

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS  
NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA  
E REGIÕES ADJACENTES DE RATOS WISTAR  
AUDIOGÊNICOS**

**Gabriel Perfeito Castro**

**Belo Horizonte**

**2014**

**Gabriel Perfeito Castro**

**ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS  
NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA  
E REGIÕES ADJACENTES DE RATOS WISTAR  
AUDIOGÊNICOS**

**Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Área de concentração Fisiologia.**

**Orientador: Márcio Flávio Dutra Moraes.**

**Belo Horizonte**

**2014**

**"ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO COMPLEXO  
BASOLATERAL DA AMÍGDALA E REGIÕES ADJACENTES DE  
RATOS WISTAR AUDIOGÊNICOS"**

**GABRIEL PERFEITO CASTRO**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 14 de abril de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
**PROF. DR. ANTÔNIO LÚCIO TEIXEIRA JÚNIOR**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. JADERSON COSTA DACOSTA**  
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA-RS

  
**PROF. DR. JEROME PAUL ARMAND LAURENT BARON**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. NORBERTO GARCIA CAIRASCO**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

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

**Belo Horizonte, 14 de abril de 2014**

Dedico este trabalho aos meus amados Pai e Mãe,  
Francisco e Graciema.

## AGRADECIMENTOS

Ao Márcio, meu orientador, minha eterna gratidão pela amizade e confiança, pela oportunidade de integrar o Núcleo de Neurociências e sua escola científica, pela oportunidade de trabalhar na bancada ao seu lado. Por todo o conhecimento a mim ofertado, por toda a paciência, e por ter-me apoiado e permanecido ao meu lado frente as minhas dificuldades e demais percalços durante este processo de doutoramento.

Aos meus pais, meus amores, Graciema e Francisco, minha eterna gratidão por todo o amor e suor investidos ao longo de todos estes anos em meu bem estar e formação profissional, apoiando-me psicologicamente, moralmente e financeiramente.

Ao Flávio Mourão, meu companheiro de doutorado e grande amigo, pela amizade, pelo apoio psicológico e moral nas horas mais tensas, por toda a ajuda técnico-científica multidisciplinar, sem a qual certamente esse trabalho não teria sido realizado.

À Luciana Drumond, pela fundamental assistência técnico-científica e cooperação na coleta das imagens de ressonância magnética.

À Ana Clara Nunes Amorim, minha companheira e namorada, por tudo! Meus agradecimentos pelo seu amor, carinho, colo, por todo apoio nos mais variados aspectos e durante os momentos mais difíceis, por sua confiança inabalável em meu sucesso, e por ter sido fundamental ajudando-me na análise das imagens de ressonância magnética.

Ao Gustavo dos Reis pelo apoio técnico-científico com a parte de eletrônica.

Ao Thomaz Luscher Dias pela fundamental auxílio na histologia.

Ao Gustavo Rezende pela apoio técnico no CTPMag e pelo apoio profissional, me dando a oportunidade de experimentar, pela primeira vez, o que é leccionar.

A Patrícia Guidine pelo apoio técnico no CTPMag.

Ao Daniel Medeiros e André Lockmann pela forte amizade, pela cooperação e por todo o apoio técnico-científico.

Ao Professor André Massensini, pela amizade e respeito desde o princípio, pelo apoio e conhecimento ofertado.

À Família Núcleo de Neurociências, aos professores Juliana Tavares, Grace Pereira, Bruno Souza e todos os amigos e colegas de laboratório com quem tive o prazer de trabalhar e cooperar.

À Família Moraes e Santos pelas calorosas acolhidas em seu lar abençoado.

Ao José Eustáquio, quem aqui primeiro gentilmente me recebeu, no corredor, às portas do NNC, obrigado pela simpatia, amizade e apoio técnico.

Ao José Roberto Silva pelo apoio técnico.

Ao Darcy Ferreira dos Santos, personalidade, exemplo de trabalho, disciplina e dedicação, por sua amizade e apoio técnico.

Aos professores Christopher Kushmerick e Adelina Martha dos Reis pelo apoio formal e informal.

Ao Gustavo Coelho Lopes pela amizade e apoio.

Aos eternos grandes amigos e companheiros da CJ, do DABio, da graduação e da pós-graduação, minha eterna gratidão pelo acolhimento nestas Alterosas, pela amizade, confiança, consideração, apoio, e pelos sensacionais e inesquecíveis momentos que compartilhamos juntos.

Aos amigos e companheiros do Departamento de Fisiologia e Biofísica Luiz Gonzaga da Silva Júnior, Daniel Villela, Adriano Silva e Lucas Pinto.

Ao Povo Brasileiro, CNPq, CAPES e FAPEMIG.

À espécie de roedor *Rattus norvegicus*, pelos sujeitos “cedidos” para a realização deste estudo.

À todos que me deram carona.

Aos Milf Hunters e Pedreiros de Guantánamo.

Aos meus irmãos Sândor, Jordana e Chico pelo amor, apoio e torcida.

Ao Pai Jeremias, Madrinha Joaquina, Roldão Fontes, meu Guia Gerônimo e toda a legião do bem que com eles caminha.

Ao Universo, Absoluto, agradeço pela oportunidade de existir.

IF

If I were a swan, I'd be gone  
If I were a train, I'd be late  
And if I were a good man  
I'd talk with you more often than I do

If I were asleep, I could dream  
If I were afraid, I could hide  
If I go insane  
Please don't put your wires in my brain  
...

Atom Heart Mother – Pink Floyd – Roger Waters (1970)

## RESUMO

Epilepsia é uma desordem do cérebro caracterizada por uma predisposição permanente à geração de crises epiléticas e pelas *consequências* neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição. Importante parcela da população pode desenvolver um quadro de ocorrência de crises espontâneas recorrentes acompanhado por comorbidades neuropsiquiátricas como ansiedade, depressão, psicose, e déficits de aprendizagem e memória, alguns casos sem causa metabólica ou estrutural aparente. Muitas condições epiléticas tem etiologia genética. A maioria dos estudos sobre comorbidades associadas à epilepsia encontram relação entre a recorrência de crises e o nível de comprometimento neuropsiquiátrico, não averiguando a possibilidade de tais comorbidades, especialmente nos casos de epilepsia de etiologia genética, provirem de uma pré-disposição a desenvolvê-las, além da predisposição ao ictus. Os ratos Wistar audiogênicos (WAR) constituem um modelo animal, geneticamente selecionado, de crises reflexas audiogênicas desencadeadas por estímulo sonoro de alta intensidade, apresentando crises tônico-clônicas generalizadas tronco-encefálicas quando estimulados esporadicamente, e crises mioclônicas prosencefálicas quando estimulados repetidas vezes (abrasamento audiogênico). O colículo inferior é o foco epileptogênico responsável pelo início das crises audiogênicas. A amígdala basolateral (ABL), reconhecidamente importante para o processamento emocional em ratos e humanos, é fundamental para o recrutamento de estruturas límbicas temporais como o hipocampo e o córtex, integrando o circuito epileptogênico frente a alta recorrência das crises induzidas, por apresentar uma pré-disposição peculiar de seus circuitos ao recrutamento por pós-descargas ictais provenientes do tronco. Por outro lado, o circuito estriado-nigro-tectal, importante para o processamento sensorio-motor em ratos e humanos, modula a susceptibilidade audiogênica e a gravidade das crises reflexas. O caudado-putamen (CPu) e a ABL possuem neurônios responsivos à estimulação acústica não-convulsiva com latência e dinâmica de resposta evocada similares. Além da predisposição ao hiper-sincronismo da via acústico-límbica, WARs não-abrasados são mais susceptíveis a outros estímulos convulsivos de natureza elétrica ou farmacológica, evidenciando comprometimento generalizado dos sistemas colinérgico e GABAérgico cerebrais. Possuem desenvolvimento orgânico alterado, apresentando menor peso, eixo hipotálamo-pituitária-adrenal hiper-responsivo e disfunção cardíaca. WARs não-abrasados apresentam também comportamento exploratório de novos contextos alterado, mostrando comprometimento motor/emocional. É comum pacientes com epilepsia apresentarem hipotrofia ou hipertrofia de regiões cerebrais. Com uso da técnica de registro eletrofisiológico profundo multi-unitário multi-eletrodo aferimos a atividade unitária espontânea e o número de disparos das respostas evocadas por pulsos sonoros não-convulsivos de neurônios da ABL e do CPu de ratos Wistar audiogênicos e resistentes machos adultos não-abrasados anestesiados, em busca de alterações inatas do processamento de informação por estas estruturas. Com uso da técnica de imageamento longitudinal não-invasivo por ressonância magnética medimos o volume cerebral total, a espessura do córtex auditivo terciário e a altura e largura dos colículos inferiores em machos e fêmeas com 7, 14, 21, 28, 42 e 70 dias de idade para investigar o desenvolvimento do cérebro de WARs e a existência de alterações morfométricas que se relacionem com o quadro de susceptibilidade

audiogênica. Após os registros eletrofisiológicos e a classificação dos formatos de onda, foram identificados e agrupados neurônios com dinâmicas temporais de atividade evocada características, categorizadas a partir da latência, duração, sustentabilidade ou não das respostas. As variáveis número de bins com resposta evocada significativamente acima da linha de base, número de disparos por bin, número de disparos por janela de tempo pós o início do estímulo, e a média de disparos espontâneos por bin foram analisadas intra e entre as linhagens. No CPU de WARs, neurônios de latência curta e dinâmica transitória apresentaram resposta mais duradoura, atraso no pico de atividade evocada e atividade espontânea similar aos ratos resistentes; neurônios de latência curta e dinâmica transitória seguida de disparos tardios responderam por menos tempo, com menor número de disparos imediatamente frente o estímulo e apresentaram atividade espontânea menor; não verificou-se diferença significativa na duração das respostas, no número de disparos evocados, nem na atividade espontânea de neurônios de latência curta e dinâmica sustentada do CPu. Células com dinâmica sustentada da ABL de WARs apresentaram respostas mais curtas e atividade espontânea significativamente maior em comparação com ratos resistentes, evidência de saturação da atividade. A partir do estudo morfométrico longitudinal verificamos que as relações entre o volume cerebral, a espessura cortical e a estimativa bi-dimensional do colículo inferior com o peso dos animais variaram ao longo do desenvolvimento, apresentando-se mais elevada nos WAR aos 7, 14, 21 e 28 dias de idade e progressivamente equiparando-se aos ratos resistentes até o 70º dia de idade, apesar do menor peso (UMEOKA *et al.*, 2011). Verificamos que WARs não-abrasados apresentam processamento de informação auditiva alterado na ABL e no CPu, regiões importantes para epileptogênese prosencefálica e para modulação das crises audiogênicas, respectivamente, além de importantes para a execução das tarefas nas quais os WAR apresentaram padrão exploratório diferenciado (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1998). O estudo do desenvolvimento revelou um fenômeno de neuro-preservação do cérebro dos WAR apesar do menor peso e de alterações inatas cardiovasculares e endócrinas, semelhante ao observado em modelos de desnutrição crônica durante o desenvolvimento de ratos. O presente estudo contribui com o entendimento da relação entre fenômenos epiléticos de etiologia genética poligênica e alterações cerebrais não diretamente associadas aos processos de epileptogênese.

Palavras-chave: epilepsia, audiogênico, amígdala basolateral, caudado-putamen, abrasamento, potencial extracelular, multi-eletrodo, ressonância magnética, desenvolvimento cerebral, neuro-preservação.

## ABSTRACT

Epilepsy is a brain disorder characterized by a permanent predisposition to seizures and by the neurobiological, cognitive, psychological and social outcomes of this condition. A relevant percentage of the population may develop recurrent spontaneous seizures accompanied by neuropsychiatric comorbidities such as anxiety, depression, psychosis and learning and memory deficits, some cases with no overt metabolic or structural cause. Many types of epilepsy have a genetic background. Wistar audiogenic rats (WAR) comprise a genetically selected audiogenic reflex epilepsy animal model obtained through inbreeding of susceptible rats from a Wistar breeding stock, presenting brainstem generalized tonic-clonic seizures when sporadically stimulated with a high-intensity acoustic stimulus and prosencephalic limbic seizures when repeatedly stimulated (audiogenic kindling). The inferior colliculus is the epileptogenic focus responsible for onset of audiogenic seizures. Basolateral amygdala (BLA), a nuclei complex known for its importance in emotional processing in rats and humans, is crucial for recruitment of temporal limbic structures of WARs such as hippocampus and cortex, integrating the epileptogenic circuit when assaulted by repeated induction of seizures, presenting a peculiar predisposition of its circuits to recruitment by ictal afterdischarges. On the other hand, the striate-nigro-tectal circuit, important for sensory-motor processing in rats and humans, modulates audiogenic susceptibility and seizure severity in WARs. Neurons responsive to non-convulsive acoustic stimuli with similar latency and evoked dynamics are found in BLA and CPu. Beyond predisposition to hypersynchronism of acoustic-limbic pathway, non-kindled WARs are more prone to seizure elicited by electric or pharmacological stimuli, showing broadly altered cholinergic and GABAergic systems. WARs also present altered organic development being smaller than resistant Wistar rats, bearing a hyperresponsive hypothalamus-pituitary-adrenal axis and a cardiovascular malfunction, and non-kindled animals display atypical exploratory behavior of new environments, evidence of motor/emotional malfunction. Epileptic patients often show hypo or hypertrophy of cerebral regions. Using multi-unit multi-electrode deep recording technic we assessed spontaneous unit activity and response spike frequency evoked by non-convulsive acoustic pulses of BLA and CPu neurons of adult male non-kindled audiogenic and resistant Wistar rats, searching for evidence of innate altered information processing within these structures. Using non-invasive brain imaging magnetic resonance technic we conducted a longitudinal morphometric study and measured total brain volume, tertiary auditory cortex thickness and width and height of a inferior colliculus slice of male and female rats aging 7, 14, 21, 28, 42 and 70 days to investigate brain development of WARs and possible morphometric alterations related to audiogenic susceptibility condition. After electrophysiological recordings and sorting of the waveforms, neurons were classified and grouped according to similar evoked temporal dynamics, namely response latency, duration and sustainability. Number of responsive bins, number of evoked and spontaneous spikes were the variables analyzed within and between strains. In CPu of WARs, short-latency and transient response neurons discharged longer and peaked later; short-latency transient response followed by later spikes neurons displayed shorter discharges, fired less immediately after stimuli onset and showed lower spontaneous activity; sustained short-latency CPu neurons response duration, number of spikes and spontaneous

firing were not significantly different from resistant rats. Sustained discharge BLA neurons from WARs, on the other hand, displayed shorter responses and significantly greater spontaneous activity compared to resistant rats, evidence of a ceiling effect. From the longitudinal morphometric approach we verified that total brain volume, cortical thickness and bi-dimensional estimate of inferior colliculus relation with body weight varied across development, being greater on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> day of age in WARs compared to resistant rats, reaching similar levels by 70<sup>th</sup> day. Briefly, we verified that non-kindled WARs have altered auditory information processing in BLA and CPu, structures important to proencephalic epileptogenesis and modulation of audiogenic seizures, respectively, and important to appropriate behavior in tasks which WAR present altered emotional and exploratory activity (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1998). The longitudinal study revealed a neural-sparing phenomenon, despite lower body weight and innate endocrine (UMEOKA *et al.*, 2011) and cardiovascular malfunction, similar to models of malnourished rats. The present results add to the understanding of the relation between epileptic phenomena with polygenic background and brain alterations not necessarily associated with epileptogenic processes.

Keywords: epilepsy, audiogenic, basolateral amygdala, caudate-putamen, kindling, extracellular potential, multi-electrode, magnetic resonance, brain development, neural-sparing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotos de um dos arranjos multi-eletrodo utilizados para registro eletrofisiológico .....	30
<b>Figura 2.</b> Pulso de ruído branco; protocolo de estimulação acústica e espectro de energia por frequência do pulso.....	32
<b>Figura 3.</b> Diagrama de fluxo do algoritmo implementado para classificação das respostas neuronais.....	35
<b>Figura 4.</b> Cortes sagitais de cérebro mostrando caminho do arranjo de eletrodos.....	39
<b>Figura 5.</b> Recorte de um canal de registro eletrofisiológico multi-unitário.....	41
<b>Figura 6.</b> Histogramas peri-estímulo e gráficos de rastro de neurônios com diferentes dinâmicas de resposta evocada.....	43
<b>Figura 7.</b> Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de todas as células agrupadas de acordo com a duração e sustentação das respostas.....	46
<b>Figura 8.</b> Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de células com dinâmica sustentada da amígdala basolateral.....	47
<b>Figura 9.</b> Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de células com latência curta e dinâmica transitória do caudado-putamen.....	48
<b>Figura 10.</b> Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de células com latência curta e dinâmica transitória com disparos tardios do caudado-putamen.....	48
<b>Figura 11.</b> Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de células com latência curta e dinâmica sustentada do caudado-putamen.....	49
<b>Figura 12.</b> Número de disparos evocados por bin (10 ms) de todas as células com latência curta agrupadas de acordo com a duração e sustentação das respostas.....	50
<b>Figura 13.</b> Número total de disparos evocados durante os 300 ms pós-início dos estímulos de todas as células com latência curta agrupadas de acordo com a duração e sustentação das respostas.....	51
<b>Figura 14.</b> Média do somatório de disparos espontâneos de células responsivas por bin (10 ms) ocorridos durante os 10 s anteriores a cada um dos 15 estímulos apresentados de todas as células agrupadas de acordo com a duração e sustentação das respostas.....	53
<b>Figura 15.</b> Média do somatório de disparos espontâneos por bin (10 ms) de células responsivas com dinâmica sustentada da amígdala basolateral.....	54
<b>Figura 16.</b> Média do somatório de disparos espontâneos por bin (10 ms) de células responsivas com latência curta e dinâmica transitória do caudado-putamen.....	55
<b>Figura 17.</b> Média do somatório de disparos espontâneos por bin (10ms) de células responsivas com latência curta e dinâmica transitória com disparos tardios do caudado-putamen.....	55
<b>Figura 18.</b> Média do somatório de disparos espontâneos por bin (10 ms) de células responsivas com latência curta e dinâmica transitória do caudado-putamen.....	56
<b>Figura 19.</b> Imagens dos cérebros de ratos resistentes e WAR obtidas aos 7, 14, 21, 28, 42 e 70 dias de idade, com o uso da técnica de ressonância magnética.....	61

<b>Figura 20.</b> Volume cerebral, normalizado pelo peso, de animais com 7, 14, 21, 28, 42 e 70 dias de idade.....	62
<b>Figura 21.</b> Espessura do córtex auditivo, normalizada pelo peso, de animais com 21, 28, 42 e 70 dias de idade.....	62
<b>Figura 22.</b> Estimativa bi-dimensional do colículo inferior, normalizada pelo peso, de animais com 21, 28, 42 e 70 dias de idade.....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de células por região de origem, por linhagem.....	44
<b>Tabela 2.</b> Número de células por categoria de resposta, por linhagem.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AA** – Abrasamento audiogênico

**ABL** – Amígdala basolateral

**CPu** – Caudado-putamen

**ELT** – Epilepsia de lobo temporal

**GEPR** – *Genetic epilepsy prone rat*

**PTZ** – Pentilenotetrazol

**WAR** – *Wistar audiogenic rat*

**HPA** – Hipotálamo-pituitária-adrenal

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. JUSTIFICATIVA .....	27
3. OBJETIVOS .....	28
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
4. MÉTODOS .....	29
4.1. ANIMAIS.....	29
4.2. REGISTRO DA ATIVIDADE BASAL E DA RESPOSTA EVOCADA AUDITIVA UNITÁRIA DE NEURÔNIOS DA AMÍGDALA BASOLATERAL E CAUDADO-PUTAMEN .....	30
4.2.1. Arranjos multi-eletrodo e cirurgia de implante profundo.....	30
4.2.2. Trilhas sonoras, protocolos de registro e estimulação acústica .....	31
4.2.3. Sistema de registro, amplificação, filtragem e digitalização .....	33
4.2.4. Classificação (sorting) dos disparos detectados, categorização das dinâmicas de resposta neuronal, agrupamento dos dados e variáveis analisadas .....	33
4.3. ESTUDO ANATÔMICO DO DESENVOLVIMENTO DO CÉREBRO DE RATOS WISTAR AUDIOGÊNICOS .....	36
4.3.1. Variáveis analisadas .....	37
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	38
5. RESULTADOS .....	39
5.1. PROTOCOLO DE REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DA RESPOSTA EVOCADA E ATIVIDADE ESPONTÂNEA .....	39
5.1.1. Histologia.....	39
5.1.2. Sinal elétrico registrado .....	41
5.1.3. Resultados e Discussão .....	42
5.2. ESTUDO ANATÔMICO DO DESENVOLVIMENTO DO CÉREBRO DE RATOS WISTAR AUDIOGÊNICOS .....	60
5.2.1. Resultados e Discussão .....	60
6. DISCUSSÃO GERAL .....	65
7. CONCLUSÃO .....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
9. APÊNDICE .....	80

## 1. INTRODUÇÃO

Epilepsia não é uma doença clinicamente bem definida, mas uma variedade de distúrbios causados por uma disfunção cerebral resultante de diferentes causas (LOSCHER, 1997), como trauma (D'AMBROSIO *et al.*, 2009), isquemia (JUNGEHULSING *et al.*, 2013), neoplasias (AUBERT *et al.*, 2009), infecções (MICHAEL e SOLOMON, 2012), fatores metabólicos, hereditários, congênitos e desconhecidos, sendo referida também como “epilepsias” (LOSCHER, 1997). No mundo, cerca de 50 milhões de pessoas apresentam algum tipo de epilepsia (STABLES *et al.*, 2002). De acordo com a Liga Internacional Contra Epilepsia (*International League Against Epilepsy*), a epilepsia é definida como uma distúrbio do cérebro caracterizada por uma predisposição permanente à geração de crises epiléticas e pelas *consequências* neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição (FISHER *et al.*, 2005). Estudos epidemiológicos realizados em diversos países constataram que o tipo mais frequente de epilepsia em humanos são as de crise parcial complexa, com ou sem generalização secundária, originada no lobo temporal, particularmente no hipocampo e amígdala (CATENOIX *et al.*, 2011; LOSCHER, 1997). Pacientes adultos com epilepsia de lobo temporal (ELT) apresentam o pior prognóstico entre os tipos de epilepsia, uma vez que 60-70% destes pacientes são considerados intratáveis, isto é, são refratários ao tratamento com drogas anti-convulsivas (LEPPIK, 1992).

