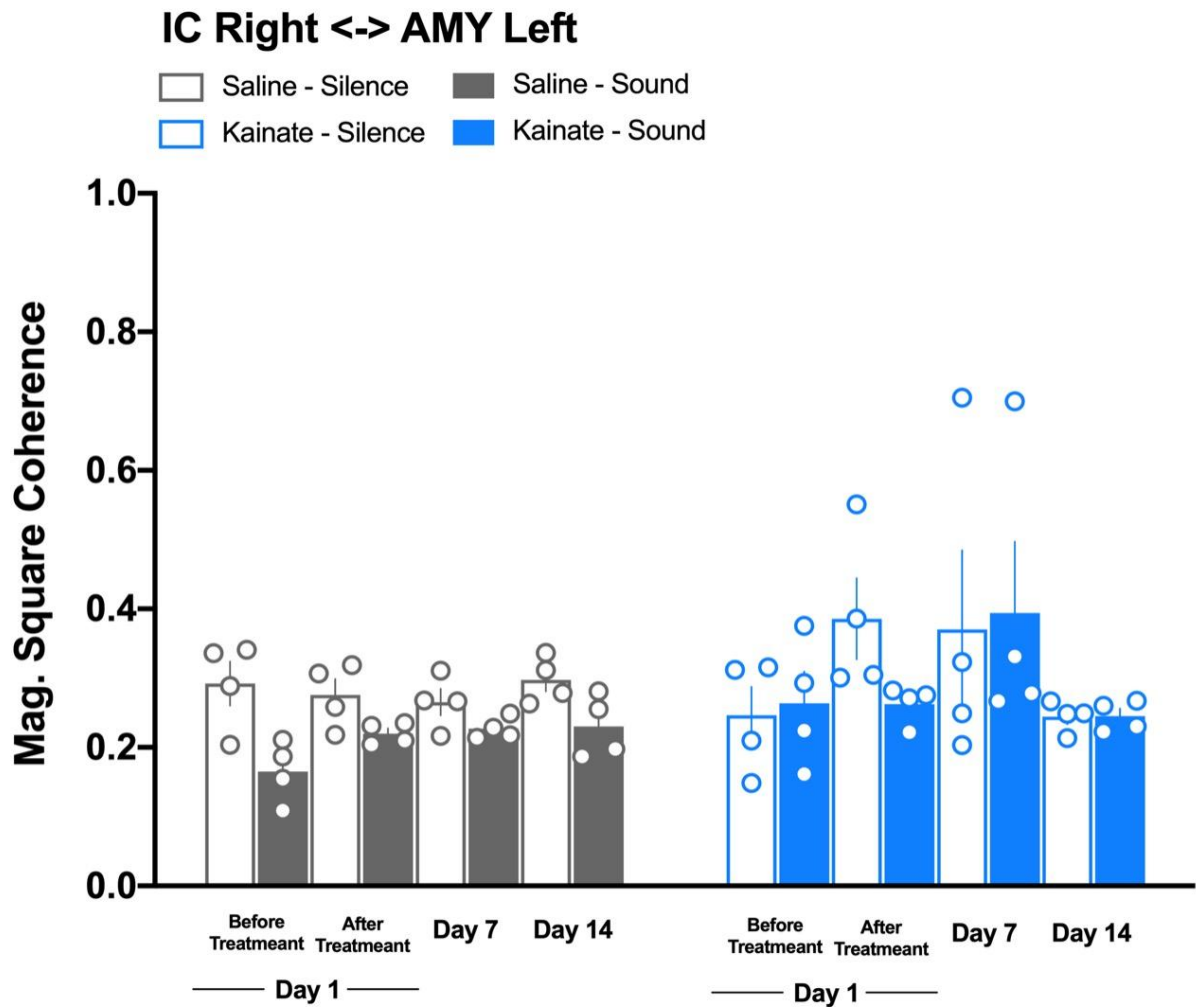


Figura 29: Coerência entre colículo inferior direito e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

Na análise de coerência intragrupos e intergrupos entre colículo inferior direito e amígdala direita (figura 30) na frequência da moduladora não há diferenças estatísticas [$F(7,42) = 1,214$; $p = 0,3167$].

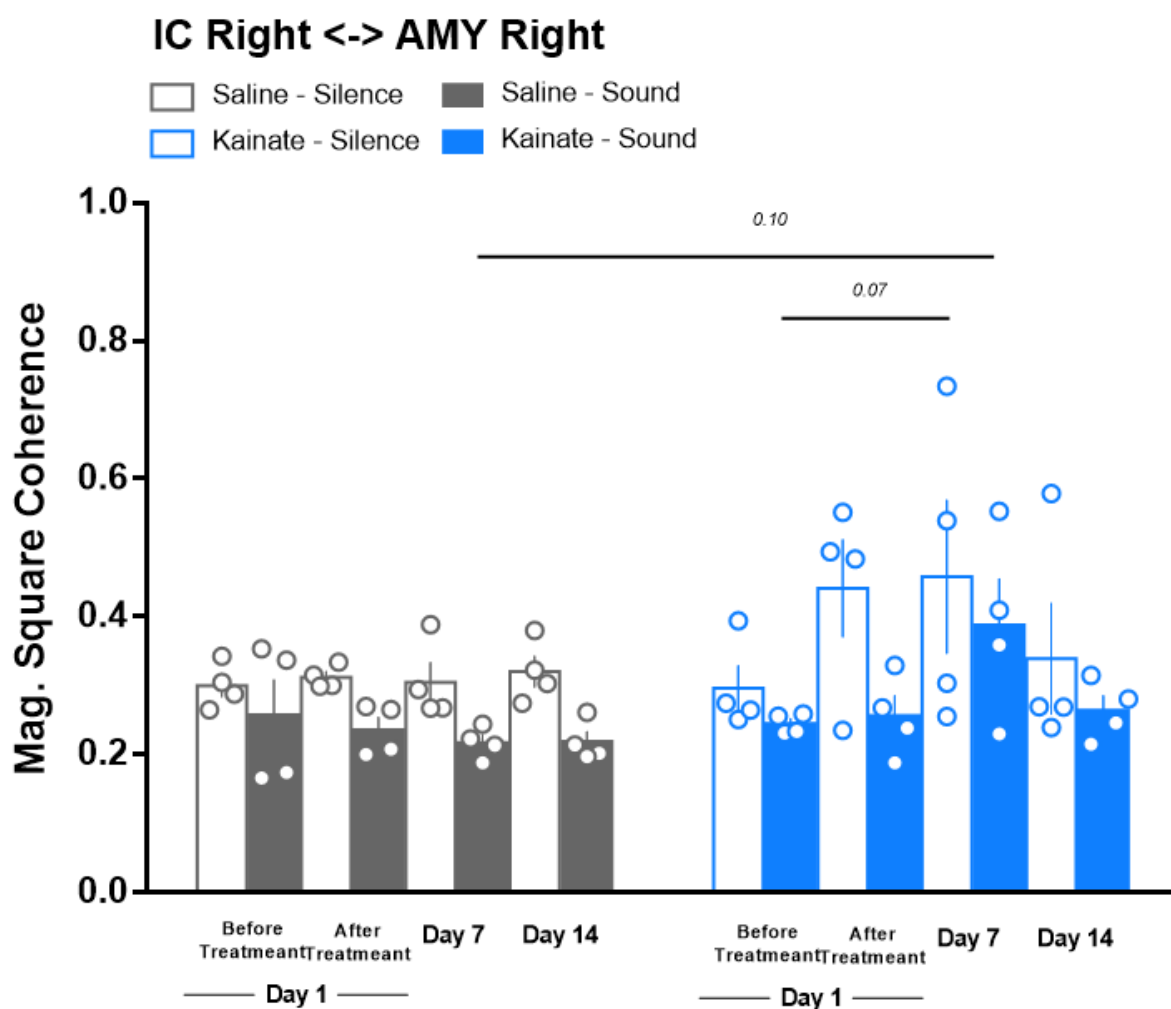


Figura 30: Coerência entre colículo inferior direito e amígdala direita em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

A coerência entre CA3 direito e esquerdo na frequência da moduladora (figura 31) não apresentou diferenças estatísticas intra ou intergrupos [$F(7,42) = 0,5756$; $p = 0,7716$].

