

Luciana Estefani Drumond de Carvalho

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GABA<sub>A</sub> NO  
POTENCIAL EXCITATÓRIO PÓS SINÁPTICO EM  
HIPOCAMPO E AMIGDALA DE RATOS WISTAR  
AUDIOGÊNICOS (WAR)**

Belo Horizonte/2007

Luciana Estefani Drumond de Carvalho

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES GABA<sub>A</sub> NO POTENCIAL  
EXCITATÓRIO PÓS SINÁPTICO EM HIPOCAMPO E AMIGDALA  
DE RATOS WISTAR AUDIOGÊNICOS (WAR)**

Dissertação 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 grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcio Flávio Dutra Moraes

## **Apoio Financeiro**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Programa Institutos do Milênio 2005-2008. Instituto do Milênio para o desenvolvimento de fármacos baseados em toxinas peptídicas.

Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG – PRPq/UFMG

## Agradecimentos

À Deus por reservar à minha vida momentos e pessoas tão especiais.

Ao Professor André Massensini por ter me aberto as portas do mundo da ciência, por ter confiado em meu trabalho e incentivado-me à seguir em frente mesmo diante dos vários obstáculos, que algumas vezes pareciam invencíveis.

Ao Professor Márcio por suas sugestões e pelo seu entusiasmo pela pesquisa, contagiando e fazendo-me sentir alegria na realização deste trabalho.

Ao Professor Christopher por sua total disponibilidade, atenção, ajuda, paciência, amizade...

À Professora Maria Carolina pelo apoio.

Às amigas Patrícia Guidine e Maira Lima por toda amizade e cumplicidade nesta caminhada.

À todas as *laddies* do NNC, pelos momentos alegres e divertidos passados juntas.

A todos os amigos do NNC: Eric, Elvado, Léo, Jerusa, Dani, Túlio, Gustavo R, Gustavo B... Sem vocês fiquem certos de que esta caminhada teria sido muito mais difícil.

Aos ajudantes na tarefa árdua do abrasamento: Mariele, Maira, Pat, Gioconda, Maura, Duda, André, Gabriel, Fuscaldi.

Ao Vinícius e ao Fumega, os quais me ajudaram na luta contra meu inimigo número um – o estimulador.

Aos amigos do Eletrocel.

À Paulinha por me mostrar que o sonho da pesquisa estava a meu alcance.

Aos amigos do NeuroLab do Rio Grande do Sul, em especial ao Prof. Dr. Jaderson, à Profa. Dra. Mirna e à Michele, por compartilharem comigo seus conhecimentos científicos e suas histórias de vida.

Ao Taquinho pelo apoio técnico.

À Rose pela alegria contagiante.

Aos meus pais, pela presença alegre e pelo incentivo em todas as etapas da minha vida.

À minha irmã, meu sobrinho e toda minha família e amigos por compreender minhas faltas.

À minha sogra e à Maria pelo carinho e dedicação a mim, meu marido e meu filho.

A meu marido pelo amor, confiança e companheirismo e à meu filho Matheus, pelos momentos indescritíveis de felicidade. Amo vocês.

## Sumário

Apoio Financeiro .....	iii
Sumário .....	vi
Lista de Tabelas e Figuras .....	viii
Abreviações.....	x
Resumo .....	1
Abstract .....	3
1. INTRODUÇÃO .....	4
1.1. As epilepsias .....	4
1.2. Modelos experimentais de epilepsias.....	5
1.3. Modelo animal de crises audiogênicas.....	7
1.4. Os Substratos neurais envolvidos na Crise Audiogênica .....	11
1.4.1. Hipocampo .....	12
1.4.2. A Amígdala.....	13
1.5. Epileptogênese.....	15
1.6. Potenciação Sináptica de Longo Prazo (LTP).....	17
1.7. Estudo Eletrofisiológico em Fatias .....	18
2. OBJETIVOS .....	20
2.1. Objetivo Geral .....	20
2.2. Objetivos Específicos .....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1. Padronização dos Registros.....	21
3.2. Seleção dos Animais .....	25
3.3. Preparação das Fatias .....	26
3.4. Bancada Experimental .....	28
3.5. Registro Eletrofisiológico .....	29
3.6. Análise dos Dados .....	31
4. PROTOCOLOS e RESULTADOS .....	32
4.1. EFEITO DA PICROTOXINA SOBRE OS PEPS EM HIPOCAMPO DE WAR E WISTAR.....	32
4.1.1. Considerações Iniciais .....	32
4.1.2. Animais .....	32