As epilepsias são comumente categorizadas em dois grandes grupos: sintomáticas e criptogênicas (SALZMANN e MALAFOSSE, 2012). As epilepsias sintomáticas decorrem de alterações estruturais ou metabólicas adquiridas detectáveis através da clínica médica. No entanto, aproximadamente 1% da população pode desenvolver um quadro de ocorrência de crises espontâneas recorrentes sem dano ou causa estrutural (diagnóstico por imagem) e metabólica aparente (SALZMANN e MALAFOSSE, 2012; STEINLEIN, 2004). Estudos biomoleculares demonstram, no entanto, que parcela desses casos sem diagnóstico tem origem genética, sendo as disfunções que levam à epilepsia de causa mais sutil (KALACHIKOV *et al.*, 2002) que as detectáveis por EEG ou exame de imagem cerebral. Estas epilepsias sem causa estrutural ou metabólica aparente, cujas alterações são de natureza genética, são categorizadas como epilepsias idiopáticas (SALZMANN e MALAFOSSE, 2012; STEINLEIN, 2004).

É comum a todas as epilepsias a ocorrência de crises epilépticas. De acordo com FISHER e colaboradores (2005), *crise epiléptica* se refere a uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal, excessiva ou síncrona, do cérebro. Durante as crises se observa atividade elétrica cerebral hiper-síncrona, com aumento significativo da energia e da amplitude do sinal elétrico registrado, com deflexões da ordem de centenas de milivolts (~400-700mV). Observa-se, tanto em animais quanto em humanos, eventos isolados ou complexos de diferentes formatos de onda elétrica que podem se repetir durante alguns segundos ou ocorrer irregularmente durante as crises (UYSAL-SOYER *et al.*, 2012; BEYER *et al.*, 2008; LITT *et al.*, 2001; MORAES *et al.*, 2000; STERIADE *et al.*, 1991). A manifestação orgânica da crise depende de fatores como o local de emergência da atividade anormal no cérebro, o padrão de propagação desta, a maturidade do encéfalo, o momento do ciclo sono/vigília, uso de medicação, entre outros. O critério eletrofisiológico, isto é, a ocorrência de atividade *elétrica* anormal hiper-síncrona (COTA *et al.*, 2009; VELASCO *et al.*, 2000), independente da causa, é característica patognomônica das epilepsias (FISHER *et al.*, 2005). As crises epilépticas, dependendo das regiões comprometidas e, portanto, das redes recrutadas pela atividade elétrica anormal, podem afetar funções sensoriais, motoras, autonômicas e cognitivas, o nível de consciência (SERI *et al.*, 2011), o estado emocional e, portanto, o comportamento do paciente. Nem todas as crises afetam todas as funções e estados citados, mas todas as crises afetam pelo menos um destes (FISHER *et al.*, 2005). As crises com algum tipo de manifestação motora como mioclonias, clonias, tonias e atonias acometem importante parcela de pacientes com epilepsia (LEPPIK, 1992).

Além e, não necessariamente relacionadas às alterações eletrográficas características das epilepsias, existe volume considerável de casos de pacientes que apresentam pelo menos um tipo de quadro psiquiátrico e/ou disfunções cognitivas (MACCOTTA *et al.*, 2013; DUKE *et al.*, 2012; WANDSCHNEIDER *et al.*, 2012) associadas a condição epiléptica, observadas durante o período entre crises, experimentando quadros de ansiedade, depressão, psicose, agressividade, déficit de atenção e hiperatividade e/ou autismo (GARCIA-PEÑAS, 2011; HARA, 2007; GAITATZIS *et al.*, 2004; CORNAGGIA *et al.*, 2006), e déficits de aprendizagem e memória, mesmo sem lesão aparente (GIOVAGNOLI E AVANZINI, 1999; BEGHI *et al.*, 2006; LERITZ *et al.*, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2007). Em muitos casos,

alterações micro e macro-estruturais (GERDES *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2011; LABATE *et al.*, 2006; BERNASCONI *et al.*, 2003) relacionadas a prejuízos cognitivos (RILEY *et al.*, 2011) são decorrentes da recorrência de episódios de crise (SWINKELS *et al.*, 2005). LIN e colaboradores (2012) verificaram, no entanto, que crianças com início recente de epilepsia benigna com disparos centro-temporais apresentam hipertrofia do estriado relacionada com desempenho cognitivo diferenciado, sugerindo que tais alterações morfométricas observadas ocorreram antes da manifestação da condição epiléptica. É importante notar que condições psiquiátricas e disfunções cognitivas concomitantes à condição epiléptica decorrem também de fatores iatrogênicos relacionados ao tratamento farmacológico com drogas anti-convulsivas e à ablação cirúrgica, assim como devido aos receios experimentados pelos pacientes como o de apresentarem novas crises, de sofrerem acidentes, perderem o controle, além do estigma social em relação a quem tem epilepsia (BEYENBURG *et al.*, 2005; SWINKELS *et al.*, 2005). Além disso, estudos clínicos, em sua maioria, são realizados com pacientes anteriormente acometidos por episódios recorrentes de crise (SWINKELS *et al.*, 2005), limitando a possibilidade de se investigar se as disfunções cognitivas e psiquiátricas concomitantes ao quadro epiléptico tem causa alternativa as alterações estruturais decorrentes dos episódios de hiperatividade elétrica cerebral. Em alguns casos, é possível que tais disfunções sejam a manifestação de um traço patológico paralelo, seja relacionado ou não, à predisposição à hiper-excitabilidade e ao hiper-sincronismo de redes neurais, inda mais considerando a natureza genética (JALAVA e SILLANPAA, 1997) de algumas epilepsias extra-temporais (PRASAD *et al.*, 2013; HIROSE *et al.*, 2005) e temporais (FANCIULLI *et al.*, 2014; KASPERAVICIUTE *et al.*, 2013; MAURER-MORELLI *et al.*, 2012; SALZMANN e MALAFOSSE, 2012), e as possíveis consequências fenotípicas neurológicas e psiquiátricas dos respectivos genótipos, adicionais à epilepsia (MULLEN *et al.*, 2013).

Os ratos Wistar audiogênicos (*Wistar audiogenic rats* – WAR) são uma linhagem de ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus* que constitui um modelo animal de epilepsia reflexa audiogênica utilizada também, em determinadas condições, como um modelo animal de epilepsia de lobo temporal (GALVIS-ALONSO *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2000; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996). Essa linhagem foi obtida a partir da seleção genética artificial em torno da susceptibilidade inata à epilepsia reflexa audiogênica apresentada por uma

porcentagem de animais da população de ratos Wistar da colônia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (DORETTO *et al.*, 2003; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1993). As crises reflexas são desencadeadas frente à apresentação de um estímulo acústico de alta intensidade (som de campainha digitalizado fornecido a 120 dB SPL) aos animais.

Quando os WARs são submetidos a uma estimulação acústica aguda estes apresentam crises tônico-clônicas generalizadas (MORAES *et al.*, 2000). Durante essa crise, os animais tipicamente apresentam episódios de corrida, pulos e quedas atônicas, seguidas pelo arqueamento dorsal da cabeça, clonias e/ou espasmos clônicos dos membros, ou por arqueamento ventral da cabeça seguido da hiperextensão tônica dos membros anteriores e posteriores, sendo estes comportamentos relacionados à atividade epiléptica restrita a estruturas do tronco encefálico [MORAES *et al.*, 2005a; MORAES *et al.*, 2005b; MORAES *et al.*, 2000; BROWNING *et al.*, 1999 (GEPRs); GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996]. O colículo inferior apresenta-se como a estrutura responsável pela gênese da crise audiogênica (MORAES *et al.*, 2005a; MORAES *et al.*, 2005b; GARCIA-CAIRASCO e SABBATINI, 1991) e o colículo superior, a substância nigra (DORETTO e GARCIA-CAIRASCO, 1995) e a substância cinzenta periaquedutal como estruturas importantes na expressão motora dessas crises (GARCIA-CAIRASCO, 2002). Frente à indução de crises repetidas vezes, estes animais passam a apresentar eletroencefalograma e comportamentos convulsivos não mais característicos do comprometimento do tronco encefálico, mas característicos do comprometimento do lobo temporal, como mioclonias, mostrando que as porções superiores da via acústica são recrutadas e comprometidas secundariamente e de modo irreversível (MORAES *et al.*, 2000; GALVIS-ALONSO *et al.*, 2004). O fenômeno de recrutamento de estruturas límbicas desencadeado pelo fornecimento de estímulos acústicos repetitivos (MORAES *et al.*, 2000) é denominado abrasamento audiogênico (AA), sendo descrito também em outros modelos de crise audiogênica (VERGNES *et al.*, 1987; NARITOKU *et al.*, 1992). De acordo com LOSCHER (1997), abrasamento é um fenômeno em que uma descarga epileptiforme inicialmente confinada a um pequeno foco ou rede neural, tende, se não perturbada, a evoluir espacialmente e em gravidade de comprometimento neural e comportamental.

A amígdala basolateral (ABL – núcleos lateral, basal e acessório-basal), que recebe informações unimodais auditivas, visuais e somatossensórias provenientes

de vias talâmicas subcorticais (LEDOUX, 2000), e polimodais de vias de processamento cortical e hipocampal (MCDONALD, 1998), é crucial para este recrutamento secundário de estruturas prosencefálicas como o córtex e o hipocampo (MORAES *et al.*, 2000), devido à reciprocidade das conexões, e pela manifestação das crises mioclônicas (RACINE, 1972) durante o abrasamento audiogênico dos WAR. O abrasamento audiogênico facilita a indução posterior do abrasamento elétrico da amígdala destes animais e promove alterações plásticas duradouras na amígdala basolateral (GALVIS-ALONSO *et al.*, 2004; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996). Estudos do comportamento de ratos não-epilépticos verificaram a ocorrência de processos oscilatórios nos circuitos da ABL (CRANE *et al.*, 2009) e o acoplamento funcional da atividade desta estrutura com regiões prosencefálicas, como o hipocampo (LESTING *et al.*, 2011; GHOSH *et al.*, 2013; JACINTO *et al.*, 2013) e o córtex (MOSCARELLO e LEDOUX, 2013; LESTING *et al.*, 2011), em situações neutras e durante paradigmas com componente emocional.

Estudos com outros modelos de ratos audiogênicos também evidenciam o papel chave da amígdala basolateral no recrutamento do prosencéfalo. De modo semelhante à GALVIS-ALONSO e colaboradores (2004), HIRSCH e colaboradores (1992) mostraram ocorrer um fenômeno de transferência positiva da hiperexcitabilidade prosencefálica suscitada pelo abrasamento audiogênico para o abrasamento elétrico posterior do hipocampo ou da amígdala basolateral (HIRSCH *et al.*, 1997) de ratos audiogênicos, aparentemente devido a propagação das pós-descargas geradas no tronco-encefálico para regiões prosencefálicas. HIRSCH e colaboradores (1997) observaram que a micro-injeção de lidocaína na amígdala basolateral bloqueou a expressão de crises límbicas em ratos submetidos ao AA, não verificando o mesmo com a micro-injeção hipocampal, e observaram também haver expressão aumentada da proteína c-Fos (um marcador de atividade neuronal) na amígdala de ratos audiogênicos após 5-10 estimulações acústicas. N'GOUEMO e FAINGOLD (1997) mostraram que o núcleo geniculado medial é importante para o recrutamento posterior da amígdala durante o AA de GEPRs (*Genetic epilepsy prone rats*) e, com o uso da técnica de registro multi-unitário verificou-se que o AA potencia a resposta evocada auditiva de neurônios da ABL destes animais (FENG e FAINGOLD, 2002a; FENG e FAINGOLD, 2002b). TUPAL e FAINGOLD (2010) mostraram que a ativação da enzima adenilato ciclase na amígdala basolateral de GEPR-9s é importante para a manutenção das alterações plásticas decorrentes do

abrasamento audiogênico. CHAKRAVARTY e FAINGOLD (1999) verificaram, farmacologicamente, no entanto, que a amígdala não tem papel algum na geração de crises audiogênicas simples (não-abrasadas) induzidas nesses animais.

Além da predisposição à crise audiogênica, WARs não-abrasados são mais susceptíveis a outros estímulos que não o acústico, evidenciando uma susceptibilidade inata mais ampla que a audiogênica. Os WAR mostraram-se mais sensíveis à estimulação elétrica transauricular de baixa intensidade (MAGALHÃES *et al.*, 2004), ao pentilenoterazol (PTZ), um antagonista GABAérgico, e à pilocarpina, um agonista colinérgico (SCARLATELLI-LIMA *et al.*, 2003), ambos fármacos utilizados para indução de modelos animais de epilepsia de lobo temporal (LEITE e CAVALHEIRO, 1995; DETOUR *et al.*, 2005), apresentando crises mais graves que os ratos resistentes frente uma menor quantidade do estímulo convulsivante. Estes animais apresentam também uma diminuição inata da inibição GABAérgica e maior excitabilidade neuronal no hipocampo (DRUMOND *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2005). Os resultados obtidos através dos estudos realizados com WARs, corroborando com as evidências obtidas de outras linhagens audiogênicas, sugerem que os WAR apresentam uma predisposição inata ao desenvolvimento de atividade epiléptica não somente em regiões mesencefálicas, mas também em circuitos procefálicos pertencentes a via acústico-límbica (MAGALHÃES *et al.*, 2004), especialmente a amígdala basolateral.

Ainda que o fato de a ABL não integrar o circuito neural acometido para geração das crises agudas (CHAKRAVARTY e FAINGOLD, 1999; SIMLER *et al.*, 1994) seja uma evidência de não comprometimento funcional desta estrutura previamente à recorrência das crises induzidas (AA), a ampla pré-disposição ictal observada (DRUMOND *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2005; GALVIS-ALONSO *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2004; SCARLATELLI-LIMA *et al.*, 2003) e as demais evidências acima apresentadas sugerem uma pré-disposição peculiar do complexo amigdalóide ao desenvolvimento de atividade ictal. RAISINGHANI e colaboradores (2003) mostraram que a micro-injeção sub-convulsiva de NMDA na amígdala basolateral de GEPR-9s não-abrasados é suficiente para a mimetização das alterações comportamentais e eletrofisiológicas decorrentes do abrasamento audiogênico destes animais, sugerindo que a susceptibilidade peculiar dos GEPR-9s à estimulação sub-convulsiva com NMDA é devido a uma facilitação inata da transmissão glutamatérgica na amígdala basolateral. Um achado muito interessante

foi obtido por GARCIA-CAIRASCO e GUIMARÃES (1998) sobre o comportamento de WARs não-abrasados, avaliado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado: Os WARs mostram-se menos ativos e mais ansiosos que ratos resistentes. Em meio a muitas possibilidades (DAMASCENO *et al.*, 2013; FAZAN *et al.*, 2011; UMEOKA *et al.*, 2011), estes resultados sugerem a existência de alterações inatas em regiões importantes para o processamento emocional e motor.

Além das alterações comportamentais observadas (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1998), verificou-se que WARs intactos apresentam responsividade aumentada inata do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) frente à estimulação farmacológica e comportamental estressante, além de menor peso corporal (UMEOKA *et al.*, 2011). Sabe-se que o hormônio liberador de corticotrofina tem efeito pró-convulsivo (BAJOREK *et al.*, 1986) e que a ABL é sensível a micro-injeção desse neuro-hormônio, levando a alterações comportamentais no campo aberto e labirinto em cruz elevado (DANIELS *et al.*, 2004). Dada a reconhecida importância da amígdala basolateral, como integrante do circuito do medo, para o processamento emocional em ratos (GALE *et al.*, 2004; SAVONENKO *et al.*, 2003; MCGAUGH, 2002; GOOSENS e MAREN, 2001; ROGAN *et al.*, 1997) nas referidas (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1998) tarefas (JI *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2006), faz-se necessário investigar eletrofisiologicamente a possibilidade de haverem alterações nos circuitos da ABL durante o processamento de estímulos não-convulsivos (FANG e FAINGOLD, 2002a; BORDI *et al.*, 1993; BORDI *et al.*, 1992) em animais audiogênicos não-abrasados. Em humanos, o complexo amigdalóide também é importante no processamento emocional de estímulos (LARSON *et al.*, 2006; PESSOA *et al.*, 2002; BECHARA *et al.*, 1999), e faz parte do circuito epileptogênico em pacientes com epilepsia de lobo temporal (FAUSER e SCHULZE-BONHAGE, 2006; BERNASCONI *et al.*, 2003).

Em ratos, TURSKI e colaboradores (1991) mostraram que a transmissão GABAérgica no estriado (caudado-putamen - CPu) tem efeito modulador anti-convulsivo em animais submetidos ao modelo de pilocarpina e que este efeito depende da atividade da substância nigra *pars reticulata*. O estriado conecta-se com o córtex e com regiões mesencefálicas, como o colículo superior e a substância nigra, formando circuitos importantes para o processamento sensório-motor de ratos (MCHAFFIE, 2005) e para modulação do nível de susceptibilidade ao hiper-sincronismo de regiões prosencefálicas (TURSKI *et al.*, 1989). Nos WAR, a

substância nigra e a porção posterior do colículo superior são importantes para o controle da susceptibilidade audiogênica e contribuem com a expressão motora das crises tônico-clônicas (ROSSETTI *et al.*, 2012; ROSSETTI *et al.*, 2011; DORETTO e GARCIA-CAIRASCO, 1995; GARCIA-CAIRASCO e SABBATINI, 1991). ROSSETTI e colaboradores (2006) verificaram que o circuito estriado-nigro-tectal dos WAR está envolvido na modulação de crises audiogênicas tônico-clônicas através de mecanismos diferentes comparados com ratos Wistar resistentes. A partir dos estudos sobre a linhagem WAR, verifica-se que o CPu não faz parte do circuito epileptogênico, mas de um circuito modulador do fenômeno epilético. Em humanos, os gânglios basais, juntamente com o tálamo, córtex e o mesencéfalo são importantes para o controle sensorio-motor e para cognição (GITTIS e KREITZER, 2012; KRAVITZ e KREITZER, 2012; SCIMECA e BADRE, 2012; GROENEWEGEN, 2002), sendo verificado também um papel modulador dos gânglios basais sobre a propagação de atividade epilética originada no lobo temporal (DEMATTEIS *et al.*, 2003) e em regiões extratemporais (LUO *et al.*, 2012) de pacientes com epilepsia. Outros estudos com modelos animais de convulsão/epilepsia observaram alterações plásticas na região do estriado durante o desenvolvimento do quadro de crises recorrentes, e após acometimento por crises espontâneas límbicas recorrentes em animais submetidos ao protocolo de pilocarpina (AVCHALUMOV *et al.*, 2011; YOUNG *et al.*, 2009) e após o abrasamento elétrico da ABL (KUCKER *et al.*, 2010), ambos estudos realizados com ratos Wistar. Existem neurônios na região do CPu de ratos Sprague-Dawley que respondem a estimulação acústica sublimiar com latências e dinâmica de resposta similares as observadas em neurônios da ABL (BORDI *et al.*, 1993; BORDI *et al.*, 1992), mostrando sua importância no processamento imediato de informação auditiva. Não há relato na literatura de registros eletrofisiológicos de respostas evocadas por estímulos aferentes subconvulsivos realizados no CPu de WARs levantando a possibilidade de um possível comprometimento do funcionamento dessa estrutura em animais não-abrasados.

O registro eletrofisiológico cerebral profundo dos potenciais extracelulares neuronais realizados com a utilização de microelétrodos de alta impedância permite o monitoramento da atividade elétrica gerada por neurônios individuais (BORDI *et al.*, 1993; BORDI *et al.*, 1992) com alta resolução temporal e espacial em situações basais ou frente perturbações sensoriais como o fornecimento de estímulos acústicos padronizados a ratos anestesiados (BORDI *et al.*, 1992). Os potenciais

elétricos extracelulares correspondem aos potenciais de ação gerados por neurônios individuais. Potenciais de ação disparados em sequência, dispersos ou em rajadas, constituem a base do código neural para transmissão de informações pelo cérebro (BUZSAKI *et al.*, 2012; WARD, 2003; GERSTNER *et al.*, 1997). O número de disparos de potenciais de ação por janela de tempo, isto é, a frequência de disparo, é a principal medida observada de atividade e excitabilidade de neurônios individuais (FENG e FAINGOLD, 2002a). Medimos então a atividade unitária espontânea durante o silêncio e o número de disparos da resposta evocada auditiva de neurônios da ABL e CPu de ratos adultos susceptíveis não-abrasados e resistentes anestesiados, frente o fornecimento de pulsos sub-limiáres de ruído branco com duração de 100 ms. O emprego de arranjos de múltiplos eletrodos maximiza o número de células responsivas encontradas durante o protocolo experimental de registro eletrofisiológico, minimizando o número de animais necessários para uma amostragem apropriada das respostas biológicas a serem investigadas, e permite o estudo de populações neuronais maiores e abrangentes.

É demonstrado que pacientes com epilepsia podem apresentar alterações morfológicas cerebrais, como aumento de volume cortical (HANGANU *et al.*, 2014; ALHUSAINI *et al.*, 2013; PARDOE *et al.*, 2013). BOUILLERET e colaboradores (2009) verificaram um quadro de hiper-ansiedade e aumento amigdalár, cortical e hipocámpal, usando a técnica de ressonância magnética, em ratos adultos que apresentam crises espontâneas de ausência. Estudos com GEPRs apresentam evidências de comprometimento inato do cérebro e de evolução do quadro de susceptibilidade audiogênica durante o desenvolvimento. A variação das regiões comprometidas e do fenótipo das crises audiogênicas induzidas em GEPR-3s, ao longo do seu desenvolvimento, sugere que o quadro de hiper-excitabilidade e susceptibilidade ao hiper-sincronismo evolui da infância até a juventude adulta (EELLS *et al.*, 2000; REIGEL *et al.*, 1989). Assim como WARs, GEPRs intactos apresentam alterações neuromodulatórias e endócrinas sistêmicas, apresentando deficiência do sistema noradrenérgico em 15 regiões cerebrais distintas (DAILEY *et al.*, 1991), hipo-tireoidismo peri-natal relacionado a alterações na maturação das projeções das fibras musgosas do hipocampo (MILLS *et al.*, 1990) e uma redução da inibição sináptica somado ao aumento da excitabilidade da membrana observadas em neurônios de CA3 de animais com 7-28 dias de idade (VERMA-AHUJA *et al.*, 1998), achados similares aos observados por DRUMOND e colaboradores (2011) e

MESQUITA e colaboradores (2005) em WARs. A verificação que WARs intactos ou não-abrasados apresentam alterações endócrinas, menor peso (UMEOKA *et al.*, 2011) e disfunção cardiovascular (DAMASCENO *et al.*, 2013; FAZAN *et al.*, 2011), evidenciam um quadro de desenvolvimento orgânico comprometido em decorrência do processo de seleção genética endogâmica realizado em torno da susceptibilidade audiogênica, levantando a possibilidade de haverem diferenças não somente entre animais adultos (BOUILLERET *et al.*, 2009), mas também no desenvolvimento do sistema nervoso destes animais. Realizamos então um estudo anatômico longitudinal do desenvolvimento do cérebro de machos e fêmeas intactos com o uso da técnica não-invasiva de imageamento por ressonância magnética. Considerando a susceptibilidade inata ao hiper-sincronismo de circuitos da via auditiva observado nos WARs (MORAES *et al.*, 2000) avaliamos o volume cerebral total, espessura do córtex auditivo terciário e a área aproximada de uma fatia dos colículos inferiores aos 7, 14, 21, 28, 42 e 70 dias de idade.