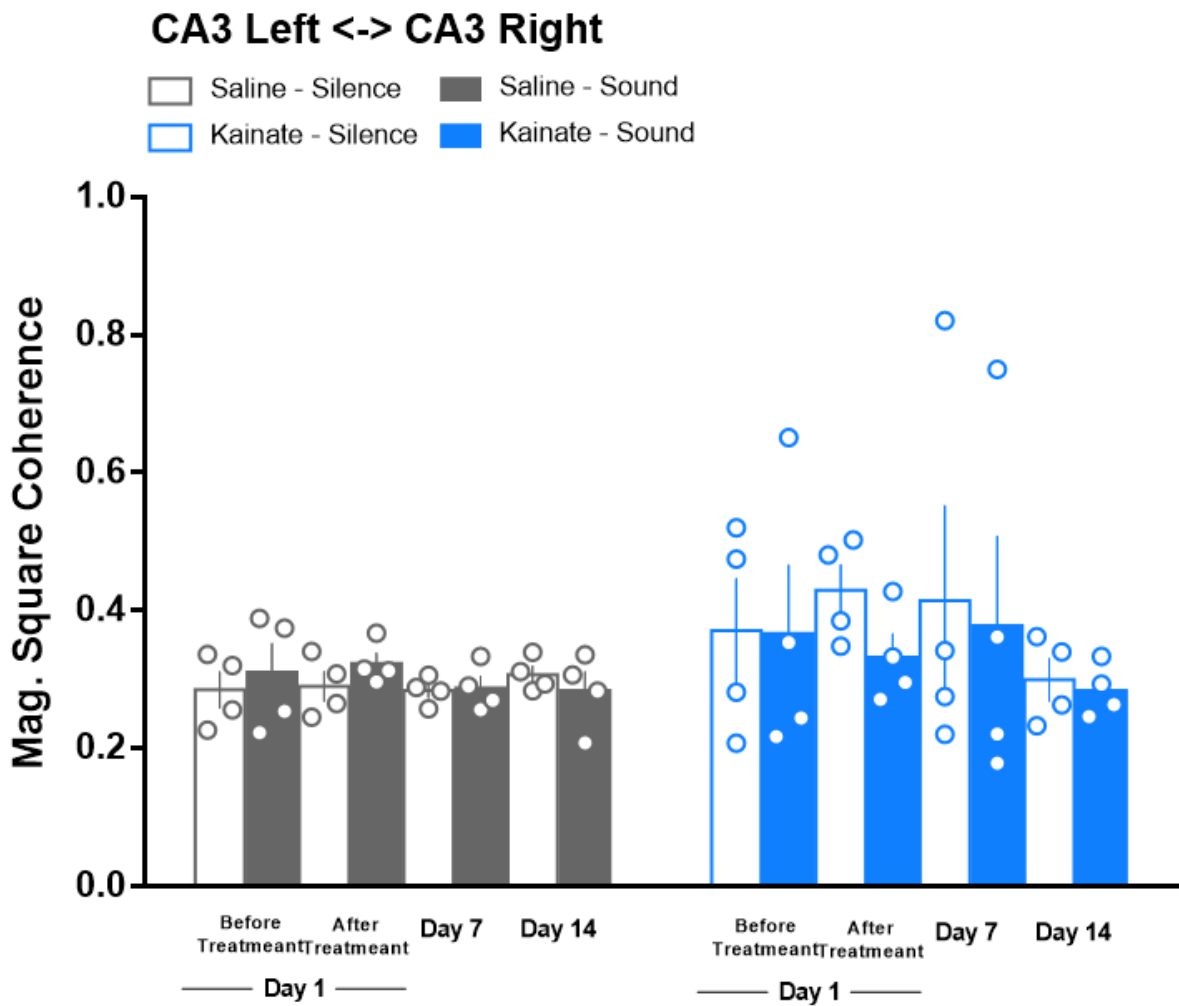


Figura 31: Coerência entre CA3 direito e esquerdo em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

Na análise de coerência intragrupos e intergrupos entre CA3 esquerdo e amígdala esquerda (figura 32) na frequência da moduladora não há diferenças estatísticas [$F(7,42) = 1,372$; $p = 0,2422$]. Pode-se perceber uma tendência a uma maior coerência no período após injeção sem som do grupo KA em relação ao mesmo período do grupo salina ($p = 0,0542$).

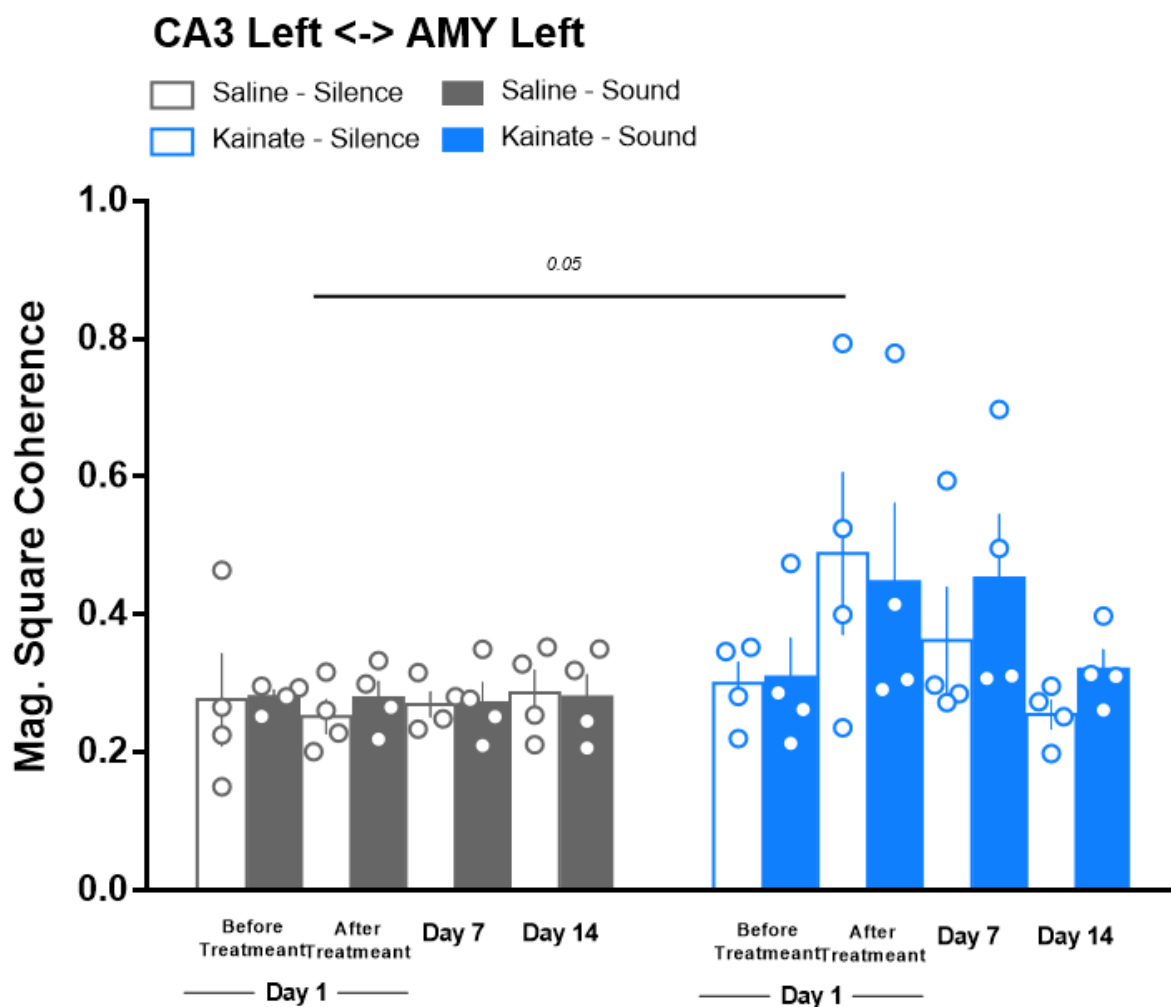


Figura 32: Coerência entre CA3 esquerdo e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