4.1.3. Protocolo Experimental .....	33
4.1.4. Resultados .....	34
4.2. EFEITO DA PICROTOXINA SOBRE OS PEPS EM AMIGDALA LATERAL DE WAR E WISTAR.....	37
4.2.1. Considerações Iniciais .....	37
4.2.2. Animais .....	37
4.2.3. Protocolo Experimental .....	37
4.2.4. Resultados .....	38
4.3 INDUÇÃO DE LTP NA AMIGDALA LATERAL DE WAR.....	41
4.3.1. Considerações Iniciais .....	41
4.3.2 Animais .....	41
4.3.3 Protocolo Experimental .....	41
4.3.4. Resultados .....	42
4.4. EFEITO DA PICROTOXINA SOBRE A INDUÇÃO DE LTP NA AMIGDALA LATERAL DE WISTAR E WAR.....	44
4.4.1. Considerações Iniciais .....	44
4.4.2. Animais .....	44
4.4.3. Protocolo Experimental .....	44
4.4.4. Resultados .....	45
5. DISCUSSÃO .....	47
6. CONCLUSÕES .....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1 - Índices de severidade (IS).....	8
Figura 1: Regiões da formação hipocampal.....	13
Figura 2 : Marcação anterógrada para a amígdala do tálamo posterior.....	14
Figura 3: Conexões da amígdala.....	15
Figura 4: Foto atual do setup de eletrofisiologia em fatias.....	22
Figura 5: Típico potencial de campo registrado em CA1 de Hipocampo.....	23
Figura 6: Registro do primeiro potencial de campo obtido.....	24
Figura 7: Potencial de campo registrado em CA1 de Hipocampo.....	25
Figura 8: Potencial de campo registrado na Amígdala Lateral.....	25
Figura 9: Ilustração de um corte coronal (400 $\mu$ m) da amígdala.....	27
Figura 10: Esquema do setup experimental do protocolo 4.1.....	28
Figura 11: Esquema do setup experimental dos protocolos 4.2, 4.3, 4.4.....	29
Figura 12: Posição dos eletrodos de estímulo e registro no hipocampo.....	29
Figura 13: Posição dos eletrodos de estímulo e registro em amígdala.....	30
Figura.14: Ajuste dos cursores para seleção da região de análise da inclinação .....	31
Figura 15: Parâmetros para o cálculo da amplitude.....	31
Figura 16: Esquema do protocolo experimental 4.1.....	33
Figura 17. Efeito da picrotoxina em hipocampo.....	35
Figura 18: Efeito máximo da picrotoxina em hipocampo.....	36
Figura 19: Esquema do protocolo experimental 4.2.....	38
Figura 20. Efeito da picrotoxina em amígdala.....	39
Figura 21: Efeito máximo da picrotoxina em amígdala.....	40
Fig.22: Esquema do protocolo experimental 4.3.....	42
Figura 23. Registro eletrofisiológico na amígdala lateral antes e 45min após o HFS.....	42
Figura 24. LTP na amígdala lateral.....	43



Figura 25: Esquema do protocolo experimental 4.4 .....	45
Figura 26. Registro eletrofisiológico na amígdala lateral, na presença de picrotoxina, antes e após 45min do HFS. ....	45
Figura 27: Indução de LTP na amígdala lateral em presença de picrotoxina. ...	46