## 2. JUSTIFICATIVA

Ainda que estudos sobre a participação da ABL na manifestação de crises tônico-clônicas e sua importância na evolução do abramento audiogênico tenham sido realizados (GALVIS-ALONSO *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2000; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996), assim como estudos sobre a importância do circuito estriado-nigro-tectal na modulação de crises audiogênicas (ROSSETTI *et al.*, 2012; ROSSETTI *et al.*, 2011; ROSSETTI *et al.*, 2006; DORETTO e GARCIA-CAIRASCO, 1995; GARCIA-CAIRASCO E SABBATINI, 1991), até então não há relato na literatura de estudo eletrofisiológico investigando o processamento de informação auditiva não-convulsiva por neurônios individuais da ABL e CPu de WARs não-abrasados, isto é, que não tiveram as redes prosencefálicas comprometidas pela indução crônica de crises, acessado através do registro multi-unitário do potencial extracelular. Diferenças no processamento auditivo na amígdala basolateral e caudado-putamen de animais não-abrasados entram no *conjunto* de alterações inatas cerebrais apresentadas pelos WARs, contribuindo com o entendimento do complexo quadro epiléptico do modelo, de como o cérebro susceptível à hiperexcitabilidade interpreta uma perturbação ambiental, e abrem novos caminhos para o entendimento das alterações do comportamento emocional e motor de WARs durante o período entre-crisis.

Ainda não há relato na literatura, até então, de uma avaliação anatômica do desenvolvimento do cérebro de ratos audiogênicos. O estudo morfométrico longitudinal realizado em animais intactos contribui fortemente com o entendimento dos casos de epilepsia de etiologia genética como potenciais desordens do desenvolvimento que se manifestam, comportamentalmente, como síndromes neuropsiquiátricas complexas (CORNAGGIA *et al.*, 2006).

### **3. OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho é verificar a existência de diferenças no processamento neural de estímulos auditivos não-convulsivos e no desenvolvimento anatômico do cérebro de ratos Wistar audiogênicos não-abrasados comparados com ratos Wistar resistentes à crise audiogênica.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Verificar, com uso da técnica de registro eletrofisiológico profundo multi-unitário multi-eletrodo, diferenças na atividade espontânea e na resposta evocada por estímulo sonoro não-convulsivo de neurônios presentes na amígdala basolateral e no caudado-putamen de WARs não-abrasados comparados com ratos Wistar resistentes;
2. Verificar, com uso da técnica de ressonância magnética, diferenças no volume cerebral total, espessura do córtex auditivo terciário e na altura e largura dos colículos inferiores, entre ratos audiogênicos e resistentes intactos com 7, 14, 21, 28, 42 e 70 dias de idade.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar audiogênicos e Wistar resistentes machos pesando entre 250 e 450 g para os experimentos de eletrofisiologia, e ratos Wistar audiogênicos e Wistar resistentes machos e fêmeas recém-nascidos para o estudo morfológico longitudinal, todos fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os ratos Wistar utilizados tiveram sua resistência a crises audiogênicas confirmada, com a apresentação do mesmo estímulo audiogênico fornecido aos WARs (campanha elétrica digitalizada fornecida a 120 db SPL durante 60 s ou até o momento da crise), não apresentando nenhum tipo de manifestação convulsiva. Para a confirmação da susceptibilidade audiogênica, todos os WARs utilizados foram submetidos a mesma triagem que os ratos resistentes, quando foram fornecidos três estímulos audiogênicos. Os WARs selecionados para o experimento foram de diferentes ninhadas e apresentaram pelo menos uma crise tônico-clônica parcial ou generalizada de índice de gravidade 0,73 (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996), sendo submetidos aos registros eletrofisiológicos pelo menos 30 dias após a triagem e, no caso do experimento de morfometria, triados posteriormente a coleta das imagens. Vale ressaltar que grupos independentes de animais foram utilizados em cada uma das abordagens realizadas. Todos os cuidados foram tomados para evitar, por completo, qualquer sofrimento ou dano aos animais e os protocolos realizados avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 152/2014 (Apêndice).

## 4.2. REGISTRO DA ATIVIDADE BASAL E DA RESPOSTA EVOCADA AUDITIVA UNITÁRIA DE NEURÔNIOS DA AMÍGDALA BASOLATERAL E CAUDADO-PUTAMEN

### 4.2.1. Arranjos multi-eletrodo e cirurgia de implante profundo

Arranjos com 18 eletrodos de tungstênio encapados com teflon construídos em nosso laboratório (Figura 1) foram utilizados para o registro dos potenciais extracelulares unitários gerados pelos neurônios, abrangendo quase toda a extensão antero-posterior (~2,0 mm) dos núcleos constituintes da amígdala basolateral, e a porção lateral do corpo e cauda do núcleo caudado e do putamen. Os eletrodos de tungstênio são tradicionalmente utilizados para registro de potenciais extracelulares e apresentam impedância da ordem de kilohms (40-150 k $\Omega$ ) (SANKAR, *et al.*, 2014; FREIRE *et al.*, 2011). As coordenadas estereotáxicas utilizadas relativas à referência cranial *bregma* são: antero-posterior (AP) = 1,8 mm; latero-lateral (LL) = 5,0-5,3 mm; dorsoventral (DV) = 7,0 mm. Cada arranjo é montado com 16 canais de registro e 02 eletrodos destinados ao terra e à referência. Os eletrodos são dispostos em duas fileiras de 08 e 10, sendo o espaçamento entre eletrodos adjacentes de aproximadamente 0,3 mm. Cada eletrodo possui aproximadamente 0,05 mm de diâmetro.

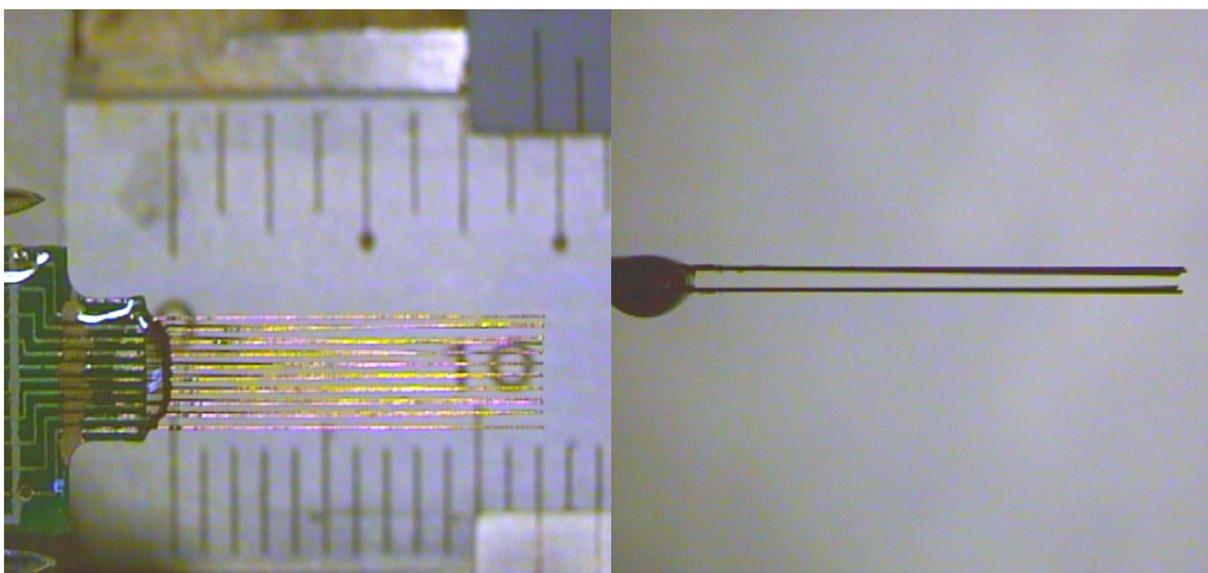


Figura 1. Fotos de um dos arranjos, com 18 eletrodos de tungstênio e 16 canais, utilizado para o registro do potencial extracelular.

Para a realização da cirurgia que permitiu o acesso do arranjo de eletrodos, cada animal foi anestesiado com uretana (dose de 1400 mg/kg) e tricotomizado sobre a cabeça. Após a assepsia e fixado no aparato estereotáxico, uma incisão circular foi realizada e exposto o crânio. Algodão umedecido com soro fisiológico (NaCl 0,9%) foi colocado sobre os olhos do animal para evitar desidratação dos globos oculares. Com o uso de uma broca odontológica foi aberta uma janela de aproximadamente 3,0 mm (AP) por 2,0 mm (LL) sobre o hemisfério cerebral esquerdo, a dura-máter removida e a região coberta com um filme de ágar preparado em soro fisiológico para preservação do tecido. Após a cirurgia, cada animal, fixo no aparato estereotáxico, foi levado para a sala de registro e colocado no interior de uma caixa com isolamento acústico e de Faraday, construída em nosso laboratório, para minimização de ruídos sonoros e eletromagnéticos externos.

#### **4.2.2. Trilhas sonoras e protocolos de registro e estimulação acústica**

Trilhas de ruído branco para varredura e registro da resposta evocada foram produzidas no programa *Adobe Audition* (1.0) utilizando um mesmo pulso padrão (Figura 2). Um canal das trilhas foi dedicado ao estímulo sonoro e o outro à onda do desencadeadora do *trigger*, que ocorre simultaneamente ao início de cada pulso sonoro (Figura 2). O *trigger* consiste de um pulso elétrico (onda quadrada; 100 ms; 100 mV) gerado por um sistema de estimulação produzido em nosso laboratório e enviado para o sistema de registro, paralelamente ao fornecimento do estímulo sonoro ao animal, marcando o momento (*timestamp*) em que o estímulo acústico ocorre, permitindo-nos identificar, off-line, ao longo dos registros dos sinais bio-elétricos, os eventos que constituem a resposta evocada verificando-se, basicamente, o aumento ou diminuição da frequência de disparos frente o estímulo. Essa variação do número de disparos ao longo do tempo, incluindo os períodos pré e pós-estímulo, é apresentada na forma de histogramas peri-estímulo e gráficos de rastro (Figura 6). O estímulo sonoro foi amplificado (módulo amplificador Stetsom CL500HE, 2x120 W), fornecido por um *tweeter* (Selenium), e conduzido até a orelha media direita do animal por uma mangueira que se acopla à uma das barras fixadoras, perfurada, do aparato estereotáxico. A intensidade sonora na saída da barra estereotáxica foi de aproximadamente 95 dB SPL por pulso de ruído branco.

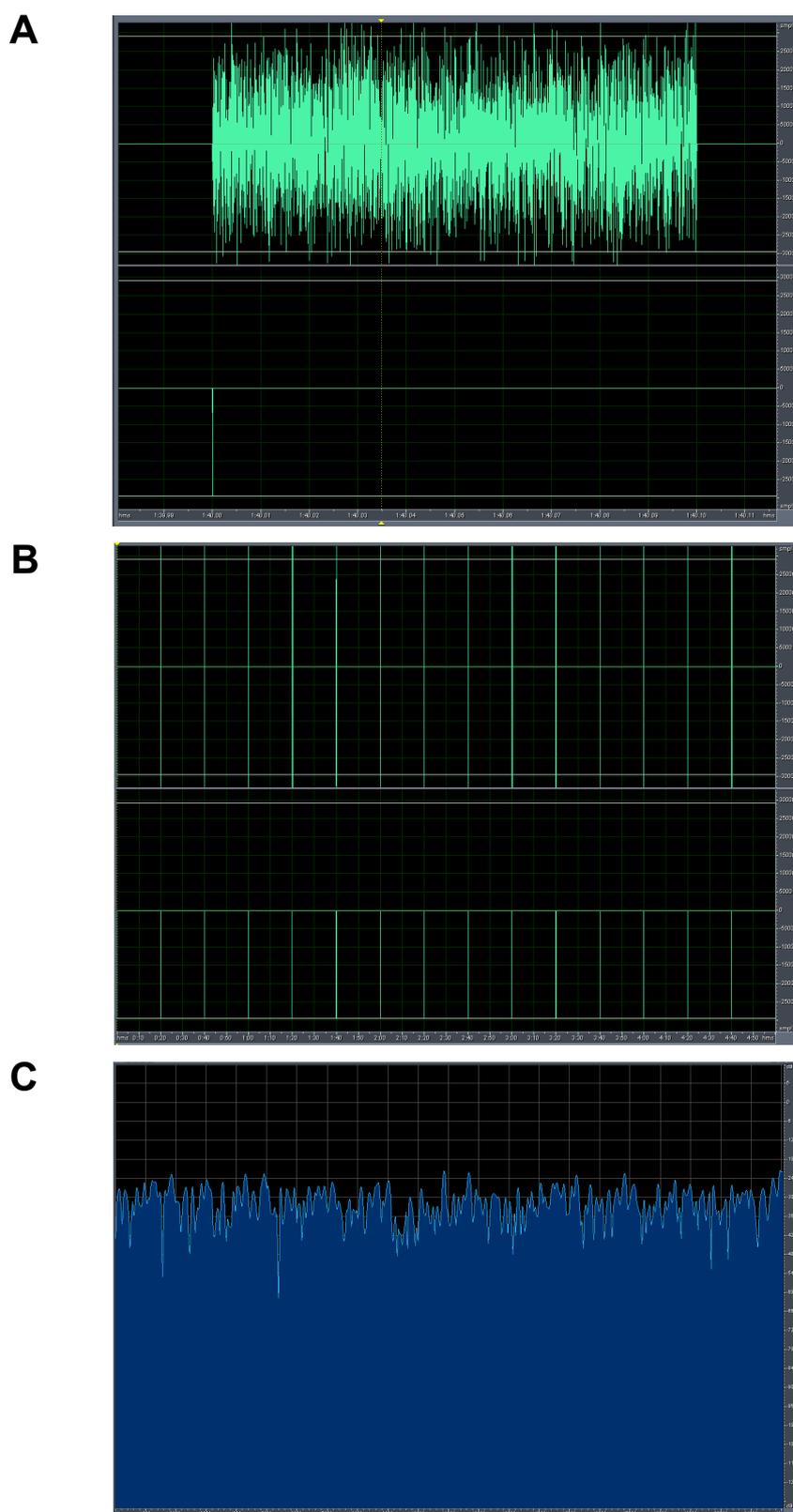


Figura 2. Pulso de ruído branco e onda desencadeadora do *trigger* (A) apresentado 15 vezes durante o protocolo de estimulação acústica (B). C: Espectro de energia por frequência do pulso.

A seguir, o detalhamento cronológico do protocolo de registro da atividade espontânea e das respostas evocadas auditivas a pulsos solitários quando pelo menos uma célula responsiva ao som foi detectada ao longo da varredura do eixo dorso-ventral. A mudança no padrão de resposta através dos 16 canais e uma distância mínima dorso-ventral de 0,3 mm foram os critérios considerados para diferenciação de diferentes conjuntos celulares ao longo da varredura.

1. Varredura dorsoventral: estimulação acústica com pulsos de 100 ms de ruído branco e palmas;
2. Registro da atividade espontânea das células responsivas encontradas;
3. Registro dos potenciais evocados auditivos: estimulação acústica com pulsos de 100 ms de ruído branco fornecidos 15 vezes a 0,05 Hz (a cada 20 s).

#### **4.2.3. Sistema de registro, amplificação, filtragem e digitalização**

O sinal eletroencefalográfico foi amplificado por um pré-amplificador *PZ2 Z-Series Preamplifier PZ32* e processado por um conversor *A/D RZ2 Multi-Channel Neurophysiology Workstation*, ambos da *Tucker-Davis Technologies*. A frequência de amostragem utilizada para aquisição do potencial extracelular foi de 24414 Hz e o sinal bruto foi filtrado com um passa alta de 300 Hz e um passa baixa de 8000 Hz.

#### **4.2.4. Classificação (*sorting*) dos disparos detectados, categorização das dinâmicas de resposta neuronal, agrupamento dos dados e variáveis analisadas**

Após os registros, foi realizado o *sorting* dos disparos usando o pacote de programas do fabricante do aparato de aquisição e digitalização (*OpenEx Tucker-Davis Technologies*) para a identificação de unidades celulares presentes. Foi empregado um algoritmo bayesiano com dimensões fixas, 03 componentes principais, método de distanciamento de *Mahalanobis*, intervalo de confiança de 95% e 01 iteração para a classificação dos disparos. Os trechos do registro com os disparos neuronais detectados adjacentes (0,5 s pré e 0,5 s pós) a cada um dos 15

estímulos acústicos apresentados, foram sobrepostos e os disparos neuronais somados e distribuídos em janelas temporais discretas (*bins*) com 10 ms de duração, e as células responsivas identificadas através da observação de histograma peri-estímulo e gráfico de rastro gerados por neurônio em *MatLab* (2009) (Figura 6). Um algoritmo foi implementado em *Excel* (*Office* 2008) (Figura 3) para confirmação da responsividade neuronal à estimulação acústica, e para classificação da célula quanto à latência, duração e sustentabilidade ou não da resposta, a partir da distribuição dos disparos evocados ao longo dos *bins*. Para isso, calculamos um limiar mínimo de disparos para identificação dos *bins* com resposta efetiva, acima do limiar, a partir da fórmula:

Limiar de resposta (LR) = Média de disparos espontâneos pré-estímulo por *bin* + Desvio padrão x 1,5.

O limiar de resposta foi calculado multiplicando o desvio padrão por 1,5 e somando esse produto à média de disparos espontâneos por *bin*, sendo os 10 s anteriores ao fornecimento dos estímulos de cada célula responsiva utilizado para cálculo da média de disparos espontâneos por *bin*. O trecho de 1 s com o somatório dos disparos peri-estímulo de cada célula foi processado pelo algoritmo e identificado os *bins* pós-início do estímulo com resposta evocada acima do limiar. Foram incluídas nas análises deste trabalho somente células responsivas.

Tradicionalmente analisa-se o número de disparos de potenciais de ação (frequência de disparo) frente ao estímulo como medida de atividade neuronal evocada. Adicionalmente, no caso do presente trabalho, o número de *bins* com número de disparos efetivamente acima da linha de base foi utilizada também como variável de atividade neuronal evocada e analisada comparativamente entre as linhagens. Além do número de *bins* responsivos, o número de disparos espontâneos pré-estímulo por *bin* e o número de disparos ocorridos frente a estimulação acústica por *bin* também foram analisados comparativamente entre as linhagens. Os registros eletrofisiológicos obtidos de 05 ratos Wistar resistentes e 05 ratos audiogênicos foram analisados pelo presente trabalho.

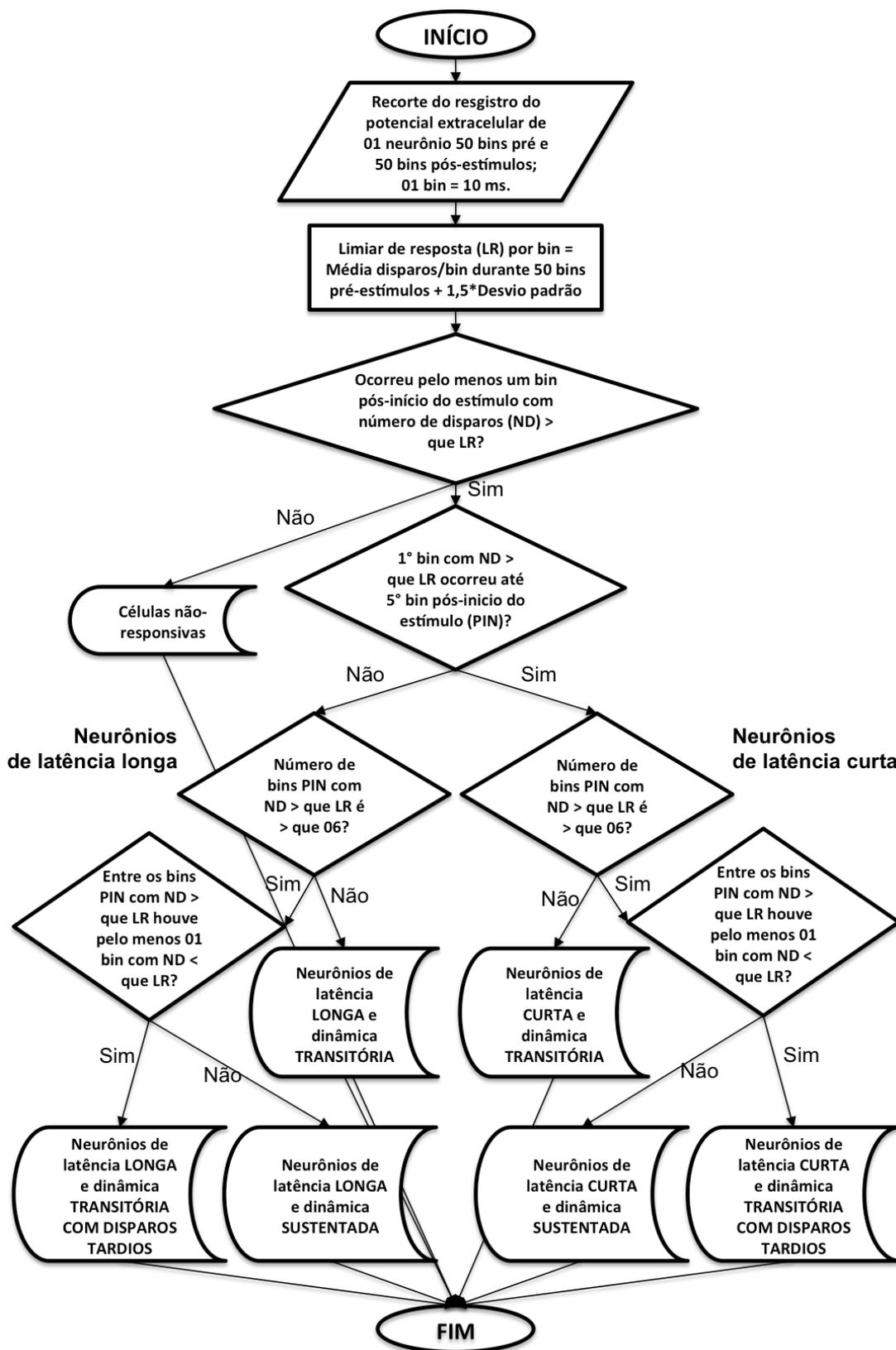


Figura 3. Diagrama de fluxo do algoritmo implementado em *Excel* (Office 2008) para confirmação da responsividade neuronal e classificação dos neurônios quanto à latência e duração/dinâmica da resposta.