A coerência entre CA3 esquerdo e amígdala direita na frequência da moduladora (figura 33) não apresentou diferenças estatísticas intra ou intergrupos [$F(7,42) = 1,017$; $p = 0,4337$].

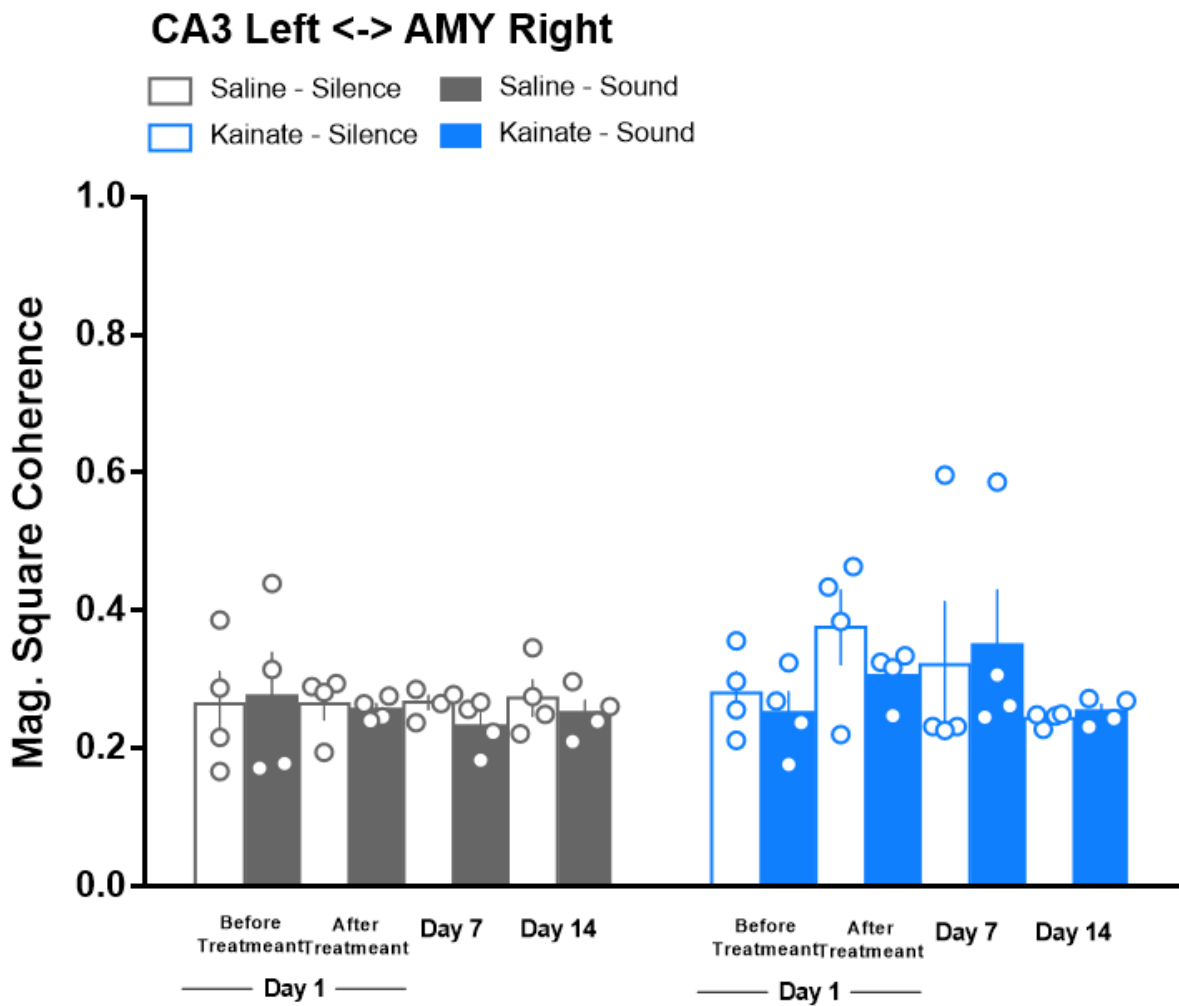


Figura 33: Coerência entre CA3 esquerdo e amígdala direita em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

Na análise de coerência intragrupos e intergrupos entre CA3 direito e amígdala esquerda (figura 34) na frequência da moduladora não há diferenças estatísticas [$F(7,42) = 1,109$; $p = 0,3757$].