## Abreviações

A – amplitude

ABL - Núcleo Basolateral da Amígdala

ABM - Núcleo Basomedial da Amígdala

ACE - Núcleo Central da Amígdala

ACO - Núcleo Cortical da Amígdala

aCSF - Líquido cefalorraquidiano artificial

ADI - Núcleo Dorsolateral da Amígdala

ALV - Núcleo Ventrolateral da Amígdala

AM - Núcleo medial da amígdala

AST - Zona de Transição Amígdalo-Estriatal

Ci - Cápsula interna

cols. - Colaboradores

CPu - Caudado-Putamen

ec - Cápsula Externa

EEG - Eletroencefalograma

EN - Córtex Entorrinal

GABA -  $\gamma$ -ácido aminobutírico

GAERs - Genetic Absence Epileptic Rats

GEPRs - Genetic Epilepsy Prone Rats

h – hora

HFS – Estímulo de Alta Frequência

Hz – Hertz

ic - Cápsula Interna

IS - Índice de Severidade

ot - trato óptico

PIR - Cortéx Piriforme

PTZ - Pentilenotetrazol

LA – Núcleo Lateral da amígdala

LTP - potenciação sináptica de longo prazo (do inglês Long Tern Potentiation)

mA - Miliamperes

min – minuto

mM - Milimolar

mV – Milivolt

$\mu$ A - Microamperes

$\mu$ m – Micrometro

$\mu$ M - Micromolar

$\mu$ s – Microsegundo

ot - Trato Óptico

PEPS - Potencial Excitatório Pós Sináptico

PTZ - Pentilenotetrazol

PR - Córtex Perirrinal

SPL – Nível de pressão sonora

st - estria terminal

WAR – Ratos Wistar Audiogênicos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **131/05** relativo ao projeto intitulado "*Potenciação sináptica a longo prazo na amígdala induzida pelo abrasamento audiogênico*", que tem como responsável André Ricardo Massensini, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **07.12.2005**.

Este certificado expira-se em **07.12.2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **131/05** related to the project entitled "*Long term potentiation in the amygdala after audiogenic kindling*", under the supervision André Ricardo Massensini, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation* (CETEA/UFMG) and was approved in **07.12.2005**.

This certificate expires in **07.12.2010**.

Belo Horizonte, 07 de dezembro de 2005

**PROF. HUMBERTO PEREIRA OLIVEIRA**  
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil  
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)  
Email – [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## Resumo

As epilepsias são desordens do cérebro manifestadas por crises epiléticas espontâneas e recorrentes. São causadas por descargas neuronais hiper-sincronizadas, focais ou generalizadas no cérebro. Apresentam alta prevalência e incidência, causam grande impacto psico-social e físico ao seu portador. Uma classe importante de epilepsia é a que engloba as crises reflexas, que são desencadeadas pela exposição do indivíduo suscetível a um estímulo sensorial, em muitos casos bastante específico. A crise audiogênica é uma forma de epilepsia reflexa que está relacionada a disfunção da via auditiva. No entanto, apesar de a seleção da linhagem dos WAR (ratos wistar audiogênicos) ter sido feita pela susceptibilidade dos animais em desencadear crise quando expostos a um estímulo sonoro de alta intensidade, esses animais apresentam maior sensibilidade, também a desencadear crises quando expostos a outros agentes convulsivantes como eletrochoque, peticotetrazol e pilocarpina. Sugerindo a existência de mecanismos que tornam suas redes neurais, de uma forma geral, hiperexcitáveis e hipersincrônicas.

Neste trabalho avaliou-se o padrão do Potencial Excitatório Pós Sináptico (PEPS) na presença e ausência de picrotoxina, bloqueador do sistema GABA<sub>A</sub> ( $\gamma$ -ácido aminobutírico), em dois substratos neurais de WAR: em hipocampo, local onde o GABA exerce efeito inibitório e em amígdala lateral, onde o GABA exerce potente modulação excitatória. Avaliou-se também a capacidade da geração de modificações plásticas na amígdala lateral de WAR, na presença e na ausência de picrotoxina.