#### 4.2.5. Histologia

Após término do registro, cada animal, ainda anestesiado, foi eutanasiado com uma superdose de uretana intra-peritoneal (03 vezes a dose de indução/manutenção em mg/kg) e perfundido intra-cardicamente com solução salina 0,9% e solução de paraformaldeído 4%. Os cérebros foram coletados e armazenados por 48 h em paraformaldeído 4% e, posteriormente, em sacarose 30% por 05 dias. Os cérebros foram então cortados em fatias sagitais de 50  $\mu$ m em um micrótomo criostato, e as fatias montadas em lâminas de vidro gelatinizadas. Estas foram desidratadas, coradas com vermelho neutro e montadas para posterior confirmação dos alvos do arranjo de eletrodos.

#### 4.3. ESTUDO ANATÔMICO DO DESENVOLVIMENTO DO CÉREBRO DE RATOS WISTAR AUDIOGÊNICOS

Para verificarmos se existem diferenças anatômicas entre o cérebro de animais audiogênicos e resistentes adultos e no padrão geral de seu desenvolvimento anatômico, a técnica de neuro-imagem por ressonância magnética foi empregada. Foi realizado um levantamento longitudinal de imagens cerebrais utilizando-se um *scanner* de magneto-ressonância de 4,7 Tesla (*Oxford Instruments*) no Centro de Treinamento e Pesquisa em Magneto-Ressonância da UFMG, sendo as imagens dos cérebros coletadas ao longo da vida de ratos Wistar normais (03 machos e 03 fêmeas) e WAR (02 machos e 03 fêmeas) nos dias 7, 14, 21, 28, 42 e 70 de idade.

- WAR: 30 imagens (05 animais X 06 registros de imagem);
- Wistar: 36 imagens (06 animais X 06 registros de imagem).

Um total de 66 imagens foram coletadas.

Para a realização das imagens os animais foram mantidos aquecidos com uma bolsa térmica e induzidos e mantidos anestesiados com isoflurano, utilizando-se uma mistura de ~3,5 e ~1,5% de anestésico com oxigênio, respectivamente. Os animais tiveram o cérebro segmentado em fatias coronais de 0,75 mm ou 1,0 mm de espessura.

### 4.3.1. Variáveis analisadas

O volume cerebral, incluindo o prosencéfalo, tronco e cerebelo, foi calculado, a espessura da massa cinzenta do córtex auditivo terciário medida, e uma aproximação bi-dimensional bilateral da área do colículo inferior, obtida a partir da altura e largura da placa quadrigêmea na porção antero-posterior em que somente o colículo inferior se faz presente, de uma única fatia. Todas estas variáveis foram normalizadas pelo peso do animal anotado no dia do registro por ressonância magnética. A espessura cortical foi medida bilateralmente utilizando a fissura rinal como referência dorso-ventral inferior ao local da medida, e a extremidade rostral do hipocampo ventral como referência antero-posterior para coleta. A média aritmética das medidas corticais bilaterais foi utilizada para mitigar o erro associado ao alinhamento eventualmente incorreto do animal no interior do aparelho de ressonância magnética. Para o cálculo da aproximação bi-dimensional da área dos colículos inferiores, medimos bilateralmente a *altura* (vetor com direção médio-dorsal/latero-ventral sobre o eixo maior de cada colículo) destes e calculamos a média aritmética dessas duas medidas. Medimos também a *largura* dos colículos inferiores, traçando um vetor horizontal abrangendo ambos colículos no corte coronal, sobre o limite dorsal do aqueduto. A aproximação bidimensional da área dos colículos inferiores foi então calculada multiplicando-se a média das *alturas* pela *largura* horizontal de uma única fatia por animal, por idade. As medidas do colículo inferior foram realizadas em fatias em que o colículo superior encontra-se ausente, na porção antero-posterior em que o limite caudal do córtex ainda aparece ou na porção entre o córtex e o cerebelo, rostralmente a área postrema. As medidas do córtex auditivo terciário e da área aproximada dos colículos inferiores foram calculadas em animais com 21, 28, 42 e 70 dias de idade. As imagens foram visualizadas, os volumes cerebrais construídos e os vetores de comprimento medidos usando o programa *MeVisLab* (*MeVis Medical Solutions AG*).

#### 4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram aplicados testes estatísticos paramétricos para comparação das médias e das variâncias. Análises de variância de uma via foram utilizadas para comparações intra-linhagem e de duas vias para comparações entre as linhagens. Testes *post hoc* de Bonferroni e *t* foram utilizados para comparação das médias. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão, exceto pelas variáveis *média de disparos por bin*, *espessura cortical normalizada* e *área aproximada dos colículos inferiores*, apresentadas na forma de média  $\pm$  erro em torno da média. Os resultados do estudo anatômico, devido as parcelas perdidas, foram analisados usando a análise de variância de uma via. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . Ao invés de símbolos, os valores de  $p$  foram expostos nos gráficos e, quando menor que 0,05, estes foram colocados em negrito. A sigla “ns” foi empregada quando  $p$  foi próximo de 0,99. Na maioria dos gráficos, o número de animais e células por grupo analisado estão expostos, sendo referidos por “N” e “n”, respectivamente.



B)

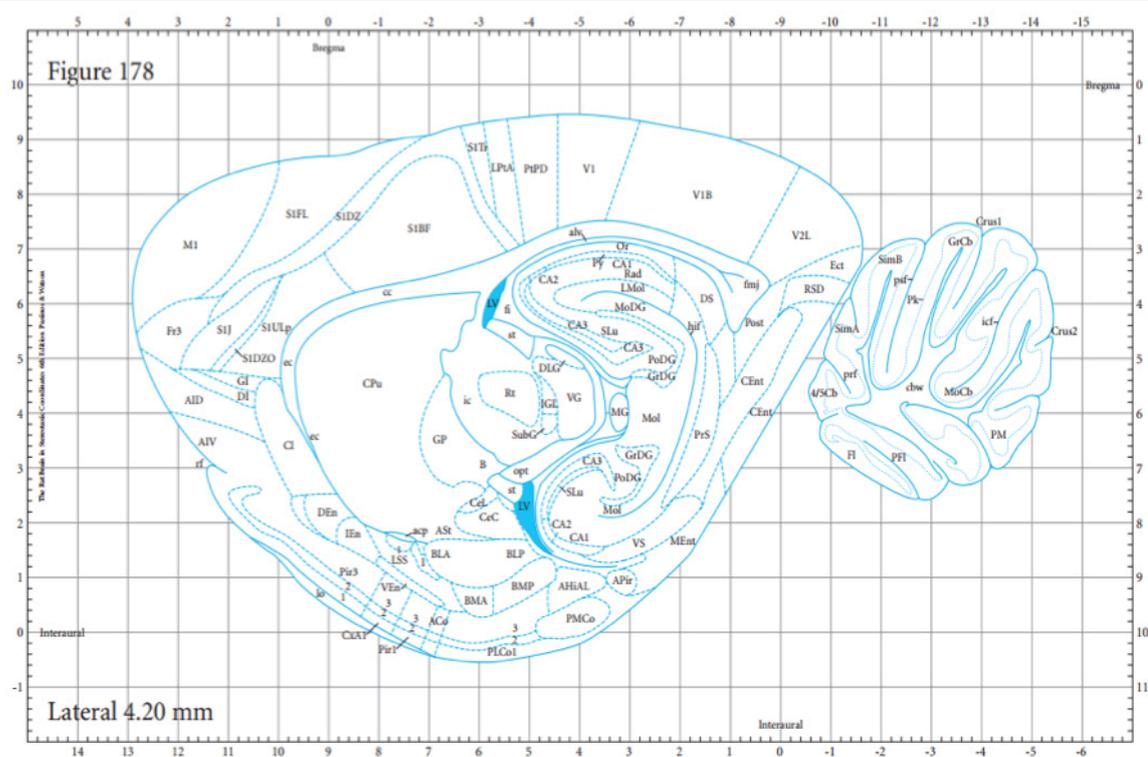


Figura 4. Cortes cerebrais sagitais mostrando rastro do arranjo que atravessou o CPU e alcançou a amígdala basolateral (setas) e esquema anatômico correspondente do atlas Paxinos (1986). A: região mais lateral; B: região mais medial.

### 5.1.2. Sinal elétrico registrado

Abaixo, um recorte do registro do potencial extracelular de 01 canal, *online*, com resposta multi-unitária evocada aparente.

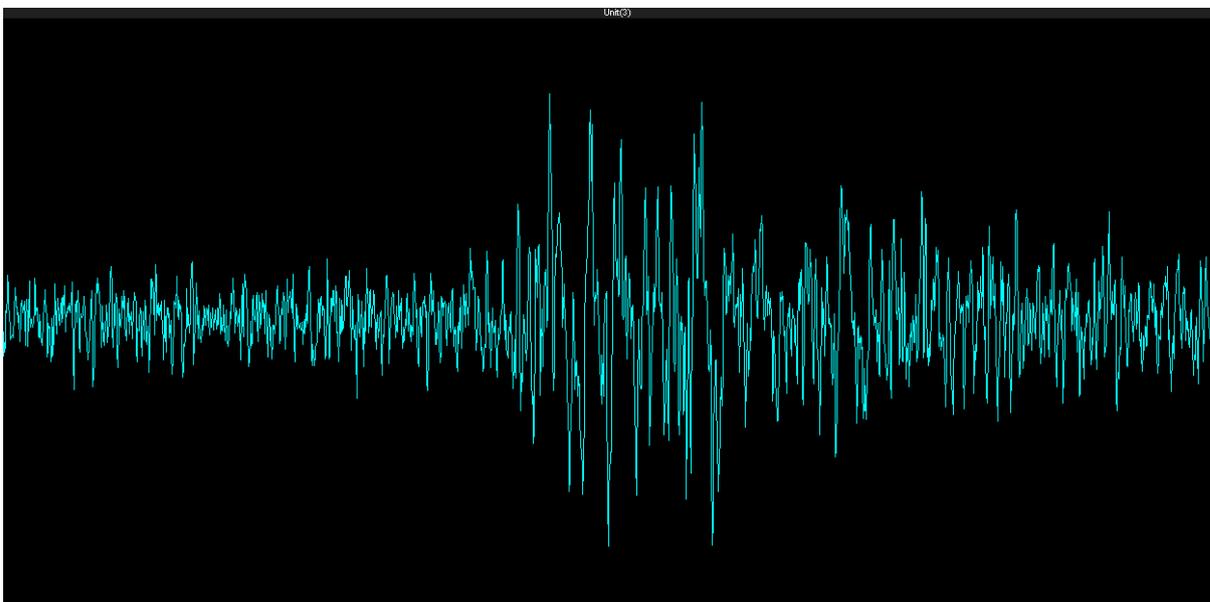


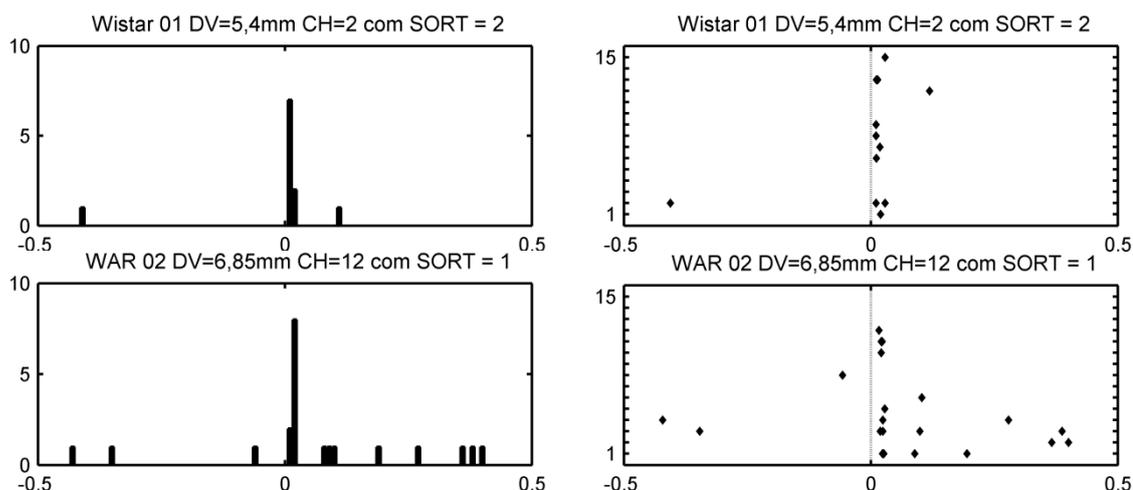
Figura 5. Recorte de um canal dos registros multi-unitário realizados, mostrando resposta evocada.

### 5.1.3. Resultados e Discussão

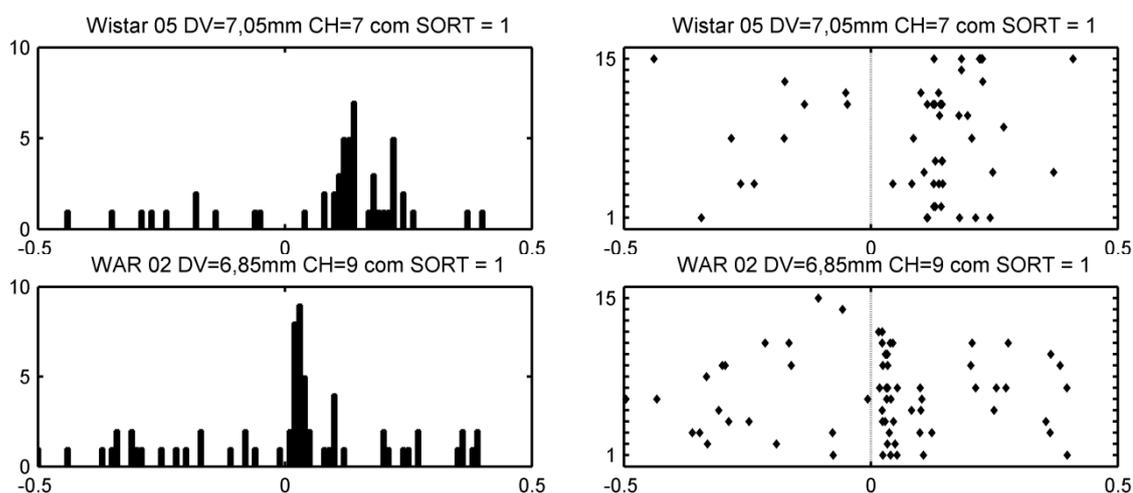
A partir do *sorting* foram identificadas e analisadas um total de 118 células responsivas, sendo 57 encontradas em ratos audiogênicos e 61 em ratos resistentes, destas 60 na ABL e 58 no CPu (Tabela 1). Os parâmetros e as dinâmicas temporais das respostas evocadas auditivas observadas e verificadas pelo algoritmo implementado estão de acordo com o observado na ABL e no CPu de ratos Sprague-Dawley adultos por BORDI e colaboradores (1992 e 1993) que usaram como anestésico hidrato de cloro. Nos WAR, encontramos 55 células com respostas de latência curta (resposta recente), iniciando entre 10-30 ms, e 02 células com latência longa, iniciando entre 60-150 ms (resposta tardia). Entre estas células, 20 apresentaram resposta transitória, que duram de 10-60 ms; 19 células apresentaram resposta sustentada, com duração mínima aproximada de 90 ms, e 18 células com resposta transitória seguida de disparos tardios (Tabela 2). Nos ratos resistentes encontramos 47 células de resposta recente e 14 com resposta tardia. Entre estas células, 24 apresentaram resposta transitória, 20 apresentaram resposta sustentada e 17 células resposta transitória seguida de disparos tardios (Tabela 2).

A seguir são apresentados exemplos de cada um dos tipos celulares encontrados, classificados de acordo com a latência e a dinâmica da resposta (Figura 6, Tabelas 1 e 2).

### TRANSITÓRIA



### TRANSITÓRIA COM RESPOSTA TARDIA



### SUSTENTADA

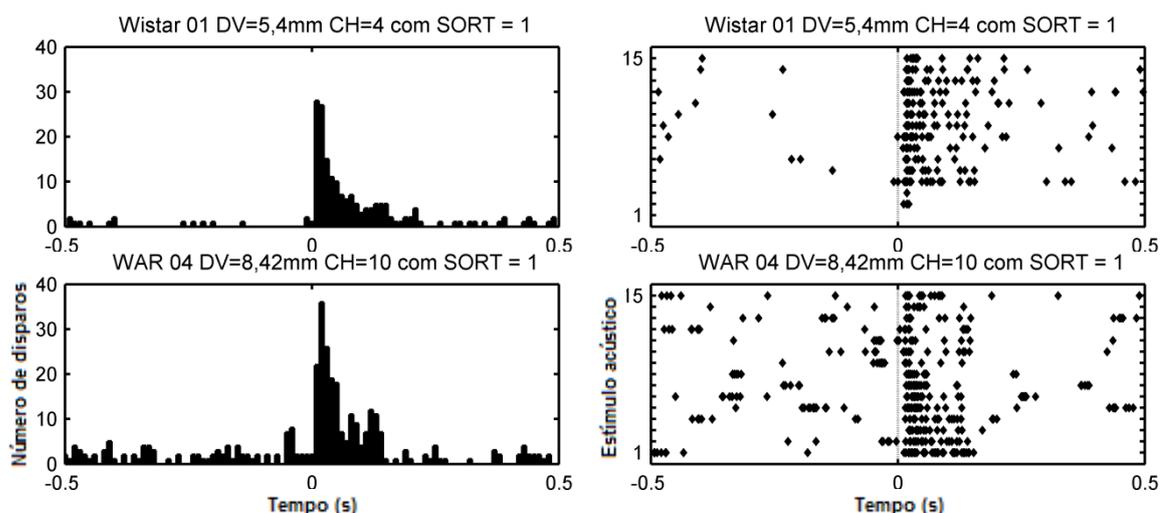


Figura 6. Histogramas peri-estímulo (à esquerda) e gráficos de rastro (à direita) de exemplos de células com dinâmica transitória, transitória com resposta tardia, ou sustentada. Em ambos os gráficos o eixo das abscissas corresponde ao tempo, em segundos, dividido em bins de 10 ms. O momento zero corresponde ao fornecimento do estímulo. Todas as células apresentadas com resposta de latência curta, exceto pela célula do rato Wistar 05, apresentando latência longa.

Para as análises estatísticas as células foram agrupadas de diferentes formas, sendo selecionadas a partir dos critérios latência de resposta, duração da resposta, e/ou região em que foram encontradas.

Tabela 1. Número de células por região de origem, por linhagem.

Linhagem	Região		Total
	CPu	ABL	
Resistente	39	22	61
WAR	19	38	57
Total	58	60	

Tabela 2. Número de células por categoria de resposta, por linhagem, distribuídas considerando-se a latência e a duração da resposta.

	Dinâmica						Total
	Transitória		TRTardia		Sustentada		
	Curta	Longa	Curta	Longa	Curta	Longa	
Resistente	22	2	11	6	14	6	61
WAR	18	2	20	0	17	0	57
Total	40	4	31	6	31	6	118

Para verificarmos a capacidade discriminativa do algoritmo de classificação da dinâmica temporal das respostas, analisamos a variável *número de bins supra-limiar* (número de *bins* responsivos) das respostas evocadas, agrupando-as independente da região em que foram encontradas e se são de latência curta ou longa, aplicando somente o critério duração (Figura 7). Como as células do caudado-putamen apresentam latências e dinâmica de resposta similar as observadas na ABL (BORDI *et al.*, 1992; BORDI *et al.*, 1993), sendo importantes para o processamento imediato de informação acústica inclusive durante paradigmas de aprendizagem e memória emocional (WHITE e REBEC, 1993) e espacial (ADAMS *et al.*, 2001), e considerando as evidências apresentadas de amplo comprometimento cerebral dos WAR, por uma amostragem mais ampla, agrupamos as células encontradas na ABL e no CPu para a análise estatística

(Figura 7), assim como fizeram BORDI e colaboradores (1992 e 1993). Vale ressaltar que a variável *número de bins-supra-limiar*, uma medida indireta de duração da resposta, permite que células cujas respostas comecem em diferentes momentos frente o estímulo, isto é, células com diferentes latências, sejam incluídas em um mesmo grupo.

Para verificarmos se as variâncias da resposta *número de bins supra-limiar* varia entre as dinâmicas transitória, sustentada e transitória com resposta tardia, realizamos o teste ANOVA de uma via intra-linhagem e, para verificarmos se as médias foram significativamente diferentes, realizamos o teste *post hoc* de Bonferroni. Nos ratos resistentes as variâncias foram significativamente diferentes, assim como as médias. No caso dos WAR, as médias foram significativamente diferentes, mas não as variâncias. Em ambas as linhagens, as respostas por dinâmica celular apresentaram distribuição normal (Figura 7). A comparação das médias entre as linhagens, realizada após análise de variância de duas vias, revelou diferença significativa somente entre as células de dinâmica sustentada e uma aproximação da significância entre as células transitórias com resposta tardia (Figura 7). Observando-se a relação entre as respostas de ambas as linhagens verifica-se que, quanto ao número de bins-supra-limiar, a relação se inverte quando contrastando as células de dinâmica transitória com as células de dinâmica sustentada e dinâmica transitória seguida de disparos tardios.