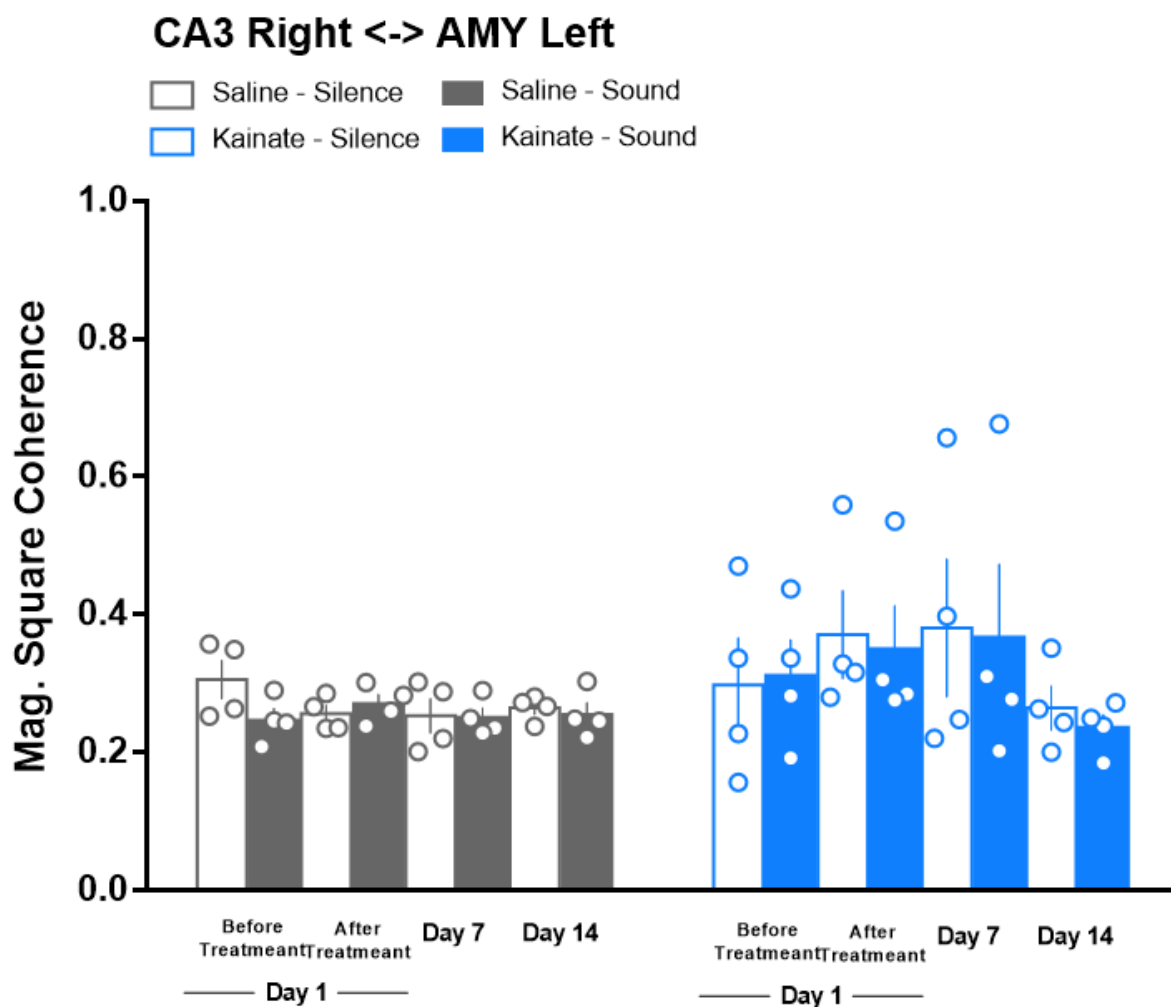


Figura 34: Coerência entre CA3 direito e amígdala esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

A coerência entre CA3 direito e amígdala direita na frequência da moduladora (figura 35) não apresentou diferenças estatísticas intra ou intergrupos [F (7,42) = 0,6899; $p = 0,68$].

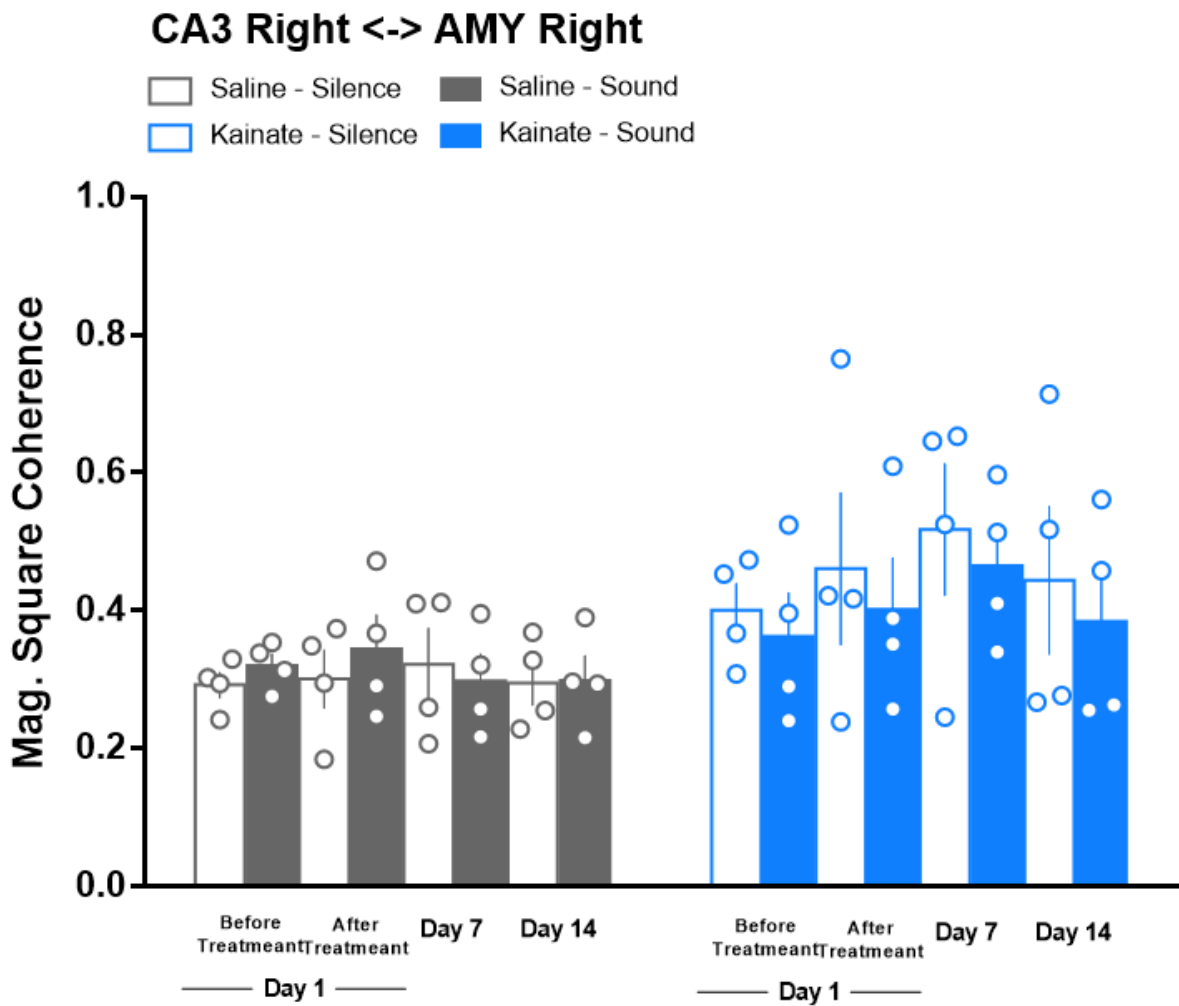


Figura 35: Coerência entre CA3 direito e amígdala direita em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

Na análise de coerência intragrupos e intergrupos entre amígdalas direita e esquerda (figura 36) na frequência da moduladora não há diferenças estatísticas [$F(7,42) = 1,609$; $p = 0,1595$].