Observamos baixa responsividade à picrotoxina tanto em hipocampo quanto em amígdala de WAR; sugerindo haver alteração do tônus GABA<sub>A</sub> nestes dois substratos neurais. A presença desta alteração em hipocampo de WAR, sugere uma disfunção generalizada nos substratos destes animais, uma vez que não há evidências sobre o envolvimento desta estrutura nas crises audiogênicas. Nossos resultados também demonstram uma tendência no aumento das respostas basais nestas duas estruturas dos WAR quando comparadas às dos wistar controles. Sugerindo um circuito neural

hiperexcitável e mais propenso à geração de crises epilépticas. Não obtivemos potenciação estável e duradoura em amígdala de WAR, provavelmente devido à sua resposta basal já aumentada e saturada, e devido a uma baixa modulação excitatória neste local. Após adição de picrotoxina não observamos LTP em nenhum dos grupos de animais estudados. Observamos que a ação inibitória da picrotoxina nos PEPS, em amígdala, é seguida por uma recuperação da resposta a níveis basais, aumento semelhante ao ocorrido na potenciação de longo prazo.

Os resultados nos permitem concluir que os WAR apresentam alterações no sistema GABA<sub>A</sub> que favorecem a hiperexcitabilidade dos seus circuitos neuronais e que estes animais se comportam como ratos wistar resistentes quando estão com o sistema GABA<sub>A</sub> bloqueado.

## Abstract

Epilepsies are brain disorders characterized by recurrent and spontaneous crises. They are caused by hyper-synchronized discharges, localized or generalized through the brain. Their high incidence and prevalence are responsible for both psycho and social impact. An important class of epilepsy is the reflex epilepsy, initiated by exposure to sensory stimulus. The audiogenic crises, a modality of reflex epilepsy, are related to dysfunction of the auditory pathway. The selection of WAR (Wistar Audiogenic Rats) lineage is based on crises susceptibility induced due to the exposure to the high intensity sound stimulus. Nevertheless these animals show greater sensibility to crises when exposed to other convulsive agents such as electroshock, pentyleneterazole and pilocarpina, suggesting changes on their neuronal network. We study the excitatory post-synaptic potential (EPSP) pattern in the presence and absence of picrotoxin (which blocks the GABA<sub>A</sub> receptors) in the hippocampus and amygdala of WAR lineage. We also analyze the induction of plastic modifications in the lateral amygdala, in presence or absence of picrotoxin.

The results show a reduced response to the toxin, suggesting alteration on the GABA<sub>A</sub> tonus. In the hippocampus, this points to a generalized dysfunction of the neuronal substrates, but there is no evidence of involvement of such structure in audiogenic crises. Our results also show a tendency to increase in the basal response when compared to the control, suggesting a neuronal circuit more excitable and prone to epileptic crises. We did not observe a low or even standing potentiation in the amygdala, probably caused by its increased and saturated basal response and by a reduced excitatory modulation. In presence of picrotoxin LTP was not observed for WAR or Wistar group. The inhibitory effect of picrotoxin in EPSP on the amygdala is followed by a recovery response to basal levels, similar to the increase observed for LTP.

We conclude that WAR show a GABA<sub>A</sub> system alteration leading to a hyper-excitability of their neuronal circuits. These animals also behave as resistant Wistar rats when their GABA<sub>A</sub> system is blocked.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. As epilepsias

O termo “crise” se refere à mudança transitória de comportamento devido ao disparo de neurônios do sistema nervoso central de modo desordenado, sincrônico e rítmico. O termo epilepsia se refere à desordem funcional do cérebro caracterizada pela ocorrência de crises imprevisíveis e recorrentes. As crises podem ser não epiléticas, quando provocadas em um cérebro normal por tratamentos como eletrochoque, por administração de convulsivantes químicos, ou podem ser epiléticas quando ocorrem sem estímulo provocativo (McNamara, 1994).

Então, a epilepsia é uma desordem neurológica crônica, caracterizada por crises espontâneas e recorrentes, decorrentes da hiperatividade e do hipersincronismo neuronal do cérebro. A epilepsia apresenta grande prevalência, afetando aproximadamente 1% da população geral; deste total, 25% de todos os pacientes não respondem a nenhum tipo de terapia e apresentam mortalidade 2 a 3 vezes maior que a população geral (Morimoto e cols, 2004).