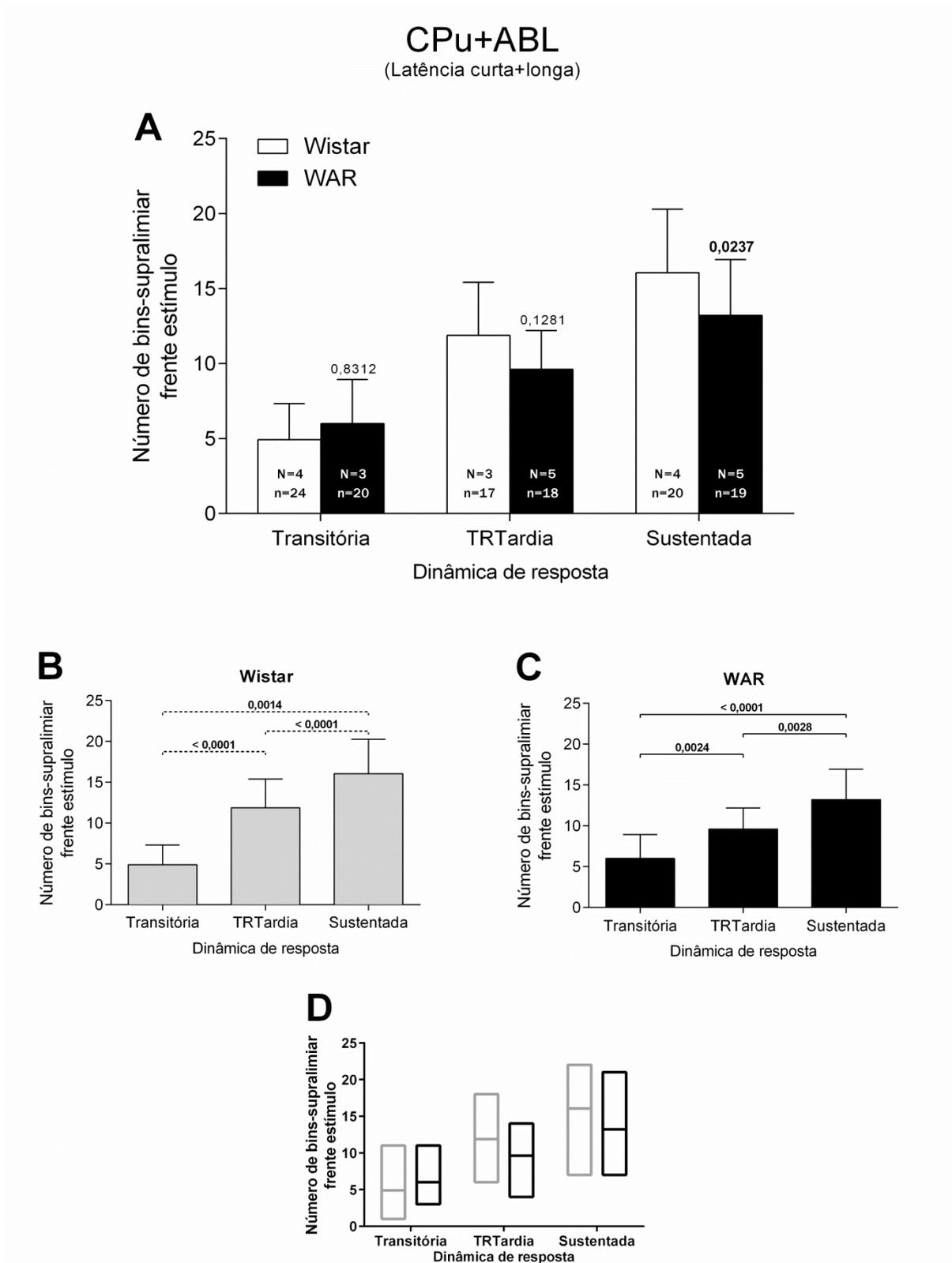


Figura 7. Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de todos os neurônios frente à apresentação de 15 pulsos de ruído branco. Critério único de agrupamento das células: dinâmica da resposta. A: Análise de variância de duas vias entre as linhagens. B (Wistar resistente) e C (WAR): Análises de variância de uma via intra-linhagem. D: Média, valores mínimo e máximo de bins-supralimiar. Demais resultados (A-C) apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  apresentados em negrito.

Neste momento é importante esclarecer que não foi possível realizar todas as comparações possíveis entre as linhagens devido a não termos encontrado certos tipos celulares nos WAR e, em outros casos, o número de células encontradas, enquadradas a partir de um determinado critério, não ter sido o suficiente para análise estatística. A partir deste ponto são apresentados os resultados das análises de células agrupadas seguindo critérios mais restritivos, incluindo, além do parâmetro *duração* da resposta, os parâmetros *latência de resposta* e/ou o critério *localização dorso-ventral* da célula encontrada, isto é, se foi encontrada no caudado-putamen ou na amígdala basolateral. Foram aplicados testes *t* não-pareados para comparação das médias. Nas figuras 8-11 estão apresentadas células com dinâmica sustentada encontradas na amígdala basolateral e células de latência curta com dinâmica transitória, transitória com disparos tardios, ou sustentada, encontradas no caudado-putamen.

Na ABL, verificou-se que o número de bins-supra-limiar das respostas de células de dinâmica sustentada, agrupadas independente da latência, é significativamente menor nos WAR em comparação com os ratos resistentes (Figura 8).

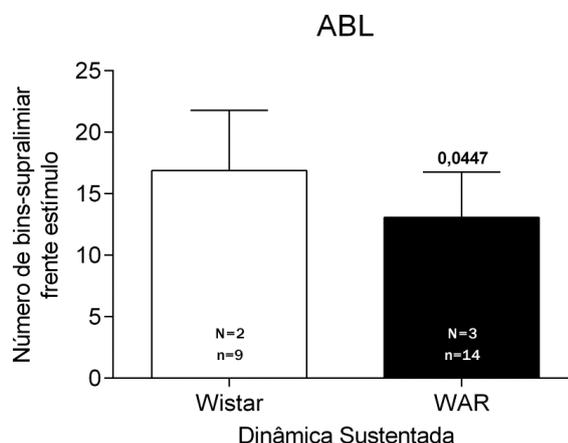


Figura 8. Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de células com dinâmica sustentada da amígdala basolateral frente à apresentação de 15 pulsos de ruído branco. Critérios de agrupamento das células: dinâmica da resposta e região. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Teste *t* de Student. Valor de p apresentado sobre a barra.

No CPu, analisamos separadamente as células de latência curta com dinâmicas transitória, transitória seguida de disparos tardios e sustentadas. Na Figura 9 verifica-se que o número de bins-supra-limiar das respostas de células de

latência curta com dinâmica transitória é significativamente maior nos WAR que nos ratos resistentes. Entre as células de latência curta com dinâmica transitória seguida de disparos tardios, ao contrário, a resposta dos WAR foi significativamente menor (Figura 10). Não verificou-se diferença significativa entre as linhagens quanto as células de latência curta e dinâmica sustentada (Figura 11), no entanto, a relação entre as respostas de ambas as linhagens se mantém de acordo com o observado na Figura 7.

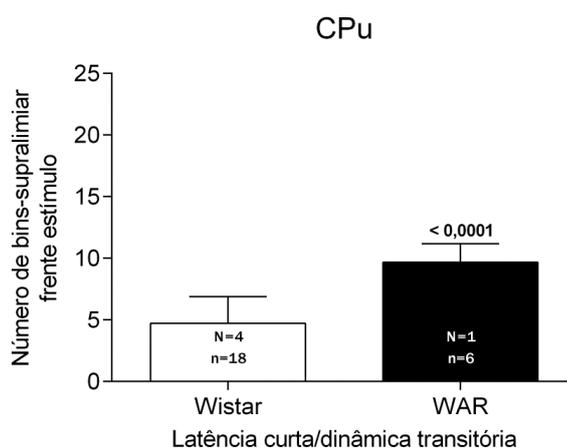


Figura 9. Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de células com latência curta e dinâmica transitória do caudado-putamen frente à apresentação de 15 pulsos de ruído branco. Critérios de agrupamento das células: latência da resposta, dinâmica da resposta e região. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Teste *t* de Student. Valor de *p* apresentado sobre a barra.

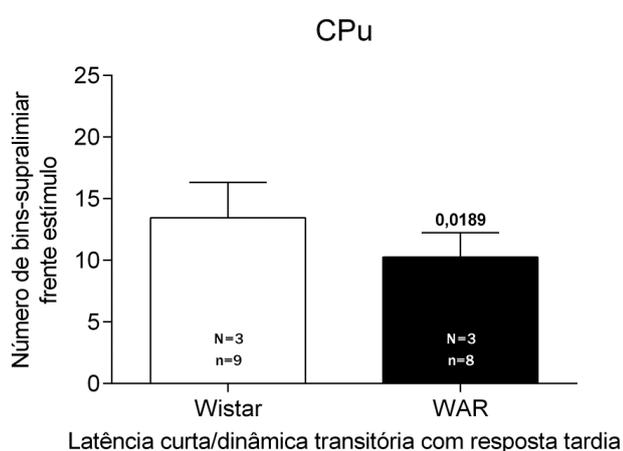


Figura 10. Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de células com latência curta e dinâmica transitória com resposta tardia do caudado-putamen frente à apresentação de 15 pulsos de ruído branco. Critérios de agrupamento das células: latência da resposta, dinâmica da resposta e região. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Teste *t* de Student. Valor de *p* apresentado sobre a barra.

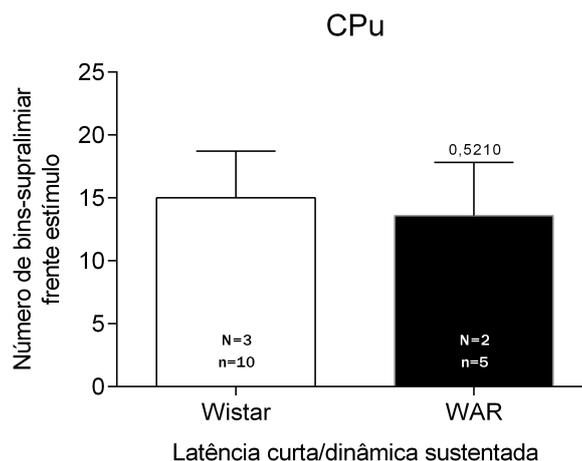


Figura 11. Número de bins-supralimiar das respostas evocadas de células com latência curta e dinâmica sustentada do caudado-putamen frente à apresentação de 15 pulsos de ruído branco. Critérios de agrupamento das células: latência da resposta, dinâmica da resposta e região. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Teste *t* de Student. Valor de *p* apresentado sobre a barra.

Nas Figuras 12 A-C e 13 são apresentados os resultados do protocolo de estimulação com ruído branco a partir da análise da variável *número de disparos* ocorridos frente o fornecimento do estímulo. As células analisadas são de latência curta e estão agrupadas de acordo com o critério duração da resposta, ignorando a região de origem. Na Figura 13 verifica-se que o número total de disparos frente o estímulo em uma janela de 0,3 s não varia significativamente entre as linhagens. Ainda que somente o parâmetro *dinâmica* tenha sido fonte significativa de variação a partir da ANOVA de duas vias, percebe-se uma distribuição diferente das respostas entre as linhagens (Figura 13). Além disso, os picos de atividade das células curta-transitórias de ambas as linhagens ocorrem em diferentes momentos, sendo nos WAR mais tardio o pico (Figura 12 A). A análise das células curta-transitórias com disparos tardios mostra que a intensidade da resposta dos animais resistentes é significativamente maior que dos WARs entre 10-30 ms após o início do estímulo (Figura 12 B). Quanto às células curta-sustentadas não se observou diferença significativa em relação a nenhum dos *bins* (Figura 12 C), sendo ou o número de células analisadas insuficiente, ou as diferenças mais sutis. Observa-se, a partir de 240 ms, atividade aumentada persistente dos neurônios dos WAR (Figura 12 C), o que corrobora com o verificado na Figura 14 A.

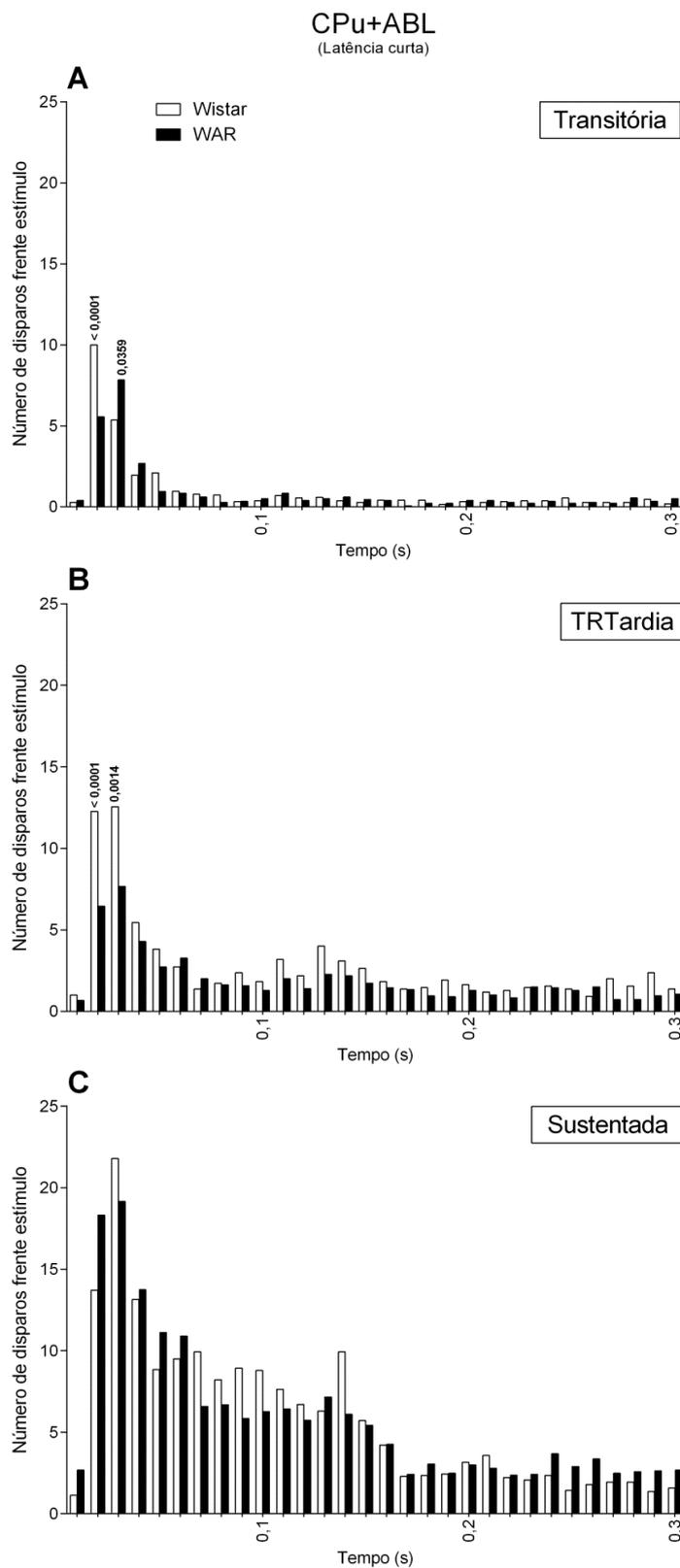


Figura 12. Número de disparos evocados por bin (10 ms) frente a apresentação de 15 pulsos de ruído branco em uma janela de 300 ms. Critérios de agrupamento das células: latência e dinâmica da resposta. A: Células com latência curta e dinâmica transitória. B: Células com latência curta e dinâmica transitória com disparos tardios. C: Células com latência curta e dinâmica sustentada. Resultados apresentados na forma de média. Valores de  $p < 0,05$  apresentados sobre as barras.

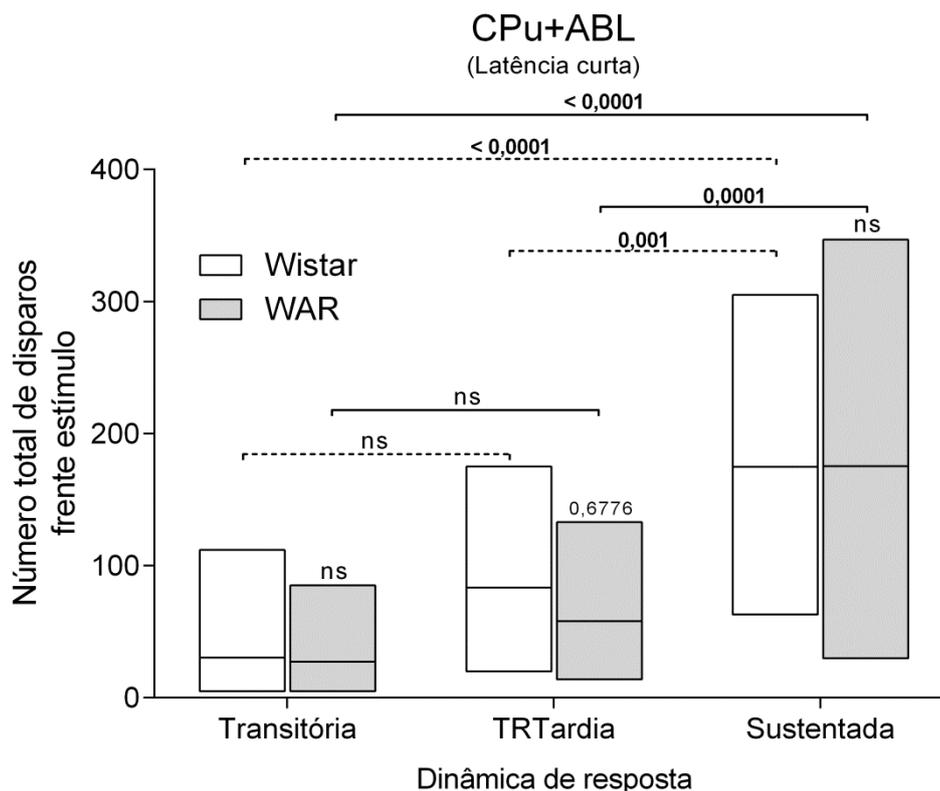


Figura 13. Número total de disparos evocados frente à apresentação de 15 pulsos de ruído branco em uma janela de 300 ms. Critérios de agrupamento das células: latência da resposta e dinâmica da resposta. Valores de p resultantes da análise de variância de duas vias apresentados sobre as barras. Colchetes indicam as comparações realizadas pelas análises de variância de uma via intra-linhagem, com os respectivos valores de p, acima. As extremidades das barras indicam os valores mínimo e máximo da variável observada, a linha contínua interna indica a média, e a linha pontilhada o desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  em negrito.

Analizamos também a atividade espontânea anterior ao fornecimento dos estímulos acústicos (Figuras 14-18). As médias de disparos espontâneos de cada célula, ocorridos nos 10 segundos anteriores aos estímulos de ruído branco, por bin de 10 ms, foram utilizadas para o cálculo do número médio de disparos espontâneos por bin para cada categoria celular. Os grupos de células comparados são os mesmos grupos cujos números de bins supra-limiar foram analisados, apresentados anteriormente.

Na Figura 14 A estão apresentadas as médias de disparos espontâneos de células agrupadas de acordo somente com a duração da resposta. Observa-se diferença significativa entre as linhagens somente entre as células com dinâmica sustentada. Quando se comparou as médias intra-linhagem, verificou-se, nos WAR, que a média de disparos espontâneos por bin das células sustentadas é significativamente maior que as médias das células transitórias e das células

transitórias seguidas de disparos tardios (Figuras 14 A). Não verificou-se diferença significativa entre as médias das células transitórias e das células transitórias com resposta tardia dos WAR (Figuras 14 A). Quanto aos animais resistentes, o padrão foi semelhante, verificando-se diferença significativa entre a média do número de disparos espontâneos das células sustentadas comparada com as médias das células transitórias ou transitórias com resposta tardia. Apesar de não significativo, observa-se uma forte tendência de as médias das células transitórias e transitórias com resposta tardia serem diferentes.

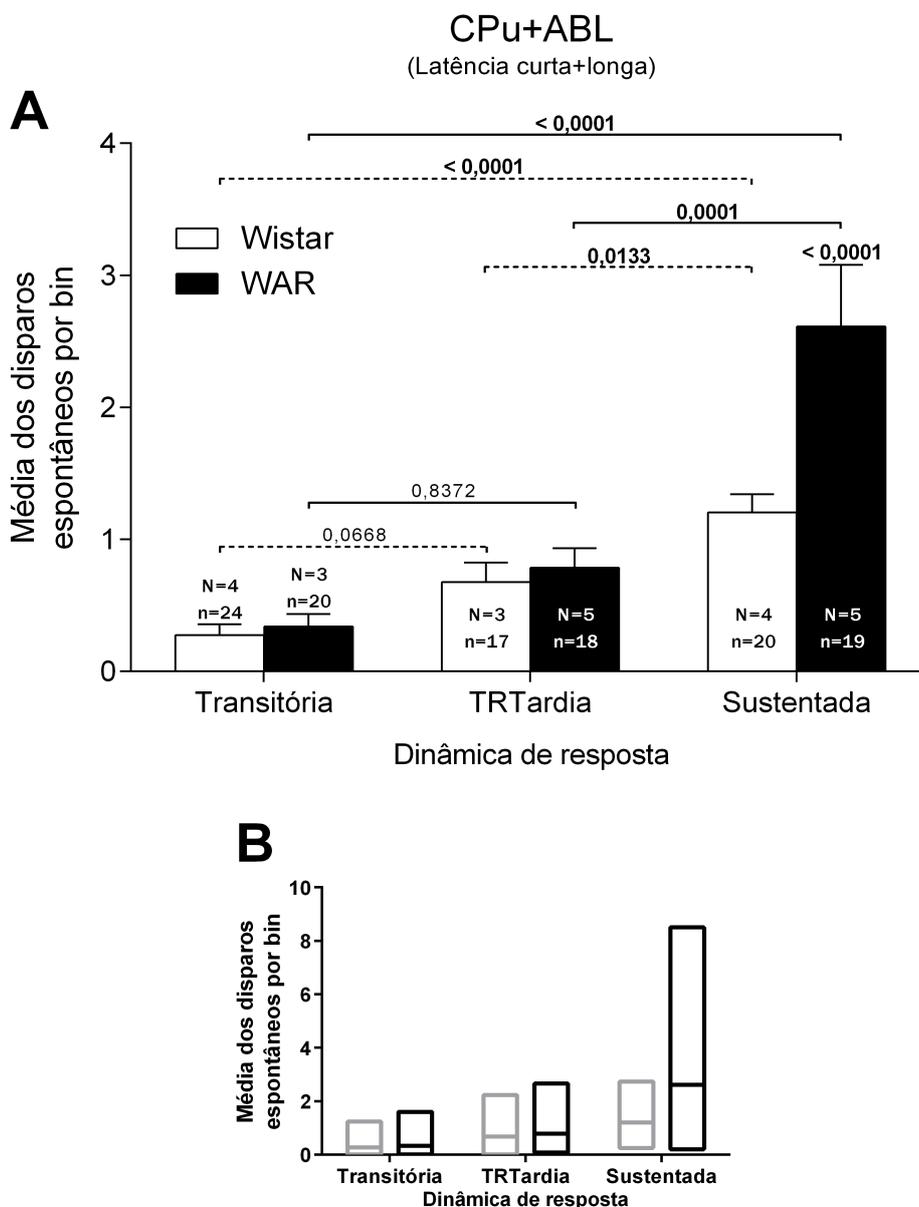


Figura 14. Média do somatório de disparos espontâneos de células responsivas por bin (10 ms), ocorridos durante os 10 s anteriores a cada um dos 15 estímulos apresentados. Critério único de agrupamento das células: Dinâmica da resposta. A: Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  erro em torno da média. Valores de p resultantes da análise de variância de duas vias das células transitórias e TRTardia omitidos pois próximos de 0,99. Colchetes indicam as comparações realizadas pelas análises de variância de uma via intra-linhagem, com os respectivos valores de p, acima. B: Média, valores mínimo e máximo da resposta observada em A; barras de traçado preto referem-se aos WAR. Valores de  $p < 0,05$  em negrito.