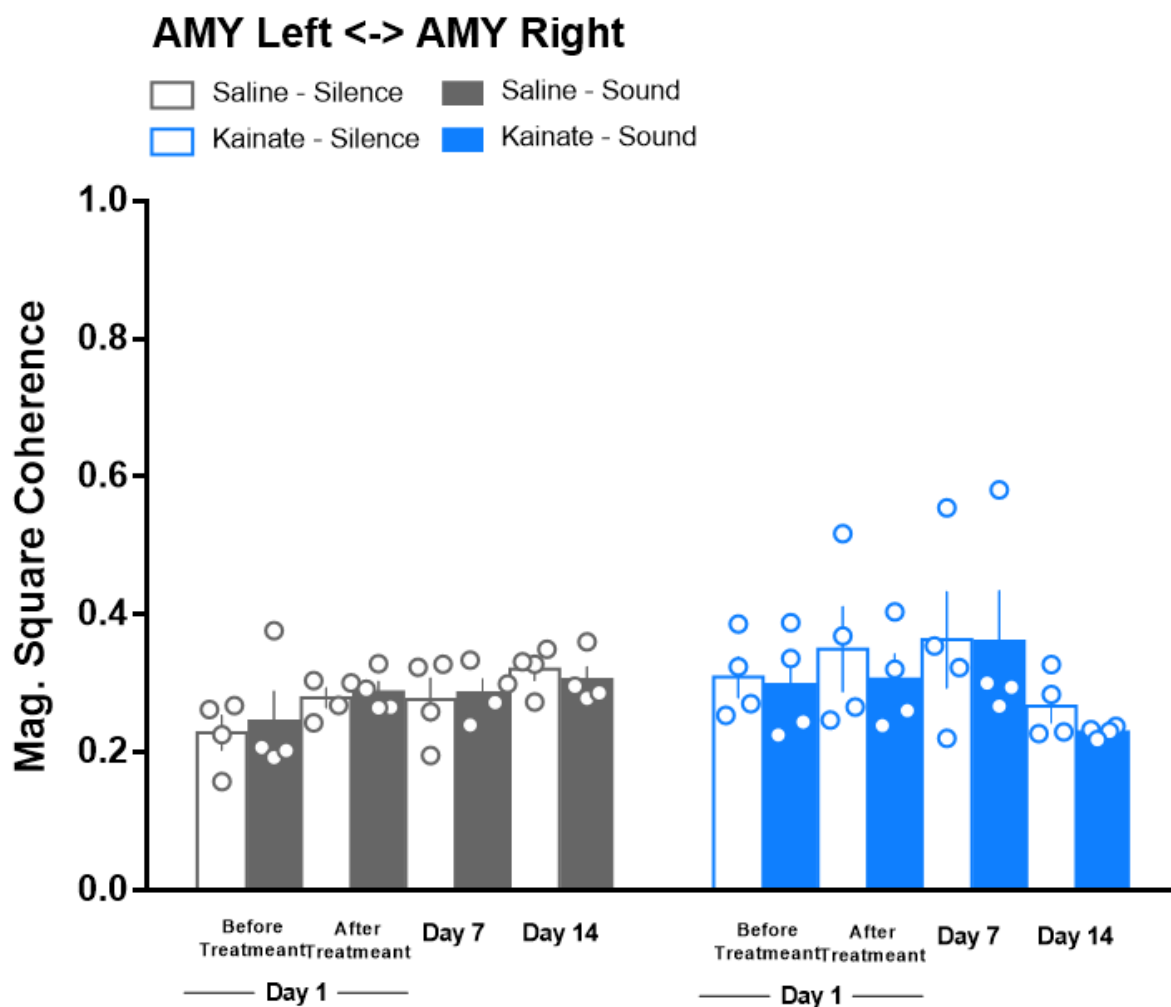


Figura 36: Coerência entre amígdalas direita e esquerda em 53,71 Hz no grupo salina e KA com e sem estímulo sonoro no segundo e terceiro dias de registro e antes e depois da injeção no primeiro dia. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas.

6. Discussão

O presente trabalho conseguiu replicar o modelo animal de epilepsia de lobo temporal utilizando KA conforme descrito em outros trabalhos (BRAGIN, ANATOL *et al.*, 2005; RATTKA; BRANDT; LÖSCHER, 2013) com todos os animais do grupo KA apresentando crises convulsivas comportamentais e crises eletrográficas após a injeção. A injeção de KA foi responsável por uma alteração eletrográfica inicial em CA3 direito com posterior acometimento de todas as outras estruturas estudadas (colículos inferiores, CA3 esquerdo, amígdalas). Apesar da lesão em CA3 direito, as crises convulsivas se iniciaram nem sempre em CA3 durante o status epilepticus o que mostra que um insulto inicial em uma região cerebral pode ser suficiente para modificar a dinâmica cerebral a ponto das novas convulsões se iniciarem em locais distintos conforme já discutido em outro trabalho (BERTRAM, 2013).

Com esse modelo animal foi possível identificar uma mudança do processamento cerebral por meio da análise da ASSR. No período da ictogênese houve um aumento da ASSR em CA3 direito e nas amígdalas sem alterações em colículos e em CA3 esquerdo. Essa mudança encontrada se difere do trabalho de PINTO *et al.*, 2017 que mostrou um aumento da energia da ASSR em colículo inferior durante o período ictal, porém o trabalho foi realizado em animais WAR que são animais geneticamente selecionados que apresentam epilepsia reflexa ao receberem estímulos auditivos acima de 110 dB. Além disso, o trabalho citado não fez registros em CA3 nem em amígdala para comparação, porém pode-se supor que devido aos diferentes modelos, um de epilepsia reflexa e outro partindo de animais previamente hígidos, os sítios envolvidos como foco epilético e circuito de iniciação seriam diferentes baseados nas diferentes respostas entre os dois modelos. O modelo utilizado neste trabalho se aproxima mais das situações encontradas na clínica em que a maioria das epilepsias de lobo temporal são de caráter esporádico e não hereditário (TSUBOI; ENDO, 1977).

No processo de epileptogênese, há um rearranjo das redes neurais não só no local do insulto com KA, mas também à distância em outras regiões (SHEYBANI *et al.*, 2018; SPENCER, 2002). As modificações nas redes neurais após a injeção de KA incluem alterações da microglia, aumento da cascata inflamatória, neurodegeneração e perda da inibição das células granulosas (BENSON;

MANZANERO; BORGES, 2015; SLOVITER, 1991) que culminam nas alterações eletrográficas vistas no presente trabalho. A análise dos resultados evidencia um aumento progressivo da energia da ASSR no colículo ipsilateral a lesão ao longo das semanas o que pode ocorrer por uma diminuição da modulação de cima para baixo após a lesão de CA3 direito (ANDERSON; MALMIERCA, 2013; SUN *et al.*, 2007). É sabido, por exemplo, que o colículo inferior está sob modulação de cima para baixo tanto do córtex auditivo quanto da amígdala que são estruturas comprometidas na epilepsia de lobo temporal (ANDERSON; MALMIERCA, 2013; NOBRE; BRANDÃO, 2011). Em um estudo recente foi demonstrado que a inibição da amígdala basolateral com muscimol reduz o freezing associado ao condicionamento ao medo e que a amígdala exerce uma modulação tônica sobre a codificação da informação sensorial em colículo inferior (SIMÕES *et al.*, 2020) o que poderia explicar o aumento da ASSR nesta região encontrado no terceiro dia de registro neste trabalho já que a amígdala está acometida na TLE (BERNASCONI *et al.*, 2003). O resultado deste trabalho mostra de maneira inédita que mesmo regiões não sabidamente acometidas no processo de epileptogênese na TLE como, por exemplo, o colículo inferior (BERNASCONI *et al.*, 2003; BERNHARDT *et al.*, 2012; BONILHA *et al.*, 2006), podem apresentar alterações funcionais como no processamento sensorial. Até o presente momento, não é do nosso conhecimento a descrição de um acometimento funcional de estruturas tão caudais ao lobo temporal como o colículo inferior no mesencéfalo em um modelo focal de TLE. Assim, as alterações funcionais na TLE podem ser mais profundas do que antes imaginado e a SSR pode auxiliar na detecção de tais alterações.

A lesão em CA3 direito foi capaz de reduzir a ASSR no segundo dia de registro em relação ao período pré-injeção o que pode ter ocorrido devido a perda neuronal causada pelo KA além das alterações inflamatórias que se seguem após o insulto (BENSON; MANZANERO; BORGES, 2015). De forma oposta, CA3 esquerdo apresenta um aumento da energia da ASSR no segundo dia de registro, talvez em uma tentativa de compensar a disfunção do lado contralateral.

O presente trabalho utilizou a ASSR em modelo animal de epilepsia temporal não hereditária para avaliar a dinâmica de processamento cerebral no período ictal e interictal, mostrando que, assim como no trabalho de PINTO *et al.*, 2017, há uma

alteração de sincronismo entre áreas cerebrais. Essa alteração da conectividade entre áreas persiste após a primeira crise epiléptica e aumenta ao longo das semanas após o insulto inicial. Esse aumento do sincronismo facilita a ocorrência de novas crises (KHAMBHATI *et al.*, 2015) e, se provado ser o aumento de conectividade uma propriedade geral das epilepsias, pode ser utilizado como um novo alvo farmacológico para novos tratamentos medicamentosos ou novos métodos diagnósticos (PINTO *et al.*, 2017). Nesse sentido a ASSR permite a avaliação do sincronismo entre áreas em tempo real por meio da sondagem ativa das redes neurais e pode ser uma ferramenta que contribua para o diagnóstico de epilepsia.