As crises podem afetar a consciência, memória, cognição, o estado emocional, comportamento e as funções sensoriais, motoras e neurovegetativas. Nem todas as crises afetam todos estes fatores, mas todas afetam pelo menos um destes. O impacto psicossocial e socioeconômico, além de problemas relacionados à independência, mobilidade, educação, emprego e relacionamentos pessoais, geram grande sofrimento ao indivíduo (Fisher e cols, 2005; International League Against Epilepsy, 2003).

Epilepsia não é uma condição, mas sim uma diversidade de desordens, que apresentam um aumento anormal de predisposição para crises. Esta diversidade se deve às numerosas bases celulares e moleculares envolvidas, bem como às características temporais e espaciais da crise. Pode ter etiologia genética ou adquirida, decorrente de infecções, tumores, trauma, exposição a agentes tóxicos, processos degenerativos e processos vasculares que ocorrem em todas as idades (McCormick e Contreras, 2001; Sutula, 2004; Fisher e cols, 2005).



As crises epilépticas são divididas fundamentalmente em: generalizadas e parciais. Na crise generalizada não há evidência do local de início, envolve simultaneamente todo o cérebro ou grande parte de ambos os hemisférios cerebrais. Na crise parcial há evidências clínicas e eletroencefalográficas que apontam o local de início, que se restringe a uma porção de um hemisfério cerebral apenas. A crise parcial pode se generalizar no decorrer da crise e, desta forma, ser classificada como parcial secundariamente generalizada (Löscher, 1997). São classificadas também como simples, quando há a preservação da consciência ou complexas quando ocorre a perda da consciência (McNamara, 1994).

O estudo das epilepsias, por motivos éticos, depende da utilização de modelos animais. Devido à diversidade de tipos, vários modelos são desenvolvidos buscando mimetizar características específicas de cada tipo de epilepsia humana, com o objetivo de desvendar os mecanismos envolvidos na epileptogênese e fornecer substratos para propor tratamentos mais eficientes e desta forma, promover melhora na qualidade de vida desta população.

## 1.2. Modelos experimentais de epilepsias

Os modelos experimentais de epilepsia são necessários para o estudo dos substratos neurais e mecanismos neuroquímicos envolvidos no fenômeno epiléptico e são também indispensáveis para a seleção de novos agentes anticonvulsivantes e para os estudos de mecanismos de ação de drogas em uso na prática clínica. Cada modelo apresenta características próprias quanto à expressão motora, à eletroencefalografia e à resposta a diferentes agentes antiepilépticos. Cada modelo se aproxima mais de um determinado tipo de epilepsia humana, podendo citar como exemplo: **1)** o modelo com uso de doses de pentilenotetrazol (PTZ), que pode resultar em crises de ausência, crises mioclônicas e crises tônico-clônicas, sendo sua expressão muito semelhante a estes tipos de epilepsias em humanos (Marescaux e cols., 1984; Velisek e cols., 1992), mioclônicas e tônico-clônicas, respectivamente (Löscher e Schmidt, 1988; Mares e Zouhar, 1988); **2)** O modelo por injeção de pilocarpina, associado à epilepsia parcial complexa com foco no lobo temporal (Turski e cols., 1987); **3)** O modelo de atividade convulsiva induzida por penicilina com aplicação sistêmica associado à epilepsia generalizada e com

aplicação cortical associado à epilepsia parcial com generalização secundária (Avoli e Gloor, 1982); **4)** O modelo de crise por eletrochoque transauricular associado também à epilepsia com crises tônico-clônicas generalizadas (Löscher e cols., 1991); **5)** O modelo audiogênico agudo associado à epilepsia generalizada, com crises mioclônicas e tônico-clônicas generalizadas (Dailey e col, 1989; Garcia-Cairasco e cols., 1993) **6)** O modelo de abrasamento elétrico (Racine, 1972) ou audiogênico (Garcia-Cairasco e cols, 1996, Moraes e cols, 2000), associado à epilepsia parcial complexa com envolvimento de estruturas límbicas.