Na ABL, verifica-se que a média de disparos espontâneos por bin de células com dinâmica sustentada é significativamente maior nos WAR que nos animais resistentes (Figura 15).

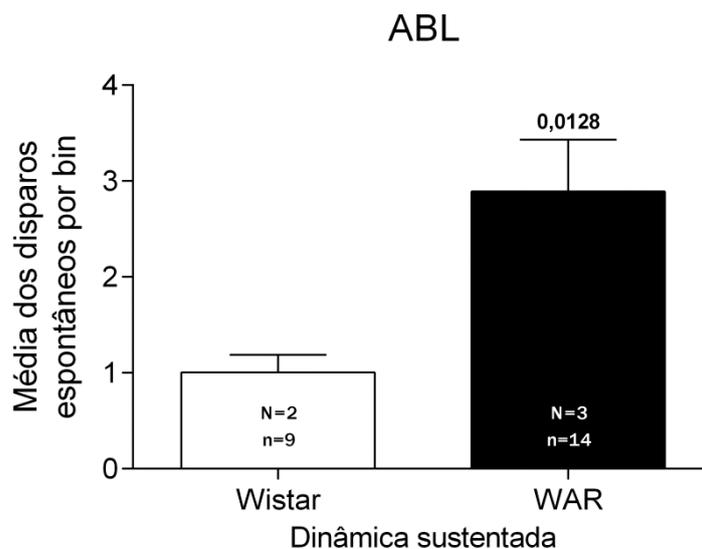


Figura 15. Média do somatório de disparos espontâneos por bin (10 ms) de células responsivas com dinâmica sustentada encontradas na amígdala basolateral, ocorridos durante os 10 s anteriores a cada um dos 15 estímulos apresentados. Critérios de agrupamento das células: Dinâmica da resposta e região. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  erro em torno da média. Teste t de Student. Valor de p apresentado sobre a barra.

No CPu, verifica-se que as médias dos disparos espontâneos das células de latência curta e dinâmica transitória de ambas as linhagens são muito próximas (Figura 16). Quanto às células de latência curta e dinâmica transitória com disparos tardios, verifica-se que a restrição por região tendeu a aumentar a diferença entre as linhagens, sendo a média dos WAR claramente menor, apesar de não-significativa a diferença (Figura 17). Na Figura 18 observa-se que não houve significância na comparação das médias das células curta-sustentadas entre as linhagens.

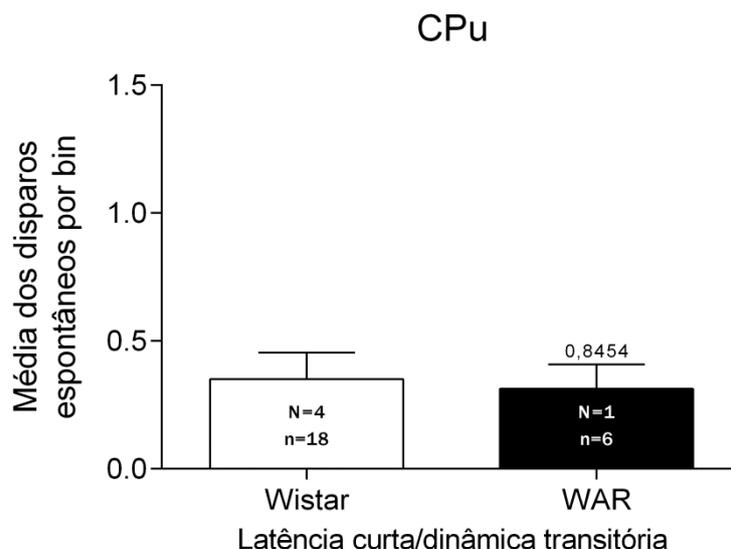


Figura 16. Média do somatório de disparos espontâneos por bin (10 ms) de células responsivas com latência curta e dinâmica transitória encontradas no caudado-putamen, ocorridos durante os 10 s anteriores a cada um dos 15 estímulos apresentados. Critérios de agrupamento das células: latência da resposta, dinâmica da resposta e região. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  erro em torno da média. Teste t de Student. Valor de p apresentado sobre a barra.

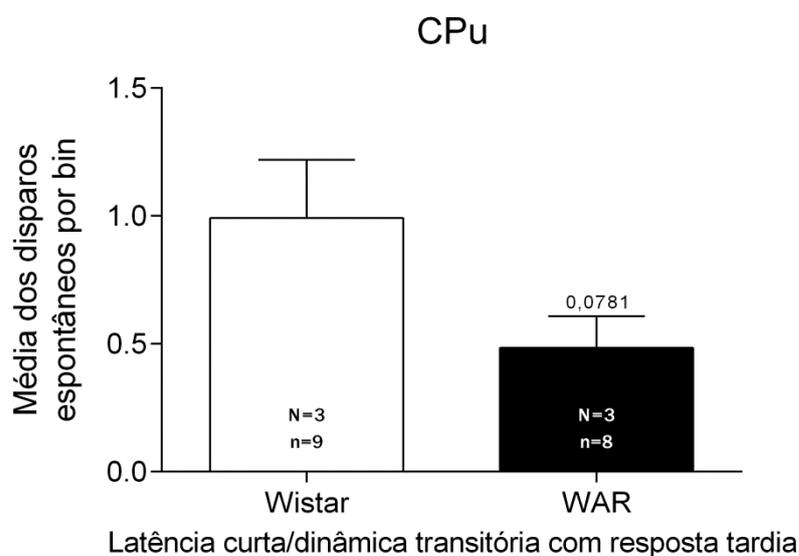


Figura 17. Média do somatório de disparos espontâneos por bin (10ms) de células responsivas com latência curta e dinâmica transitória com disparos tardios encontradas no caudado-putamen, ocorridos durante os 10s anteriores a cada um dos 15 estímulos apresentados. Critérios de agrupamento das células: latência da resposta, dinâmica da resposta e região. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  erro em torno da média. Teste t de Student. Valor de p apresentado sobre a barra.

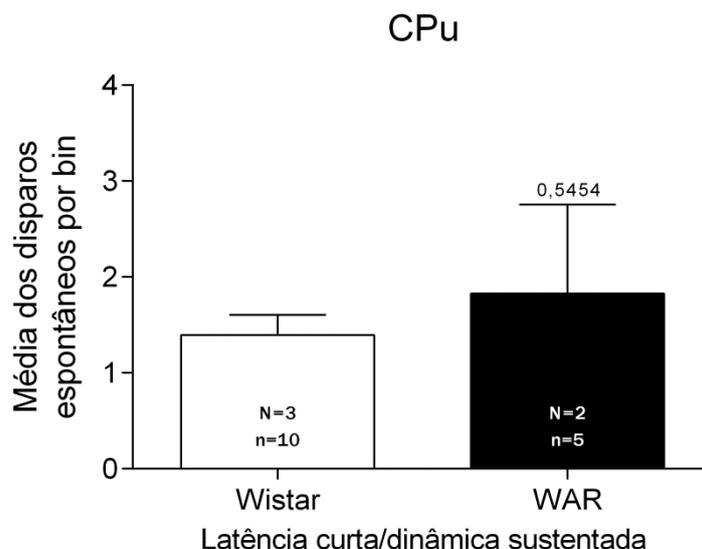


Figura 18. Média do somatório de disparos espontâneos por bin (10 ms) de células responsivas com latência curta e dinâmica transitória encontradas no caudado-putamen, ocorridos durante os 10 s anteriores a cada um dos 15 estímulos apresentados. Critérios de agrupamento das células: latência da resposta, dinâmica da resposta e região. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  erro em torno da média. Teste t de Student. Valor de p apresentado sobre a barra.

Verificamos que WARs não-abrasados apresentam processamento de informação auditiva alterado na ABL e no CPu, regiões importantes para epileptogênese prosencefálica e para modulação das crises audiogênicas, respectivamente.

A variável *número de bins-supra-limiar* é uma medida indireta de duração da resposta neuronal. Sob esse enfoque verificamos que a diferença entre as linhagens, quanto à duração efetiva das respostas evocadas, depende da dinâmica intrínseca da resposta neuronal. As análises intra-linhagem apresentadas na Figura 7 e o fato do número de bins-supralimiar variar, através das três dinâmicas, seguindo uma certa proporcionalidade em relação a dinâmica intrínseca da resposta, mostra a sensibilidade da classificação pelo algoritmo implementado. Quando analisamos a relação entre as linhagens por dinâmica de resposta, verificamos que a diferença entre elas se pronuncia a medida que a dinâmica intrínseca de resposta torna-se mais longa, alcançando significância entre as médias das células sustentadas (Figura 7). Considerando-se a dinâmica das células com resposta transitória seguida de disparos tardios como intermediária, quantitativamente, entre as dinâmicas transitória e sustentada, verifica-se, nos WAR, que as células com dinâmica naturalmente mais longa, apresentam respostas progressivamente mais

curtas, comparadas com as de ratos resistentes (Figura 7). Em relação ao número de bins-supra-limiar, a relação entre as respostas dos WAR e as dos animais resistentes observadas na Figura 7 manteve-se ao longo das demais análises (Figuras 8-11), independente da latência da resposta e da região a qual as células pertencem.

Podemos observar na Figura 13 que as médias do número total de disparos evocados por célula, durante 300 ms após o início dos estímulos, são praticamente as mesmas entre as linhagens para as dinâmicas transitória e sustentada, e muito próximas, considerando as células transitórias com resposta tardia, o que sugere uma distribuição temporal diferente dos disparos entre as linhagens para cada tipo celular. De fato, o pico de atividade das células transitórias do WAR é 10 ms mais tardio que dos ratos resistentes (Figura 12 A), o que está de acordo com a tendência observada na Figura 7 em relação ao número de bins-supra-limiar, e com a diferença encontrada entre as células transitórias do CPu na Figura 9. O número de disparos das células transitórias com resposta tardia dos animais resistentes é significativamente maior imediatamente após o início do estímulo, mantendo-se elevada durante praticamente todo o trecho de 300 ms (Figura 12 B), corroborando a diferença observada em relação ao número de bins-supra-limiar para este tipo celular nas Figuras 7 e 10. Quanto ao número de disparos por bin das células sustentadas (Figura 12 C), ainda que não verificada diferença significativa, o número de disparos das células sustentadas do WAR decaem, aparentemente, mais rápido que dos Wistar resistentes, fato evidenciado pela resposta mais curta das células sustentadas (Figura 7 e 8).

Quando analisamos conjuntamente as variáveis *número de bins-supra-limiar* e *média do número de disparos espontâneos por bin*, verificamos que é marcante a diferença na atividade espontânea e no número de bins-supra-limiar entre as linhagens, das células com dinâmica sustentada (Figuras 7 e 14; 8 e 15). Poderíamos inferir uma relação grosseira de proporcionalidade inversa entre o número de bins-supra-limiar e a atividade espontânea, pois ao contrário do observado em relação às células sustentadas, as médias da atividade espontânea, entre as linhagens, das células transitórias, são praticamente as mesmas (Figuras 14 A e 16), enquanto nos WAR as respostas apresentam forte tendência a serem mais longas como observado nas Figuras 7 e 9. Aparentemente, quando a atividade basal é similar, como no caso das células transitórias, a resposta evocada nos WAR

se manifesta não como uma maior frequência de disparo (Figura 13), mas como um atraso ou como uma sustentação ligeiramente maior da resposta (Figuras 7 e 14; 9 e 16). Em relação às células sustentadas do WAR, se esperaria que a atividade espontânea aumentada refletisse em um número total de disparos neuronais mais elevado, no entanto, isso não foi observado (Figura 13). A maior frequência de disparos espontâneos dos neurônios com dinâmica sustentada dos WAR, ao contrário, leva, aparentemente, a uma saturação mais rápida de sua atividade, encurtando sua resposta em comparação com os ratos resistentes (Figuras 8 e 15; 11 e 18). Um fenômeno de saturação é altamente plausível, considerando que a taxa de disparos de um neurônio ou circuito é mantida, por mecanismos homeostáticos, em uma faixa limitada de atividade (POPESCU e PARE, 2011; MIDDLETON *et al.*, 2008; IBATA *et al.*, 2008; TURRIGIANO, 2008; TURRIGIANO, 1999). Haveria uma relação de proporcionalidade inversa entre a duração da resposta e a atividade espontânea, não fosse pelo fato de as células transitórias com disparos tardios, encontradas no CPu, apresentarem atividade espontânea menor (Figura 17). Essa aparente contradição pode ser parcialmente compreendida em termos de intensidade da resposta, observando que as respostas das células com dinâmica transitória e transitória com resposta tardia são intrinsecamente (em ambas as linhagens) menos intensas que as respostas das células sustentadas, portanto menos sujeitas à saturação. A faixa de resposta se verifica observando as escalas dos gráficos apresentados na Figura 12 A-C e as distribuições na Figura 13, onde se observa que o número de disparos evocados das células sustentadas, intra-linhagem, é efetivamente maior que as demais, tanto nos WAR, quanto nos ratos resistentes.

O fato de termos verificado diferença significativa entre as linhagens em relação à dinâmica temporal das respostas e à atividade espontânea de células com dinâmica sustentada encontradas somente na amígdala basolateral (Figuras 8 e 15) e não no CPu (Figuras 11 e 18), sugere comprometimento diferenciado de ambas as estruturas em animais não-abrasados quanto ao processamento de informação auditiva, o que iria de acordo com as inúmeras evidências de peculiar predisposição inata dos circuitos da ABL ao comprometimento e desenvolvimento de atividade ictal.

Finalmente, a verificação de ausência de diferença significativa entre as variâncias do *número de bins-supra-limiar* entre as três dinâmicas, em WARs (Figura

7), e a distribuição claramente diferente entre as linhagens, pelo menos imediatamente após o início dos estímulos, dos disparos evocados, exceto pelas células sustentadas (Figuras 12 A-C e 13), corroboram a possibilidade do processamento de informação auditiva dos WAR ocorrer em uma “faixa” de funcionamento fisiológico e computacional diferenciada comparada aos ratos resistentes. A distribuição mais ampla das *médias de disparo por bin* (Figura 14 B) e do *número total de disparos* durante os 0,3 s frente o estímulo (Figura 13) das células sustentadas do WAR, não necessariamente culminando em uma resposta efetivamente mais duradoura (Figura 7 e 8) também corrobora essa possibilidade.

## 5.2. ESTUDO ANATÔMICO DO DESENVOLVIMENTO DO CÉREBRO DE RATOS WISTAR AUDIOGÊNICOS

### 5.2.1. Resultados e Discussão

Através da técnica de ressonância magnética verificamos que a evolução da relação volume cerebral/peso corporal dos WAR é diferenciado.

Abaixo, na Figura 19, estão exemplos de imagens obtidas de ratos resistentes e audiogênicos com 7, 14, 21, 28, 42 e 70 dias de idade. Observando as imagens verifica-se que o formato dos cérebros dos WAR (à direita) é diferente comparado com os dos ratos resistentes (à esquerda), especialmente quando mais novos, entre 7 e 28 dias. A partir do 42º dia de idade, se observa uma diferença menor entre os formatos do cérebro de ambas as linhagens.

Quanto ao volume cerebral (Figura 20), verificamos que a relação do volume cerebral com o peso corporal dos WAR mantém-se constante dos 7 aos 21 dias. Com 28 dias de idade, ainda se observa diferença significativa entre os volumes cerebrais de ambas as linhagens, no entanto, menos discrepante que as comparações anteriores. Aos 70 dias não se observa diferença entre os volumes cerebrais. É interessante ressaltar que a evolução da forma do cérebro dos animais audiogênicos acompanha os resultados da análise do volume cerebral destes.

A avaliação da espessura do córtex auditivo (Figura 21) entre as linhagens também nos revela diferenças importantes, que estão de acordo com o observado em relação à variação do volume cerebral. Ainda que não tenhamos medido a espessura de TE3 aos 7 e 14 dias, devido as imagens não estarem nítidas o suficiente para mensuração da espessura cortical, verifica-se diferença significativa entre as linhagens aos 21 e 28 dias, aparentemente, período após o qual a discrepância apresentada pelos WAR começa a mitigar.

Em relação ao colículo inferior, a estimativa bi-dimensional da área dos colículos em uma única fatia, segue grosseiramente o padrão observado na variação do volume cerebral e espessura cortical. Aos 28 dias, no entanto, já não se verifica diferença significativa entre as relações área/peso corporal de ambas as linhagens (Figura 22).

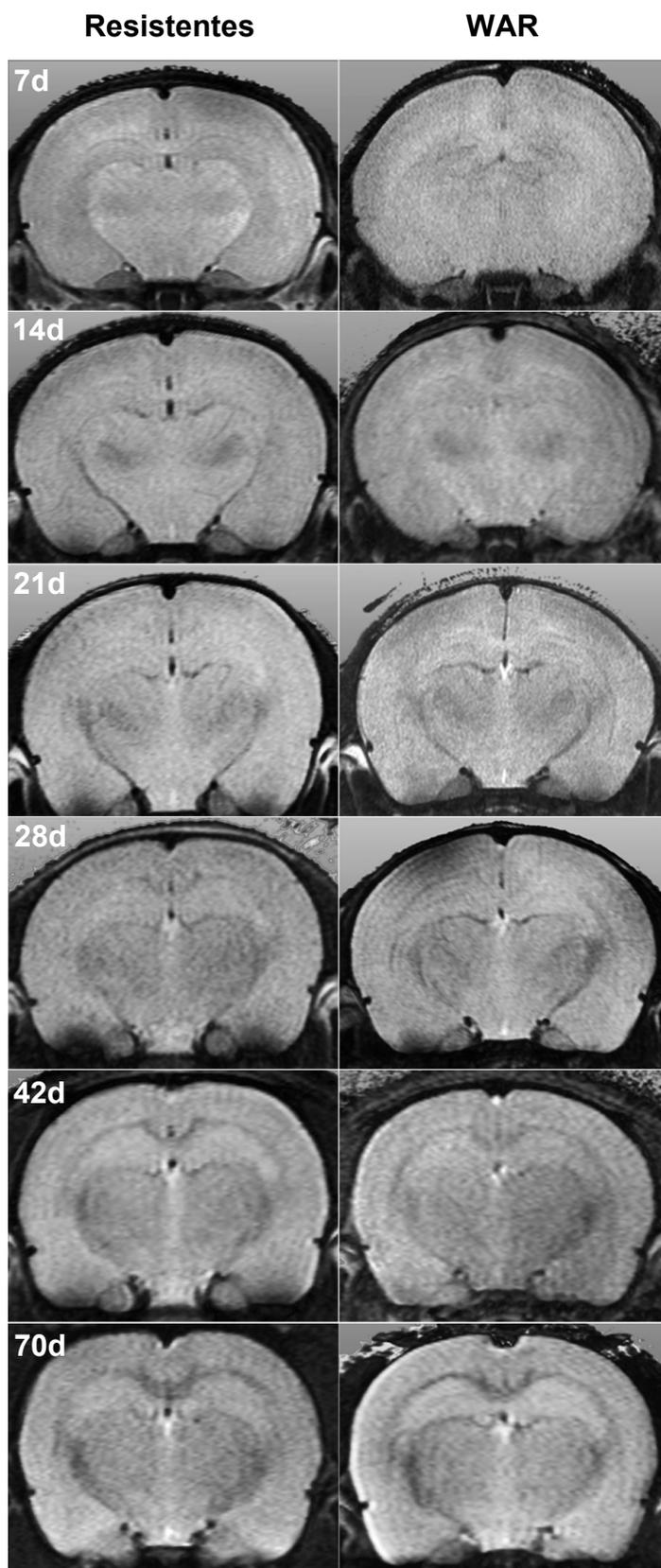


Figura 19. Imagens dos cérebros de ratos resistentes e WAR obtidas aos 7, 14, 21, 28, 42 e 70 dias de idade, com o uso da técnica de ressonância magnética. O tamanho das imagens foi ajustado para montagem da presente figura.

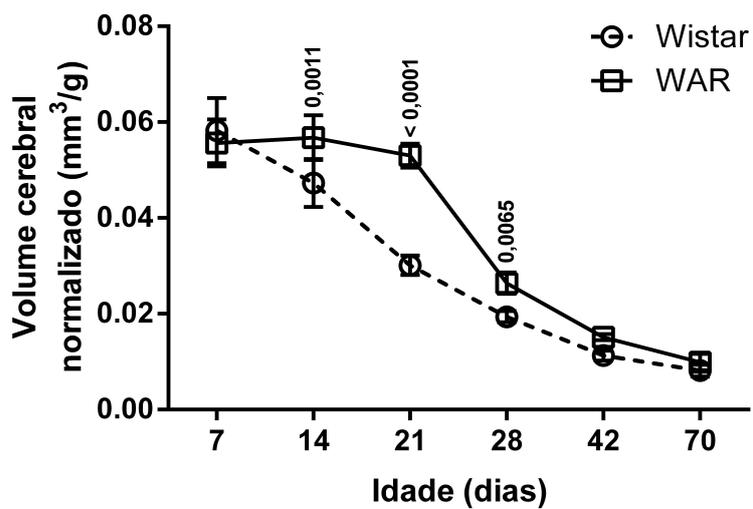


Figura 20. Volume cerebral, normalizado pelo peso, de animais com 7, 14, 21, 28, 42 e 70 dias de idade. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  apresentados.