Em relação a lateralidade das crises, a energia da ASSR apresentou resultados que diferem dependendo da região estudada. Em geral, o colículo inferior ipsilateral a lesão apresentou um aumento da energia e CA3 direito uma diminuição da energia no terceiro dia de registro em relação ao período pré-ictal e em relação a estruturas contralaterais. Além disso, houve um aumento de coerência importante entre estruturas ipsilaterais à lesão. Essas alterações sugerem que seria possível prever a lateralidade de uma crise convulsiva utilizando a ASSR, porém são necessários novos estudos com um tamanho amostral maior e com lesões em CA3 esquerdo além da replicação dos resultados deste trabalho para tirar conclusões definitivas.

O protocolo experimental foi realizado com vinte animais, porém houve redução do tamanho da amostra devido a animais que perderam capacete, morte súbita, eletrodos soltos, erro de posicionamento de eletrodos, além de contaminação do sinal durante o período de registro. Por esses motivos as análises foram realizadas com quatro animais em cada grupo o que reduziu o poder estatístico e pode explicar tendências encontradas nos dados, porém sem diferença estatisticamente significativa. Novos estudos se fazem necessários para replicar os achados.

7. CONCLUSÕES

As epilepsias são disfunções cerebrais complexas e de difícil tratamento como as epilepsias de lobo temporal (FRENCH *et al.*, 1993). Nestas, há uma intensa mudança da dinâmica cerebral com prejuízos funcionais aos pacientes e frequente refratariedade ao tratamento medicamentoso (FRENCH *et al.*, 1993; GIOVAGNOLI; AVANZINI, 1999). Nesse sentido, o estudo das epilepsias de lobo temporal com a sondagem ativa das redes neurais, utilizando a ASSR, permitiu a identificação de alterações no processamento fisiológico do cérebro, não só no momento da crise convulsiva, mas também no período interictal. O presente estudo mostrou que, em modelo animal focal de epilepsia de lobo temporal, após a crise convulsiva inicial há aumento do sincronismo entre redes neurais principalmente ipsilaterais à lesão como em CA3, amígdala e colículo inferior. Além disso, foram detectadas alterações dinâmicas no processamento cerebral auditivo em estruturas tão caudais ao lobo temporal quanto o colículo inferior, provavelmente por inibição da modulação de cima para baixo. Esse aumento do sincronismo no período de epileptogênese, que pode ser detectado pela ASSR, facilita a recorrência de crises convulsivas e tem o potencial de ser utilizado como alvo terapêutico de novas drogas, assim como ferramenta diagnóstica. Novos estudos são necessários para replicação dos dados do presente trabalho, investigação do acometimento do processamento neural de outros sistemas sensoriais assim como investigação do hipersincronismo como uma propriedade geral das epilepsias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKR, Abuhuziefa; WAMBACQ, Ilse. The localizing value of auditory event-related potentials (P300) in patients with medically intractable temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 4, n. 6, p. 692–701, dez. 2003.

AGGLETON, J. P.; BROWN, M. W. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *The Behavioral and brain sciences*, v. 22, n. 3, p. 425–44; discussion 444–89, jun. 1999.

AIZENBERG, Mark; GEFFEN, Maria Neimark. Bidirectional effects of aversive learning on perceptual acuity are mediated by the sensory cortex. *Nature neuroscience*, v. 16, n. 8, p. 994–996, ago. 2013.

AMARAL-JÚNIOR, Paulo Aparecido *et al.* A Custom Microcontrolled and Wireless-Operated Chamber for Auditory Fear Conditioning. *Frontiers in Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.01193>>. , 2019

ANDERSON, L. A.; MALMIERCA, M. S. The effect of auditory cortex deactivation on stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the rat. *The European journal of neuroscience*, v. 37, n. 1, p. 52–62, jan. 2013.

ARONIADOU-ANDERJASKA, Vassiliki *et al.* Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Research*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.11.011>>. , 2008

BABB, T. L. *et al.* Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90380-7](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(91)90380-7)>. , 1991

BASU, Jayeeta; SIEGELBAUM, Steven A. The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 11, 2 nov. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021733>>.

BEENHAKKER, Mark P.; HUGUENARD, John R. Neurons that fire together also conspire together: is normal sleep circuitry hijacked to generate epilepsy? *Neuron*, v. 62, n. 5, p. 612–632, 11 jun. 2009.

BELL, Brian D. *et al.* Visual and auditory naming in patients with left or bilateral temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, v. 55, n. 1-2, p. 29–37, jun. 2003.

BENSON, Melissa J.; MANZANERO, Silvia; BORGES, Karin. Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. *Epilepsia*, v. 56, n. 6, p. 895–905, jun. 2015.

BERNASCONI, N. *et al.* Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain: a journal of neurology*, v. 126, n. Pt 2, p. 462–469, fev. 2003.

BERNHARDT, Boris C. *et al.* Mapping thalamocortical network pathology in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, v. 78, n. 2, p. 129–136, 10 jan. 2012.

BERTRAM, Edward H. Neuronal circuits in epilepsy: do they matter? *Experimental*

neurology, v. 244, p. 67–74, jun. 2013.

BOATMAN, Jeffrey A.; KIM, Jeansok J. A thalamo-cortico-amygdala pathway mediates auditory fear conditioning in the intact brain. *The European journal of neuroscience*, v. 24, n. 3, p. 894–900, ago. 2006.

BONILHA, Leonardo *et al.* Gray matter atrophy associated with duration of temporal lobe epilepsy. *NeuroImage*, v. 32, n. 3, p. 1070–1079, set. 2006.

BRAGIN, Anatol *et al.* Analysis of chronic seizure onsets after intrahippocampal kainic acid injection in freely moving rats. *Epilepsia*, v. 46, n. 10, p. 1592–1598, out. 2005.

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.

BUZSÁKI, György. *Rhythms of the Brain*. . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195301069.001.0001>>. , 2006

BUZSÁKI, György; ANASTASSIOU, Costas A.; KOCH, Christof. The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 13, n. 6, p. 407–420, 18 maio 2012.

CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 15, n. 3 Pt 2, p. 2312–2327, mar. 1995.

CASTRO, Gabriel Perfeito *et al.* Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 71, n. Pt B, p. 243–249, jun. 2017.

CHAMBERLIN, N. L.; DINGLELINE, R. GABAergic inhibition and the induction of spontaneous epileptiform activity by low chloride and high potassium in the hippocampal slice. *Brain research*, v. 445, n. 1, p. 12–18, 29 mar. 1988.

CHAVEZ, Candice M.; MCGAUGH, James L.; WEINBERGER, Norman M. Activation of the basolateral amygdala induces long-term enhancement of specific memory representations in the cerebral cortex. *Neurobiology of learning and memory*, v. 101, p. 8–18, mar. 2013.

CHAVEZ, Candice M.; MCGAUGH, James L.; WEINBERGER, Norman M. The basolateral amygdala modulates specific sensory memory representations in the cerebral cortex. *Neurobiology of learning and memory*, v. 91, n. 4, p. 382–392, maio 2009.

COHEN, Mike X. *Analyzing Neural Time Series Data: Theory and Practice*. [S.l.]: MIT Press, 2014.

CRONIN, J. *et al.* Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of the mossy fibers. *Brain research*, v. 573, n. 2, p. 305–310, 28 fev. 1992.

DAVIS, Michael. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. *The amygdala*, v. 2, p. 213–287, 2000.

DE CURTIS, M.; AVANZINI, G. Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Progress in*

neurobiology, v. 63, n. 5, p. 541–567, abr. 2001.

DU, F. *et al.* Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, v. 16, n. 3, p. 223–233, dez. 1993.

ECKHORN, R. *et al.* Coherent oscillations: A mechanism of feature linking in the visual cortex? *Biological cybernetics*, v. 60, n. 2, p. 121–130, 1 dez. 1988.

ENGEL, A. K.; FRIES, P.; SINGER, W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 2, n. 10, p. 704–716, out. 2001.

ENGEL, Jerome. *A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. Epilepsia*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.10401.x>>. , 2001

ENGEL, Jerome. *Introduction to temporal lobe epilepsy. Epilepsy Research*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0920-1211\(96\)00043-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0920-1211(96)00043-5)>. , 1996

EUSTON, David R.; TATSUNO, Masami; MCNAUGHTON, Bruce L. Fast-forward playback of recent memory sequences in prefrontal cortex during sleep. *Science*, v. 318, n. 5853, p. 1147–1150, 16 nov. 2007.

FALCONER, M. A.; SERAFETINIDES, E. A.; CORSELLIS, J. A. N. *Etiology and Pathogenesis of Temporal Lobe Epilepsy. Archives of Neurology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/archneur.1964.00460150003001>>. , 1964

FISHER, Robert 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.

FISHER, Robert S. *et al.* ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, v. 55, n. 4, p. 475–482, abr. 2014.

FISHER, Robert S. *et al.* Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, v. 58, n. 4, p. 522–530, abr. 2017.

FRENCH, J. A. *et al.* Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Annals of neurology*, v. 34, n. 6, p. 774–780, dez. 1993.

GALLAGHER, M.; CHIBA, A. A. The amygdala and emotion. *Current opinion in neurobiology*, v. 6, n. 2, p. 221–227, abr. 1996.

GAZZOLA, Deana M.; BALCER, Laura J.; FRENCH, Jacqueline A. Seizure-free outcome in randomized add-on trials of the new antiepileptic drugs. *Epilepsia*, v. 48, n. 7, p. 1303–1307, 2007.

GILBERT, Charles D.; SIGMAN, Mariano. *Brain States: Top-Down Influences in Sensory Processing. Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.019>>. , 2007

GIOVAGNOLI, A. R.; AVANZINI, G. Learning and memory impairment in patients with temporal lobe epilepsy: relation to the presence, type, and location of brain lesion. *Epilepsia*, v. 40, n. 7, p. 904–911, jul. 1999.

HAMBERGER, M. J.; TAMNY, T. R. Auditory naming and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, v. 35, n. 3, p. 229–243, jul. 1999.

HYAFIL, Alexandre *et al.* Neural Cross-Frequency Coupling: Connecting Architectures, Mechanisms, and Functions. *Trends in neurosciences*, v. 38, n. 11, p. 725–740, nov. 2015.

JIRUSKA, Premysl *et al.* High-frequency network activity, global increase in neuronal activity, and synchrony expansion precede epileptic seizures in vitro. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 30, n. 16, p. 5690–5701, 21 abr. 2010.

JOKEIT, H.; EBNER, A. Long term effects of refractory temporal lobe epilepsy on cognitive abilities: a cross sectional study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, v. 67, n. 1, p. 44–50, jul. 1999.

KAAS, J. H.; HACKETT, T. A. Subdivisions of auditory cortex and processing streams in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 22, p. 11793–11799, 24 out. 2000.

KHAMBHATI, Ankit N. *et al.* Dynamic Network Drivers of Seizure Generation, Propagation and Termination in Human Neocortical Epilepsy. *PLoS computational biology*, v. 11, n. 12, p. e1004608, dez. 2015.

KLEE, Rebecca *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, 2017.

KÖNIG, P.; ENGEL, A. K. Correlated firing in sensory-motor systems. *Current opinion in neurobiology*, v. 5, n. 4, p. 511–519, ago. 1995.

KORZENIEWSKA, A. *et al.* Ictal propagation of high frequency activity is recapitulated in interictal recordings: effective connectivity of epileptogenic networks recorded with intracranial EEG. *NeuroImage*, v. 101, p. 96–113, 1 nov. 2014.

KRAMER, M. A. *et al.* Human seizures self-terminate across spatial scales via a critical transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1210047110>>. , 2012

LACHAUX, J. P. *et al.* Measuring phase synchrony in brain signals. *Human brain mapping*, v. 8, n. 4, p. 194–208, 1999.

LAURBERG, S.; SØRENSEN, K. E. Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain research*, v. 212, n. 2, p. 287–300, 18 maio 1981.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*, v. 23, p. 155–184, 2000.

MALMIERCA, Manuel S. *et al.* A discontinuous tonotopic organization in the inferior colliculus of the rat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 28, n. 18, p. 4767–4776, 30 abr. 2008.

MATSUMOTO, H.; MARSAN, C. A. CORTICAL CELLULAR PHENOMENA IN EXPERIMENTAL EPILEPSY: INTERICTAL MANIFESTATIONS. *Experimental neurology*, v.

9, p. 286–304, abr. 1964.

MAYEUX, R. *et al.* Interictal memory and language impairment in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, v. 30, n. 2, p. 120–125, fev. 1980.

MCNAMARA, J. O. *Cellular and molecular basis of epilepsy. The Journal of Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.14-06-03413.1994>>. , 1994

MEDEIROS, Daniel de Castro; MORAES, Márcio Flávio Dutra. Focus on desynchronization rather than excitability: a new strategy for intraencephalic electrical stimulation. *Epilepsy & behavior: E&B*, v. 38, p. 32–36, set. 2014.

MEEREN, H. K. M. *et al.* Auditory evoked potentials from auditory cortex, medial geniculate nucleus, and inferior colliculus during sleep–wake states and spike-wave discharges in the WAG/Rij rat. *Brain research*, v. 898, n. 2, p. 321–331, 20 abr. 2001.

MERZENICH, Michael M.; REID, Miriam D. *Representation of the cochlea within the inferior colliculus of the cat. Brain Research*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90630-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(74)90630-1)>. , 1974

MILNER, B. Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clinical neurosurgery*, v. 19, p. 421–446, 1972.

MOSBAH, Amel *et al.* Clinical, neuropsychological, and metabolic characteristics of transient epileptic amnesia syndrome. *Epilepsia*, v. 55, n. 5, p. 699–706, maio 2014.

NADLER, J. Victor; SPENCER, Dennis D. What is a seizure focus? *Issues in clinical epileptology: a view from the bench*, p. 55–62, 2014.

NADLER, J. V.; PERRY, B. W.; COTMAN, C. W. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain research*, v. 182, n. 1, p. 1–9, 20 jan. 1980.

NELSON, J. I. *et al.* Spatial and temporal coherence in cortico-cortical connections: a cross-correlation study in areas 17 and 18 in the cat. *Visual neuroscience*, v. 9, n. 1, p. 21–37, jul. 1992.

NOBRE, Manoel Jorge; BRANDÃO, Marcus Lira. Modulation of auditory-evoked potentials recorded in the inferior colliculus by GABAergic mechanisms in the basolateral and central nuclei of the amygdala in high- and low-anxiety rats. *Brain research*, v. 1421, p. 20–29, 3 nov. 2011.