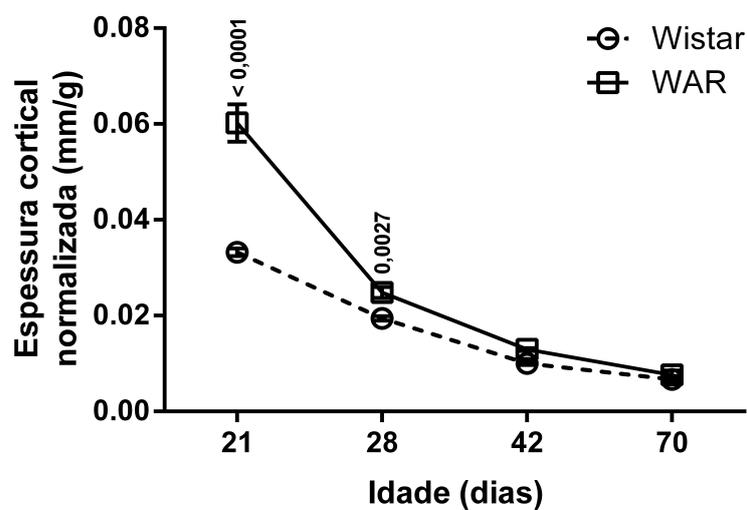


Figura 21. Espessura do córtex auditivo, normalizada pelo peso, de animais com 21, 28, 42 e 70 dias de idade. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  erro em torno da média. Valores de  $p < 0,05$  apresentados.

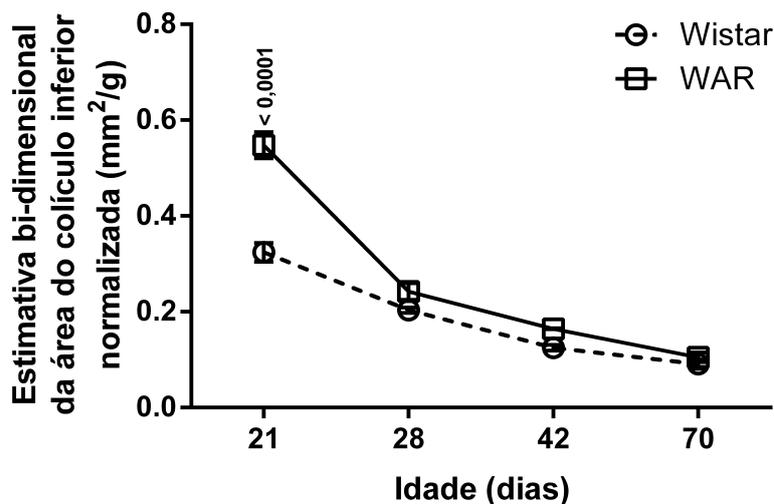


Figura 22. Estimativa bi-dimensional da área de uma única fatia do colículo inferior, normalizada pelo peso, de animais com 21, 28, 42 e 70 dias de idade. Resultados apresentados na forma de média  $\pm$  erro em torno da média. Valores de  $p < 0,05$  apresentados.

O estudo morfométrico do desenvolvimento revelou um fenômeno de neuro-preservação do cérebro dos WAR.

As medidas de espessura cortical e da área estimada do colículo inferior apresentadas são baseadas no comprimento de vetores obtidos de uma única fatia, sendo, portanto, variáveis uni e bi-dimensionais. Partindo-se do fato de que não observamos deformações marcantes no cérebro dos animais submetidos ao imageamento, essas medidas, ainda que amostragens pontuais em relação ao volume total das regiões investigadas, configuram-se como medidas indiretas de volume tecidual dessas regiões. A análise das dimensões de TE3 e do colículo inferior foi em função da susceptibilidade audiogênica dos WAR, do papel do CI na gênese das crises audiogênicas e por serem regiões localizadas em extremos diferentes da via acústica. Trabalhos mostram uma relação entre hiper-excitabilidade e aumento de espessura cortical em pacientes com epilepsia (HANGANU *et al.*, 2014; ALHUSAINI *et al.*, 2013). Os presentes resultados, diferente do observado por BOUILLERET e colaboradores (2009) em relação a animais susceptíveis a epilepsia de ausência, não aparentam caracterizar um quadro de hipertrofia. Aparentam estar relacionados com o fato dos WAR apresentarem desenvolvimento orgânico comprometido (DAMSCENO *et al.*, 2013; FAZAN *et al.*, 2011), como evidenciado por

UMEOKA e colaboradores (2011), especialmente por terem verificado que os WAR são significativamente menores que os ratos resistentes.

Considerando que os caracteres genéticos selecionados nos WARs podem manifestar-se fenotipicamente (DAMSCENO *et al.*, 2013; FAZAN *et al.*, 2011; UMEOKA *et al.*, 2011) cronicamente, inclusive os relacionados com a predisposição a hiper-excitabilidade e ao hiper-sincronismo, poderíamos esperar observar, no cérebro de WARs adultos, diferenças marcantes e persistentes quando comparados com os ratos resistentes, mas isso não foi verificado (Figuras 20, 21 e 22). O que observamos é aparentemente um fenômeno de neuro-preservação (FREEDMAN *et al.*, 1980) em que alterações sistêmicas não afetam drasticamente o suprimento e o desenvolvimento do cérebro (BELL *et al.*, 1987). O padrão semelhante de variação da relação dimensão cerebral/peso corporal referentes ao cérebro, córtex auditivo e colículo inferior sugere que diferentes regiões cerebrais reagem de modo similar ao desenvolvimento orgânico diferenciado, não nos permitindo inferir uma relação entre qualquer alteração morfométrica observada e o quadro de susceptibilidade audiogênica.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

As diferenças na dinâmica temporal das respostas dos neurônios encontrados na ABL e no CPu de WARs não-abrasados entram para o conjunto de alterações inatas observadas no sistema nervoso destes animais. Estas diferenças constituem fortes evidências de que o processamento de estímulos auditivos não-convulsivos por duas regiões cerebrais encontra-se alterado previamente ao comprometimento do prosencéfalo (MORAES *et al.*, 2000) pela recorrência de crises audiogênicas, por terem sido verificadas em animais anestesiados após considerável período sem a indução de crises, quando apresentaram no máximo 03 crises audiogênicas características de tronco encefálico durante a triagem audiogênica. EVANS e colaboradores (2006) observaram uma diminuição da transmissão GABAérgica do colículo inferior de GEPR-9s com 3-6 semanas de idade após 03 crises audiogênicas. GITAÍ e colaboradores (2010) verificaram comprometimento do prosencéfalo após uma única crise audiogênica, observando aumento da expressão do transcrito da subunidade GluR2 do receptor glutamatérgico AMPA no hipocampo de WARs adultos. Apesar destes achados serem fortes evidências de facilitação da propagação da atividade epiléptica (GITAÍ *et al.*, 2010), a menor duração das respostas sustentadas na ABL (Figuras 7 e 8) e a menor atividade espontânea (Figura 17) e evocada (Figuras 7 e 10) das células transitórias com disparos tardios do CPu, não são evidências diretas de hiper-excitabilidade.

A partir de nossos resultados verificamos que a seleção genética não se manifesta, em nível neuronal, necessariamente como fenômenos característicos de estados de desinibição ou hiper-excitabilidade. Em um modelo de abstinência ao álcool, os ratos apresentaram aumento da atividade espontânea e da intensidade da resposta evocada auditiva no colículo inferior para todas as intensidades testadas, sugerindo alterações compensatórias não só da transmissão GABAérgica, mas também da transmissão excitatória glutamatérgica (FAINGOLD e RIAZ, 1995). A elevação dos níveis de noradrenalina no complexo basolateral da amígdala devido à administração sistêmica de ioimbina em ratos anestesiados (hidrato de cloro) afeta significativamente a atividade espontânea de neurônios principais e interneurônios, assim como o potencial evocado na ABL frente à estimulação elétrica do córtex entorrinal (BUFFALARI e GRACE, 2009). Neste último trabalho, os autores

encontraram predominantemente células cuja atividade espontânea e evocada foram afetadas de modo similar pela administração de ioimbina, no entanto seu número não foi significativamente maior. O aumento da atividade espontânea acompanhado pelo aumento da resposta evocada observada nos trabalhos acima citados não é o que observamos em relação as células curta-transitória (Figuras 9, 12 A e 16) e curta-transitória com disparos tardios (Figuras 10, 12 B e 17) do CPu de WARs, provavelmente por estas ultimas terem sido encontradas no estriado e não na ABL. No entanto, BUFFALARI e GRACE (2009) encontraram células que apresentaram um aumento da atividade espontânea concomitante a uma atenuação da frequência de disparo das respostas evocadas pela estimulação do córtex entorrinal de animais tratados com ioimbina, relação similar a observada em relação as células sustentadas da ABL de WARs, que apresentam atividade espontânea significativamente mais alta (Figuras 14 e 15) e duração menor das respostas evocadas acusticamente (Figuras 7 e 8).

De acordo com GITAÍ e colaboradores (2008), modelos genéticos de epilepsia, como os WAR, são úteis para o entendimento da influência do *background* genético susceptível ao ictus na manifestação de diferentes tipos de crises, como as tônico-clônicas generalizadas e as crises mioclônicas. Devido ao método de seleção genética em que foram submetidos, o quadro de susceptibilidade audiogênica dos WAR é de natureza poligênica (GITAÍ *et al.*, 2008; DORETTO *et al.*, 2003; FRANKEL *et al.*, 1994), sendo essa influência, provavelmente, dependente da interação entre fatores epileptogênicos e outros fatores genéticos não-epileptogênicos característicos da cepa. Nos WAR, ainda não se identificou quais alterações genotípicas influenciam o fenômeno audiogênico ou o comportamento durante o período entre-crisis e, ainda que os presentes resultados não estabeleçam conexão biunívoca com a susceptibilidade ao ictus característica dos WAR, nem com o comportamento observado por GARCIA-CAIRASCO e colaboradores (1998) no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, estes são evidências de comprometimento inato do processamento de informação em regiões importantes para a epileptogênese prosencefálica (GALVIS-ALONSO *et al.*, 2004; RAISINGHANI *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2000; HIRSCH *et al.*, 1997; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996), para modulação das crises audiogênicas (ROSSETTI *et al.*, 2012; ROSSETTI *et al.*, 2011; ROSSETTI *et al.*, 2006; DORETTO e GARCIA-CAIRASCO, 1995; GARCIA-CAIRASCO E SABBATINI, 1991), e para realização de

ambos testes de exploração, respectivamente, a amígdala basolateral (JI, 2007; MOREIRA, 2007; MACEDO, 2006) e o caudado-putamen (THORCELL *et al.*, 2006).

BORDI e colaboradores (1992) encontraram células responsivas à som na ABL e no CPu com diferentes características funcionais quanto à latência de resposta, limiar de intensidade, capacidade de habituação, e a partir da preferência por diferentes bandas de frequência tonal, discutindo, ainda que brevemente, a importância funcional de tais células no processamento de estímulos sensoriais biologicamente relevantes (SANDER *et al.*, 2003) e no condicionamento pavloviano (ROGAN *et al.*, 1997). Células não-habitantes presentes na ABL podem ser importantes para a sensibilização dos circuitos que constituem, em preparação para processamento auditivo preferencial. Células com preferência por altas frequências (10-30 kHz) incluem a ABL no processamento de informação ultrassônica com alta relevância biológica (SADANANDA *et al.*, 2008; D'AMATO *et al.*, 2005); células com preferência por bandas estreitas de frequência representariam a relevância biológica de um estímulo acústico peculiar, diminuindo o limiar de resposta frente uma faixa restrita de frequência como forma de plasticidade associativa; neurônios com alto limiar de intensidade contribuiriam com o processamento de estímulos acústicos iminentemente ameaçadores (BORDI *et al.*, 1992). Apesar de termos fornecido pulsos de ruído branco abrangendo frequências de 0-30 kHz (Figura 2), de termos encontrado, por exemplo, 02 células que habituaram rapidamente durante o protocolo de estimulação, não realizamos testes de limiar de intensidade, habituação ou de sintonia por banda de frequência. Os presentes resultados não esclarecem, portanto, mecanismos funcionais, mas diferenças de processamento pelo cérebro epiléptico dos WARs.

As diferenças observadas tanto na dinâmica temporal das respostas, quanto na atividade espontânea dos diferentes tipos celulares encontrados na ABL e no CPu dos WARs, o pico tardio das células transitórias (Figura 12 A), o menor número de disparos evocados (Figura 12 B) e espontâneos das células transitórias com disparos tardios (Figura 17), e a menor duração das respostas (Figuras 7 e 8) e atividade espontânea aumentada das células sustentadas (Figura 14 A e 15) são novas evidências de processamento alterado pelo cérebro de WARs não-abrasados. Entre estes achados, a atividade espontânea aumentada das células sustentadas, especificamente as da ABL (Figura 14 A e 15), constitui evidência de hiperexcitabilidade basal, apesar da aparente saturação da resposta dessas células

(Figura 7 e 8). Estes últimos, somados aos resultados referentes as células transitórias (Figura 9 e 16) e transitórias com disparos tardios (Figura 10 e 17), sugerem que WARs não-abrasados interpretam estímulos acústicos não-convulsivos de modo diferenciado.

Os WARs apresentam eixo HPA hiper-responsivo de modo inato (UMEOKA *et al.*, 2011). Considerando que neurônios principais e inter-neurônios da ABL são sensíveis ao hormônio liberador de corticotrofina (ROSTKOWSKY *et al.*, 2013), que este hormônio é pró-convulsivo (BAJOREK *et al.*, 1986), que sua micro-injeção na ABL altera o comportamento de ratos no campo aberto e labirinto em cruz elevado (DANIELS *et al.*, 2004) e desencadeia respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais frente situações de estresse (SHEKHAR *et al.*, 2005), as alterações do eixo HPA apresentadas por WARs intactos (UMEOKA *et al.*, 2011) apresenta-se como premissa comum para futuros estudos que visem relacionar o comportamento emocional, o quadro de hiper-excitabilidade audiogênica e as alterações eletrofisiológicas verificadas neste estudo em relação a ABL.

Ainda que tenhamos observado um fenômeno de preservação do desenvolvimento do cérebro dos WAR em contraposição ao desenvolvimento orgânico comprometido (DAMASCENO *et al.*, 2013; FAZAN *et al.*, 2011; UMEOKA *et al.*, 2011), e que estas diferenças na relação volume cerebral/peso corporal (Figuras 20-22) tenham desaparecido na idade adulta, não podemos descartar a possibilidade dos WARs apresentarem alterações micro-estruturais e celulares no cérebro (GERDES *et al.*, 2012; RILEY *et al.*, 2011; DRUMOND *et al.*, 2011; GUEDES *et al.*, 2009; MESQUITA *et al.*, 2005; GALVIS-ALONSO *et al.*, 2004; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996). A ampla susceptibilidade prosencefálica (DRUMOND *et al.*, 2011; GUEDES *et al.*, 2009; MESQUITA *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2004; SCARLATELLI-LIMA *et al.*, 2003), além da audiogênica (GALVIS-ALONSO *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2000; GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996), são evidências de comprometimentos característicos das epilepsias de etiologia genética poligênica (GITAÍ *et al.*, 2008). Os resultados eletrofisiológicos aqui apresentados são evidência de alterações celulares inatas peculiares à cepa audiogênica geneticamente selecionada. Se estas alterações, ou outras (DRUMOND *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2005), interferem no comportamento entre-crisis (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1998) e contribui com o engajamento de redes cerebrais em estados hiper-excitáveis e hiper-sincrônicos (MORAES *et al.*, 2000),

permanece uma incógnita. Mesmo assim, na literatura, fortes evidências existem, relacionando a genética à natureza da predisposição epileptogênica e ao comportamento entre-crisis (SARKISOVA e LUIJTELAAR, 2011; HERMANN *et al.*, 2008; MCINTYRE e GILBY, 2007; MIDZYANOVSKAYA *et al.*, 2005; JOBE, 2003).

## 7. CONCLUSÃO

Concluimos que os ratos Wistar audiogênicos apresentam alterações no processamento eletrofisiológico de estímulos auditivos não-convulsivos pela amígdala basolateral e caudado-putamen, regiões importantes para a epileptogênese prosencefálica e para modulação das crises audiogênicas, respectivamente, e que o desenvolvimento anatômico cerebral destes animais é preservado até a idade adulta, apesar do desenvolvimento orgânico comprometido.

Ainda que tenha sido selecionada em torno da predisposição audiogênica, evoluindo em um modelo de susceptibilidade ao hiper-sincronismo da via auditiva, a linhagem WAR constitui um interessante modelo para o estudo de alterações prosencefálicas, não necessariamente relacionadas à epileptogênese, que possam influenciar o comportamento de animais não-abrasados durante período sem-crisis. Somado aos achados eletrofisiológicos, os resultados do estudo morfométrico realizado contribuem com o entendimento dos casos de epilepsia de etiologia genética como potenciais desordens do desenvolvimento que se manifestam comportamentalmente como síndromes neuropsiquiátricas complexas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S. *et al.* Role of the medial and lateral caudate-putamen in mediating an auditory conditional response association. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 76, n. 1, p. 106-16, 2001.
- ALHUSAINI, S. *et al.* Regional increase of cerebral cortex thickness in juvenile myoclonic epilepsy. **Epilepsia**, v.54, n.9, p 138–141, 2013.
- AUBERT, S. *et al.* Local and remote epileptogenicity in focal cortical dysplasias and neurodevelopmental tumours. **Brain**, v. 132, n. 11, p. 3072-86, 2009.
- AVCHALUMOV, Y. *et al.* Altered physiology and pharmacology in the corticostriatal system in a model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v.52, n. 1, p. 151–157, 2011.
- BAJOREK, J.G. *et al.* Neuropeptides: anticonvulsant and convulsant mechanisms in epileptic model systems and in humans. **Adv. Neurol**, v. 44, p. 489-500, 1986.
- BECHARA, A. *et al.* Different contributions of the human amygdala and ventromedial prefrontal cortex to decision-making. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 13, p. 5473-5481, 1999.
- BEGHI, M. *et al.* Learning disorders in epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 2, p. 14-18, 2006.
- BELL, J.M. *et al.* Biochemical determinants of growth sparing during neonatal nutritional deprivation or enhancement: ornithine decarboxylase, polyamines, and macromolecules in brain regions and heart. **Pediatr Res**, v. 22, n. 5, p. 599-604, 1987.
- BERNASCONI, N. *et al.* Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. **Brain**, v. 126, p. 462-469, 2003.
- BEYENBURG, S. *et al.* Anxiety in patients with epilepsy: Systematic review and suggestions for clinical management. **Epilepsy & Behavior**, v.7, p. 161-171, 2005.
- BEYER, B. *et al.* Absence seizures in C3H/HeJ and knockout mice caused by mutation of the AMPA receptor subunit Gria4. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. 12, p. 1738-49, 2008.
- BOUILLERET, V. *et al.* Morphometric abnormalities and hyperanxiety in genetically epileptic rats: A model of psychiatric comorbidity? **NeuroImage**, v.45, p. 267–274, 2009.
- BORDI, F.; LEDOUX, J.E. Sensory Tuning beyond the Sensory System: An Initial Analysis of Auditory Response Properties of Neurons in the Lateral Amygdaloid Nucleus and Overlying Areas of the Striatum. **The Journal of Neuroscience**, v.12, n.7, p.2493-2503, 1992.
- BORDI, F. *et al.* Single-unit activity in the lateral nucleus of the amygdala and overlying areas of the striatum in freely behaving rats: rates, discharge patterns, and responses to acoustic stimuli. **Behav Neurosci**, v. 107, n. 5, p. 757-69, 1993.
- BROWNING, R.A. *et al.* Effect of precollicular transection on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. **Exp Neurol**, v. 155, n. 2, p. 295-301, 1999.
- BUFFALARI, D.M.; GRACE, A.A. Anxiogenic modulation of spontaneous and evoked neuronal activity in the basolateral amygdala. **Neuroscience**, v. 163, p. 1069–1077, 2009.
- BUZSAKI, G. *et al.* The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 6, p. 407-20, 2012.
- CATENOIX, H. *et al.* Evoked potential study of hippocampal efferent projections in the human brain. **Clin Neurophysiol**, v. 122, n. 12, p. 2488-97, 2011.

- CHAKRAVARTY, D.N.; FAINGOLD, C.L. Differential roles in the neuronal network for audiogenic seizures are observed among the inferior colliculus subnuclei and the amygdala. **Exp. Neurol**, v.157, n. 1, p. 135-41, 1999.
- CORBIT, L.H.; JANAK, P.H. Inactivation of the lateral but not medial dorsal striatum eliminates the excitatory impact of Pavlovian stimuli on instrumental responding. **J Neurosci**, v. 27, n. 51, p. 13977-81, 2007.
- CORNAGGIA, C.M. *et al.* Correlation between cognition and behavior in epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 2, p. 34-39, 2006.
- COTA, V.R. *et al.* Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. **Epilepsy Behav**, v. 14, n. 1, p. 26-31, 2009.
- CRANE, J.W. *et al.* Oscillations in the basolateral amygdala: aversive stimulation is state dependent and resets the oscillatory phase. **J Neurophysiol**, v. 102, n. 3, p. 1379-87, 2009.
- CROMWELL, H.C.; WOODWARD, D.J. Inhibitory Gating of Single Unit Activity in Amygdala: Effects of Ketamine, Haloperidol, or Nicotine. **Biol Psychiatry**, v.61, p. 880-889, 2007.
- DAILEY, J.W. *et al.* Noradrenergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naive genetically epilepsy-prone rats. **Epilepsia**, v. 32, n. 2, p. 168-73, 1991.
- DAMASCENO, D.D. *et al.* Cardiac dysfunction in rats prone to audiogenic epileptic seizures. **Seizure**, v. 22, n. 4, p. 259-66, 2013.
- D'AMATO, F.R. *et al.* Pups call, mothers rush: does maternal responsiveness affect the amount of ultrasonic vocalizations in mouse pups? **Behav Genet**, v. 35, n. 1, p. 103-12, 2005.
- D'AMBROSIO, R. *et al.* Functional definition of seizure provides new insight into post-traumatic epileptogenesis. **Brain**, v. 132, n. 10, p. 2805-21, 2009.
- DANIELS, W.M. *et al.* The effects of repeated intra-amygdala CRF injections on rat behavior and HPA axis function after stress. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 1-2, p. 15-23, 2004.
- DEMATTEIS, M. *et al.* MRI evidence for the involvement of basal ganglia in epileptic seizures: an hypothesis. **Epileptic Disorder**. v. 3, n. 3, p. 161-4, 2003.
- DETOUR, J. *et al.* A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 499-508, 2005.
- DIPANJAN, N.C.; FAINGOLD, C.L. Differential roles in the neuronal network for audiogenic seizures are observed among the inferior colliculus subnuclei and the amygdala. **Experimental Neurology**, v. 157, p. 135-141, 1999.
- DORETTO, M.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Differential Audiogenic Seizure Sensitization by Selective Unilateral Substantia Nigra Lesions in Resistant Wistar Rats. **Physiology and Behavior**, v. 58, n.2, p. 273-282, 1995.
- DORETTO, M.C. *et al.* Quantitative Study of the Response to Genetic Selection of the Wistar Audiogenic Rat Strain (WAR). **Behavior Genetics**, v.33, n.1, 2003
- DRUMOND, L.E. *et al.* Reduced hippocampal GABAergic function in Wistar audiogenic rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 10, p. 1054-9, 2011.
- DU, Y. *et al.* Binaural Unmasking of Frequency-Following Responses in Rat Amygdala. **J Neurophysiol**, v. 101, p. 647-1659, 2009.

- DUKE, E. S. *et al.* The effect of seizure focus on regional language processing areas. **Epilepsia**, v. 53, n. 6, p. 1044-50, 2012.
- EELLS, J.B. *et al.* Fos expression and 2-deoxyglucose uptake following seizures in developing genetically epilepsy-prone rats. **Brain Res Bull**, v. 52, n. 5, p. 379-89, 2000.
- FAINGOLD, C.L.; RIAZ, A. Ethanol withdrawal induces increased firing in inferior colliculus neurons associated with audiogenic seizure susceptibility. **Exp Neurol**, v. 132, n. 1, p. 91-8, 1995.
- FANCIULLI, M. *et al.* Suggestive linkage of familial mesial temporal lobe epilepsy to chromosome 3q26. **Epilepsy Res**, v. 108, n. 2, p. 232-40, 2014.
- FAUSER, S.; SCHULZE-BONHAGE, A. Epileptogenicity of cortical dysplasia in temporal lobe dual pathology: an electrophysiological study with invasive recordings. **Brain**, v. 129, n. 1, p. 82-95, 2006.
- FAZAN, R. *et al.* Changes in autonomic control of the cardiovascular system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain. **Epilepsy Behav**, v. 22, n. 4, p. 666-70, 2011.
- FENG, H.J.; FAINGOLD, C.L. Repeated generalized audiogenic seizures induce plastic changes on acoustically evoked neuronal firing in the amygdala. **Brain Research**, v. 932, p. 61-69, 2002a.
- FENG, H.J.; FAINGOLD, C.L. Synaptic plasticity in the pathway from the medial geniculate body to the lateral amygdala is induced by seizure repetition. **Brain Research**, v. 946, p.198-205, 2002b.
- FISHER, R.S. *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.
- FREEDMAN, L.S. *et al.* Sparing of the brain in neonatal undernutrition: amino acid transport and incorporation into brain and muscle. **Science**, v. 207, n. 4433, p. 902-4, 1980.
- FREIRE, M.A. *et al.*, Comprehensive analysis of tissue preservation and recording quality from chronic multielectrode implants. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 1-15, 2011.
- FRANKEL, W.N. *et al.* Genetic epilepsy model derived from common inbred mouse strains. **Genetics**, v. 138, n. 2, p. 481-9, 1994.
- GAITATZIS, A. *et al.* The psychiatric comorbidity of epilepsy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 110, n. 4, p. 207-220, 2004.
- GALE, G.D. *et al.* Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 15, p. 3810-3815, 2004.
- GALVIS-ALONSO, O.Y. *et al.* Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (war strain). **Neuroscience**, v. 125, p. 787-802, 2004.
- GARCIA-CAIRASCO, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. **Hearing Research**, v. 168, n. 1-2, p. 208-222, 2002.
- GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R.M.E. Possible Interaction Between the Inferior Colliculus and the Substantia Nigra in Audiogenic Seizures in Wistar Rats. **Physiology and Behavior**, v. 50, p. 421-427, 1991.
- GARCIA-CAIRASCO, N. *et al.* Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behavioural Brain Research**. v. 58, p. 57-67, 1993.

- GARCIA-CAIRASCO, N. *et al.* Neuroethological and morphological (Neo-Timm stain-ning) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 26, p. 177–192, 1996.
- GARCIA-CAIRASCO, N. *et al.* Reduced Exploratory Activity of Audiogenic Seizures Suceptible Wistar Rats. **Physiology & Behavior**, v. 64, n. 5, p. 671–674, 1998.
- GARCIA-PENAS, J.J. Interictal epileptiform discharges and cognitive impairment in children. **Rev Neurol**, v. 52, n. 1, p. S43-52, 2011.
- GERDES, J.S. *et al.* Progression of microstructural putamen alterations in a case of symptomatic recurrent seizures using diffusion tensor imaging. **Seizure**, v. 21, n. 6, p. 478-81, 2012.
- GERSTNER, W. *et al.* Neural codes: firing rates and beyond. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 24, p. 12740-1, 1997.
- GHOSH, S. *et al.* Functional connectivity from the amygdala to the hippocampus grows stronger after stress. **J Neurosci**, v. 33, n. 17, p. 7234-44, 2013.
- 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, 1999.
- GITAÍ, D.L. *et al.* Genes and epilepsy I: epilepsy and genetic alterations. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 3, p. 272-8, 2008.
- GITAÍ, D.L. *et al.* Increased expression of GluR2-flip in the hippocampus of the Wistar audiogenic rat strain after acute and kindled seizures. **Hippocampus**, v. 20, n. 1, p. 125-33, 2010.
- GITTIS, A.H.; KREITZER, A.C. Striatal microcircuitry and movement disorders. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 9, p. 557-64, 1999.
- GONZALEZ, L.M. *et al.* The localization and lateralization of memory deficits in children with temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, n. 1, p. 124-132, 2007.
- GOOSENS, K.A.; MAREN, S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. **Learn Mem**, v. 8, n. 3, p. 148-55, 2001.
- GROENEWEGEN, H.J. The basal ganglia and motor control. **Neural Plast**, v. 10 n. 1-2, p. 107-20, 2003.
- GUEDES, R.C. *et al.* Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). **Epilepsy Res**, v. 83, n. 2-3, p. 207-14, 2009.
- HANGANU, A. *et al.* Cortical Thickness Changes Associated with Photoparoxysmal Response. **Brain Topogr**, Feb. 01, 2014
- HARA, H. Autism and epilepsy: a retrospective follow-up study. **Brain Dev**, v. 29, n. 8, p. 486-90, 2007.
- HERMANN, B. *et al.* The neurobehavioural comorbidities of epilepsy: can a natural history be developed? **Lancet Neurol**, v. 7, n. 2, p. 151-60, 2008.
- HIROSE, S. *et al.* Genetics of idiopathic epilepsies. **Epilepsia**, v. 46, n. 1, p. 38-43, 2005.
- HIRSCH, E. *et al.* Positive transfer of audiogenic kindling to electrical hippocampal kindling in rats. **Epilepsy Research**, v. 11, p. 159-166, 1992.

- HIRSCH, E. *et al.* The amygdala is critical for seizure propagation from brainstem to forebrain. **Neuroscience**, v. 77, p. 975-984, 1997.
- IBATA, K. *et al.* Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing. **Neuron**, v. 57, n. 6, p. 819-26, 2008.
- JACINTO, L.R. *et al.* Stress affects theta activity in limbic networks and impairs novelty-induced exploration and familiarization. **Front Behav Neurosci**, v. 7, p. 127, 2013.
- JALAVA, M.; SILLANPAA, M. Reproductive activity and offspring health of young adults with childhood-onset epilepsy: a controlled study. **Epilepsia**, v. 38, n. 5, p. 532-40, 1997.
- Jl, G. *et al.* Pain-related anxiety-like behavior requires CRF1 receptors in the amygdala. **Molecular Pain**, v. 3, p. 1-5, 2007.
- JOBE, P.C. Common pathogenic mechanisms between depression and epilepsy: an experimental perspective. **Epilepsy & Behavior**, v. 4, n. 3, p. 14-24, 2003.
- JUNGEHULSING, G.J. *et al.* Incidence and predictors of post-stroke epilepsy. **Acta Neurol Scand**, v. 127, n. 6, p. 427-30, 2013.
- KALACHIKOV, S. *et al.* Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. **Nat Genet**, v. 30, n. 3, p. 335-41, 2002.
- KASPERAVICIUTE, D. Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. **Brain**, v. 136, n. 10, p. 3140-50, 2013.
- KRAVITS, A.V.; KREITZER, A.C. Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. **Physiology (Bethesda)**, v. 27, n. 3, p. 167-77.
- KUCKER, S. *et al.* Kindling as a model of temporal lobe epilepsy induces bilateral changes in spontaneous striatal activity. **Neurobiol Dis**, v. 37, n. 3, p. 661-72, 2010.
- LABATE, A. *et al.* MRI evidence of mesial temporal sclerosis in sporadic "benign" temporal lobe epilepsy. **Neurology**, v. 66, n. 4, p. 562-5, 2006.
- LARSON, C.L. Fear is fast in phobic individuals: amygdala activation in response to fear-relevant stimuli. **Biological Psychiatry**, v. 60, p. 410-417, 2006.
- LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155-184, 2000.
- LEDOUX, J.E. *et al.* Overlapping projections to the amygdala and striatum from auditory processing areas of the thalamus and cortex. **Neurosci Lett**, v. 134, n. 1, p. 139-44, 1991.
- LEE, T. *et al.* Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal MRI study. **Neuroreport**, v. 20, n. 17, p. 1554-1558, 2009.
- LEITE, J.P.; CAVALHEIRO, E.A. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. **Epilepsy Research**, v. 20, n. 2, p. 93-104, 1995.
- LEPPIK, I. Intractable epilepsy in adults. Surgical treatment of epilepsy. Amsterdam: W.H. Theodore Elsevier, 1992.
- LERITZ, E.C. *et al.* Temporal lobe epilepsy as a model to understand human memory: the distinction between explicit and implicit memory. **Epilepsy & Behavior**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2006.
- LESTING, J. *et al.* Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21714, 2011.

LIN, J.J. *et al.* Striatal hypertrophy and its cognitive effects in new-onset benign epilepsy with centrotemporal spikes. **Epilepsia**, v. 53, n. 4, p. 677-85, 2012.

LITT, B. *et al.* Epileptic seizures may begin hours in advance of clinical onset: a report of five patients. **Neuron**, v. 30, n. 1, p. 51-64, 2001.

LOSCHER, W. Animal models of intractable epilepsy. **Progress in Neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 239-258, 1997.

LUO, C. *et al.* Diffusion and volumetry abnormalities in subcortical nuclei of patients with absence seizures. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1092-9, 2011.

MACCOTTA, L. *et al.* Impaired and facilitated functional networks in temporal lobe epilepsy. **Neuroimage Clin**, v. 2, p. 862-72, 2013.

MACEDO, C.E. *et al.* Conditioned and unconditioned fear organized in the inferior colliculus are differentially sensitive to injections of muscimol into the basolateral nucleus of the amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 625-631, 2006.

MAGALHÃES, L.H.M. *et al.* Evidence for augmented brainstem activated forebrain seizures in Wistar Audiogenic Rats subjected to transauricular electroshock. **Neuroscience Letters**, v. 369, p. 19-23, 2004.

MAURER-MORELLI, C.V. *et al.* A Locus Identified on Chromosome 18P11.31 is Associated with Hippocampal Abnormalities in a Family with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. **Front Neurol**, v. 3, n. 124, 2012.

MCDONALD, A.J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v. 55, p. 257-332, 1998.

MCGAUGH, J.L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in Neuroscience**, v. 25 p. 456-461, 2002.

MCHAFFIE, J.G. Subcortical loops through the basal ganglia. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 8, p. 401-7, 2005.

MCINTYRE, D.C.; GILBY, K.L. Genetically seizure-prone or seizure-resistant phenotypes and their associated behavioral comorbidities. **Epilepsia**, v. 48, n. 9, p. 30-32, 2007.

MESQUITA, F. *et al.* Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic Rats. **Brain Res Bull**, v. 65, n. 2, p. 177-83, 2005.

MICHAEL, B.D.; SOLOMON, T. Seizures and encephalitis: clinical features, management, and potential pathophysiologic mechanisms. **Epilepsia**, v. 53, n. 4, p. 63-71, 2012.

MIDDLETON, S.J. *et al.* High-frequency network oscillations in cerebellar cortex. **Neuron**, v. 58, n. 5, p. 763-74, 2008.

MIDZYANOVSKAYA, I.S. *et al.* Convulsive and nonconvulsive epilepsy in rats: Effects on behavioral response to novelty stress. **Epilepsy & Behavior**, v. 6, p. 543-551, 2005.

MILLS, S.A.; SAVAGE, D.D. Evidence of hypothyroidism in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy Res**, v. 2, n. 2, p. 102-10, 1988.

MORAES, M.F.D. *et al.* Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, v. 39, p. 251-259, 2000.

MORAES, M.F.D. *et al.* A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures of gepr-9s. **Brain Res**, v. 1033, n. 1, p. 1-12, 2005a

- MORAES, M.F.D. *et al.* An electrographic analysis of the synchronous discharge patterns of gepr-9s generalized seizures. **Brain Res**, v. 1046, n. 1-2, p. 1-9, 2005b.
- MOREIRA, C.M. *et al.* Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. **Brain Research Bulletin**, v. 71, p. 466-474, 2007.
- MOSCARELLO, J.M.; LEDOUX, J. E. Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. **J Neurosci**, v. 33, n. 9, p. 3815-23, 2013.
- MULLEN, S.A. *et al.* Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. **Neurology**, v. 81, n. 17, p. 1507-14, 2013.
- NARITOKU, D.K. *et al.* Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. **Exp Neurol**, v. 115, n. 3, p. 317-24, 1992.
- N'GOUEMO, P.; FAINGOLD, C.L. Audiogenic kindling increases neuronal responses to acoustic stimuli in neurons of the medial geniculate body of the genetically epilepsy-prone rat. **Brain Research**, v. 761, p. 217-224, 1997.
- NISHIZAWA, K. *et al.* Striatal indirect pathway contributes to selection accuracy of learned motor actions. **J Neurosci**, v. 32, n. 39, p. 13421-32, 2012.
- PARDOE, H.R. *et al.* A neurodevelopmental basis for BECTS: Evidence from structural MRI. **Epilepsy Research**, v. 105, p. 133-139, 2013.
- PAXINOS, G.; WATSON, C.J. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sidney Academic Press. p. 1-153. 1986.
- PESSOA, L. *et al.* Neural processing of emotional faces requires attention. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 17, p. 11458-11463, 2002.
- PRASAD, D.K.V. Genetics of idiopathic generalized epilepsy: An overview. **Neurology India**, v. 61, n. 6, p. 572-577, 2013.
- RAISINGHANI, M. *et al.* Glutamatergic activation of the amygdala differentially mimics the effects of audiogenic seizure kindling in two substrains of genetically epilepsy-prone rats. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 2, p. 516-522, 2003.
- RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor Seizure. **Electroencephalography And Clinical Neurophysiology**, v.32, p.269-279, 1972.
- REIGEL, C.E. Ontogeny of sound-induced seizures in the genetically epilepsy-prone rat. **Epilepsy Res**, v. 4, n. 1, p. 63-71, 1989.
- RIBEIRO, S. *et al.* Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. **PLoS Biol**, v. 2, n. 1, p. E24, 2004.
- RILEY, J.D. *et al.* Caudate atrophy and impaired frontostriatal connections are linked to executive dysfunction in temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 21, n. 1, p. 80-7, 2011.
- ROGAN, M.T. *et al.* Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. **Nature**, v. 390, p. 604-607, 1997.
- ROSSETTI, F. *et al.* EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). **Epilepsy Res**, v. 72, n. 2-3, p. 192-208, 2006.

- ROSSETTI, F. *et al.* Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation of the nigrotectal pathway in the Wistar audiogenic rat strain. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, p. 191–199, 2011.
- ROSSETTI, F. *et al.* Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation of the nigro-tectal pathway in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain II: An EEG wavelet analysis and retrograde neuronal tracer approach. **Epilepsy & Behavior**, v. 24, p. 391–398, 2012.
- ROSTKOWSKI, A.B. *et al.* Differential activation of neuronal cell types in the basolateral amygdala by corticotropin releasing factor. **Neuropeptides**, v. 47, n. 4, p. 273-80, 2013.
- SADANANDA, M. *et al.* Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. **Neurosci Lett**, v. 435, n. 1, p. 17-23, 2008.
- SALZMANN, A.; MALAFOSSE, A. Genetics of temporal lobe epilepsy: a review. **Epilepsy Res Treat**, v. 2012, p. 1-19, 2012.
- SANDER, D. *et al.* The human amygdala: an evolved system for relevance detection. **Reviews in the Neurosciences**, v. 14, p. 303-316, 2003.
- SANKAR, V. *et al.* Electrode impedance analysis of chronic tungsten microwire neural implants: understanding abiotic vs. biotic contributions. **Front Neuroeng**, v. 7, p. 1-12, 2014.
- SAVONENKO, A. *et al.* Complex Effects of NMDA Receptor antagonist apv in the basolateral amygdala on acquisition of two-way avoidance reaction and long-term fear memory. **Learning and Memory**, v. 10, p. 293-303, 2003.
- SCARLATELLI-LIMA, A.V. *et al.* Assessment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock, pentylenerazol and pilocarpine. **Brain Research**, v. 960, n. 1-2, p. 184-189, 2003.
- SCHULZ, S. *et al.* Influence of O(3)/O(2)-pneumoperitoneum as an oxidative stressor on duration of anaesthesia, loss of different reflexes and cytokine mRNA expression. **Lab Anim**, v. 38, n. 3, p. 261-71, 2004.
- SCIMECA, J.M.; BADRE, D. Striatal contributions to declarative memory retrieval. **Neuron**, v. 75, n. 3, p. 380-92.
- SERI, S. *et al.* Brain mechanisms of altered consciousness in generalised seizures. **Behav Neurol**, v. 24, n. 1, p. 43-6, 2011.
- SHEKHAR, A. *et al.* Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. **Stress**, v. 8, n. 4, p. 209-19, 2005.
- SHIVDASANI, M.N. *et al.* Neural synchrony in ventral cochlear nucleus neuron populations is not mediated by intrinsic processes but is stimulus induced: implications for auditory brainstem implants. **J Neural Eng**, v. 6, n. 6, 2009.
- SIMLER, S. *et al.* C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 175, p. 58-62, 1994.
- SIVARAO, D.V. *et al.* MK-801 disrupts and nicotine augments 40 Hz auditory steady state responses in the auditory cortex of the urethane-anesthetized rat. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 1-9, 2013.
- STABLES, J.P. *et al.* Models for epilepsy and epileptogenesis: Report from the NIH Workshop, Bethesda, Maryland. **Epilepsia**, v. 43, n. 11, p. 1410-1420, 2002.
- STEINLEIN, O.K. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 400-8, 2004.

- STERIADE, M. *et al.* Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. **J Neurosci**, v. 11, n. 10, p. 3200-17, 1991.
- SWINKELS, W.A. Psychiatric comorbidity in epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 7, n. 1, p. 37-50, 2005.
- THORSELL, A. *et al.* The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 1, p. 28-34, 2006.
- TUPAL, S.; FAINGOLD, C. Inhibition of adenylyl cyclase in amygdala blocks the effect of audiogenic seizure kindling in genetically epilepsy-prone rats. **Neuropharmacology**, v. 59, n. 1-2, p. 107-11, 2010.
- TURRIGIANO, G.G. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 221-7, 1999.
- TURRIGIANO, G.G. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. **Cell**, v. 135, n. 3, p. 422-35, 2008.
- TURSKI, L. *et al.* Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, n. 2, p. 154-71, 1989
- TURSKI, L. *et al.* Paradoxical anticonvulsant activity of the gamma-aminobutyrate antagonist bicuculline methiodide in the rat striatum. **Synapse**, v. 1, p. 14-20, 1991.
- UMEOKA, E.H.L. *et al.* Functional characterization of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. **Brain Research**, v. 1381, p. 141-147, 2011.
- USSELMAN, C.W. *et al.* Rodent cardiovascular responses to baroreceptor unloading: effect of plane of anaesthesia. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 36, n. 3, p. 376-81, 2011.
- UYVAL-SOYER, O. *et al.* The classification and differential diagnosis of absence seizures with short-term video-EEG monitoring during childhood. **Turk J Pediatr**, v. 54, n. 1, p. 7-14, 2012.
- VELASCO, A.L. *et al.* Functional and anatomic correlates of two frequently observed temporal lobe seizure-onset patterns. **Neural Plast**, v. 7, n. 1-2, p. 49-63, 2000.
- VERGNES, M. *et al.* Kindling of audiogenic seizures in the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, p. 167-176, 1987.
- VERMA-AHUJA, S. *et al.* Evidence of increased excitability in GEPR hippocampus preceding development of seizure susceptibility. **Epilepsy Res**, v. 31, n. 3, p. 161-73.
- WANDSCHNEIDER, B. *et al.* Frontal lobe function and structure in juvenile myoclonic epilepsy: a comprehensive review of neuropsychological and imaging data. **Epilepsia**, v. 53, n. 12, p. 2091-8, 2012.
- WARD, L.M. Synchronous neural oscillations and cognitive processes. **Trends Cogn Sci**, v. 7, n. 12, p. 553-9, 2003.
- WHITE, I.M.; REBEC, G.V. Responses of rat striatal neurons during performance of a lever-release version of the conditioned avoidance response task. **Brain Res**, v. 616, n. 1-2, p. 71-82, 1993.
- YOUNG, N.A. *et al.* Motor map expansion in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy is dependent on seizure severity and rat strain. **Exp Neurol**, v. 217, n. 2, p.421-8, 2009.

## APÊNDICE



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Senhor(a) Professor(a) Márcio Flávio Dutra Moraes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Avaliação anatômica do cérebro e eletrofisiológica da amígdala basolateral e regiões cerebrais adjacentes de ratos Wistar audiogênicos (WAR), submetido a esta comissão pelo protocolo 152 / 2014, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 25/08/2014.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 26/08/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)