ONO, Tomonori; GALANOPOULOU, Aristeia S. *Epilepsy and Epileptic Syndrome. Advances in Experimental Medicine and Biology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_8>. , 2012

PICTON, Terence W. *et al.* *Human Auditory Steady-State Responses: The Effects of Recording Technique and State of Arousal. Anesthesia & Analgesia*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1213/01.ane.0000082994.22466.dd>>. , 2003

PINTO, Hyorrana Priscila Pereira *et al.* Auditory processing assessment suggests that Wistar audiogenic rat neural networks are prone to entrainment. *Neuroscience*, v. 347, p. 48–56, 7 abr. 2017.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.

Electroencephalography and clinical neurophysiology, v. 32, n. 3, p. 281–294, mar. 1972.

RAEDT, R.; VAN DYCKE, A. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta neurologica*, 2009. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0404.2008.01108.x?casa_token=qDPt ef0lo1IAAAAA:siChmlOPr4EMhz9AXb5pfbEl8gSYuruDI856O1-uRJTnU3SKKCuNfKxf5PFG Wxtz-GvcBiu-TkyGJ3s>.

RATTKA, Marta; BRANDT, Claudia; LÖSCHER, Wolfgang. 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, 2013.

REGAN, David. *Human brain electrophysiology: evoked potentials and evoked magnetic fields in science and medicine*. [S.l.: s.n.], 1989.

REZENDE, Gustavo Henrique Souza *et al.* Protein-caloric dietary restriction inhibits mossy fiber sprouting in the pilocarpine model of TLE without significantly altering seizure phenotype. *Epilepsy research*, v. 117, p. 85–89, nov. 2015.

RICHARDSON, Mark P. New observations may inform seizure models: very fast and very slow oscillations. *Progress in biophysics and molecular biology*, v. 105, n. 1-2, p. 5–13, mar. 2011.

RODRIGUES-DAGAEFF, C. *et al.* Functional organization of the ventral division of the medial geniculate body of the cat: evidence for a rostro-caudal gradient of response properties and cortical projections. *Hearing research*, v. 39, n. 1-2, p. 103–125, maio 1989.

ROMANI, G. L.; WILLIAMSON, S. J.; KAUFMAN, L. Tonotopic organization of the human auditory cortex. *Science*, v. 216, n. 4552, p. 1339–1340, 18 jun. 1982.

ROMANSKI, L. M.; LEDOUX, J. E. Bilateral destruction of neocortical and perirhinal projection targets of the acoustic thalamus does not disrupt auditory fear conditioning. *Neuroscience letters*, v. 142, n. 2, p. 228–232, 17 ago. 1992.

ROSENOW, F.; LÜDERS, H. Presurgical evaluation of epilepsy. *Brain: a journal of neurology*, v. 124, n. Pt 9, p. 1683–1700, set. 2001.

SANES, D. H.; RUBEL, E. W. The ontogeny of inhibition and excitation in the gerbil lateral superior olive. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 8, n. 2, p. 682–700, fev. 1988.

SCHEVON, Catherine A. *et al.* Microphysiology of epileptiform activity in human neocortex. *Journal of clinical neurophysiology: official publication of the American Electroencephalographic Society*, v. 25, n. 6, p. 321–330, dez. 2008.

SCHROEDER, Charles E.; LAKATOS, Peter. Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection. *Trends in neurosciences*, v. 32, n. 1, p. 9–18, jan. 2009.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, v. 12, n. 1, p. 103–113, Inverno 2000.

SEMAH, F. *et al.* Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology*, v. 51, n. 5, p. 1256–1262, nov. 1998.

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

SHEYBANI, Laurent *et al.* Electrophysiological Evidence for the Development of a Self-Sustained Large-Scale Epileptic Network in the Kainate Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 38, n. 15, p. 3776–3791, 11 abr. 2018.

SHIRVALKAR, Prasad R.; RAPP, Peter R.; SHAPIRO, Matthew L. Bidirectional changes to hippocampal theta-gamma comodulation predict memory for recent spatial episodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 15, p. 7054–7059, 13 abr. 2010.

SILVA, Fernando H. Lopes Da; DA SILVA, Fernando H. Lopes. *Electrophysiological analysis of the transition between normal brain activity and epileptic seizures: an overview of recent findings and new concepts. Epilepsies*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1684/epi.2009.0256>>. , 2009

SILVA, Fernando Lopes Da *et al.* *Epilepsies as Dynamical Diseases of Brain Systems: Basic Models of the Transition Between Normal and Epileptic Activity. Epilepsia*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.0013-9580.2003.12005.x>>. , 2003

SIMÕES, Cristiano Soares *et al.* Amygdala inhibition impairs fear conditioning but increases the stimulus-driven activity in the inferior colliculus. *Neuroscience letters*, v. 738, p. 135311, 1 nov. 2020.

SLOVITER, R. S. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, v. 1, n. 1, p. 41–66, jan. 1991.

SLOVITER, R. S. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Annals of neurology*, v. 35, n. 6, p. 640–654, jun. 1994.

SPENCER, Susan S. Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia*, v. 43, n. 3, p. 219–227, mar. 2002.

SQUIRE, L. R. Mechanisms of memory. *Science*, v. 232, n. 4758, p. 1612–1619, 27 jun. 1986.

STEAD, Matt *et al.* Microseizures and the spatiotemporal scales of human partial epilepsy. *Brain: a journal of neurology*, v. 133, n. 9, p. 2789–2797, set. 2010.

SUFFCZYNSKI, Piotr *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.

SUN, Xia *et al.* Corticofugal modulation of acoustically induced Fos expression in the rat auditory pathway. *The Journal of comparative neurology*, v. 501, n. 4, p. 509–525, 1 abr. 2007.

TSUBOI, T.; ENDO, S. Incidence of seizures and EEG abnormalities among offspring of epileptic patients. *Human genetics*, v. 36, n. 2, p. 173–189, 15 abr. 1977.

VAN STRIEN, N. M.; CAPPAERT, N. L. M.; WITTER, M. P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nature Reviews*, 2009.

Disponível em:

<https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/nrn2614&casa_token=P4GspwGAREcAAAAA:gK--xEs9VPqKlzpNrliEXQx_uF8PTgaiEPToNc79xQH VajwmgH2K3jQDg8Ekj-hcEtj7mrUzWm99sP6J>.

WINDHOLZ, G. A comparative analysis of the conditional reflex discoveries of Pavlov and Twitmyer, and the birth of a paradigm. *The Pavlovian journal of biological science*, v. 21, n. 4, p. 141–147, out. 1986.

WINER, Jeffery A.; SCHREINER, Christoph E. (Org.). *The Inferior Colliculus*. [S.l.]: Springer, New York, NY, 2005.

YECKEL, M. F.; BERGER, T. W. Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n. 15, p. 5832–5836, ago. 1990.

YOUNG, A. W. *et al.* Face processing impairments after amygdalotomy. *Brain: a journal of neurology*, v. 118 (Pt 1), p. 15–24, fev. 1995.

ZAVERI, H. P. *et al.* Distinguishing subtypes of temporal lobe epilepsy with background hippocampal activity. *Epilepsia*, v. 42, n. 6, p. 725–730, jun. 2001.

9. MATERIAIS SUPLEMENTARES



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Respostas Auditivas Evocadas em Regime Permanente para Avaliar Acoplamento Anormal em Modelo Animal de Epilepsia de lobo temporal.", protocolo do CEUA: 175/2018 sob a responsabilidade de Marcio Flavio Dutra Moraes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/08/2018.

Vigência da Autorização	06/08/2018 a 05/08/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	15
Peso/Idade	300g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	15
Peso/Idade	300g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	15
Peso/Idade	300g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério

Considerações posteriores:

07/08/2018	Aprovado na reunião do dia 06/08/2018. Validade: 06/08/2018 à 05/08/2023
------------	--

Belo Horizonte, 06/04/2021.

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