Nos modelos genéticos são necessários dois fatores combinados para se obter a crise. O primeiro é uma predisposição genética determinada, cuja origem está em uma anormalidade dos neurotransmissores associados com os sistemas colinérgico, catecolaminérgico, serotoninérgico e/ou aminoácidos (Jobe e cols, 1981). O segundo fator, também chamado de iniciador, inclui estímulos do meio ambiente tais como luz intermitente, som, hipertermia, mudanças posturais e/ou circunstâncias novas. Alterações neuroquímicas endógenas ou um desequilíbrio hormonal podem também agir como iniciadores. Portanto, para o aparecimento de uma crise epiléptica, no modelo genético, é necessária uma predisposição inata à crise somada a um ou mais iniciadores exógenos ou endógenos. Um indivíduo pode nunca vir a sofrer uma crise epiléptica devido a falta de predisposição ou do(s) iniciador(es) (Aicardi e cols, 1980).

Alguns destes modelos genéticos têm sido muito utilizados para estudos de epilepsia. A epilepsia fotossensível no babuíno senegalês *Papio papio* reproduz muito bem a epilepsia fótica em seres humanos. Estes animais possuem susceptibilidade inata à crise epiléptica, respondendo à estimulação fótica intermitente com uma síndrome eletrofisiológica e comportamental muito semelhante às convulsões induzidas por estimulação fótica em seres humanos. O animal apresenta clônus de pálpebra, de face e de pescoço seguidos dos componentes tônico e clônico e de depressão pós-ictal, com aparente confusão. O eletroencefalograma (EEG) é bilateral e síncrono (Killan e cols, 1966).

Outro modelo genético é o utilizado para estudo de crises de ausência, obtido como uma variante da colônia de Estrasburgo. São animais que

aparecem em determinado momento da seleção genética; foi observado que 38% dos animais apresentavam episódios espontâneos de “repouso” conjugado com síncrono bilateral pico-onda no EEG. Eles foram então selecionados, acasalados entre si e na terceira geração já foi possível obter 100% de animais com crises generalizadas não convulsivas ou de ausência. A colônia é denominada GAERs (Genetic Absence Epileptic Rats). As ondas do EEG são sincrônicas, ocorrem uma vez por minuto e duram 15 segundos em média. Durante as ondas sincrônicas o animal fica imóvel, as vibrissas se movem ritmicamente e o tônus da musculatura cervical diminui progressivamente (Vergnes e cols, 1989).

Outro modelo genético de grande importância para o estudo das epilepsias é o modelo da crise audiogênica em ratos. É um modelo no qual as crises são induzidas por estímulo sonoro de alta intensidade. Este modelo é o objeto de estudo deste trabalho.

### 1.2.1. Modelo animal de crises audiogênicas

A primeira observação de crise audiogênica foi feita em 1924 no laboratório do Dr. Pavlov em St. Petesburg e no Wistar Institute na Filadélfia (Krushinsky e cols., 1970). Estes pesquisadores desenvolveram, a partir de ratos Wistar, a linhagem Krushinsky-Molodkina (Krushinsky, 1979). Outra linhagem, derivada de ratos Sprague-Dawley foi desenvolvida inicialmente na Universidade do Arizona (EUA), os GEPRs - Genetic Epilepsy Prone Rats (Dailey e cols, 1989). No processo de seleção genética foram selecionados dois fenótipos: os GEPRs-3, apresentando crises moderadas e os GEPRs-9, apresentando crises severas. As duas linhagens são mantidas atualmente na Universidade de Illinois, nos Estados Unidos.

Além das linhagens soviética e americana, duas outras derivadas de ratos Wistar foram desenvolvidas. Uma delas está em Strasbourg na França (Kiesmann, 1988) e a outra, denominada WAR (Wistar Audiogenic Rat) foi desenvolvida no Brasil, no Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Um ramo desta linhagem está sendo mantido no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Doretto e cols, 2003). Nestas duas

colônias as crises são do tipo tônico-clônica generalizadas, precedidas por episódios de corridas.

Os animais WAR passam por uma triagem para verificação da susceptibilidade epiléptica audiogênica quando completam setenta dias de idade. Embora os WARs respondam ao estímulo acústico em todas as idades, observações sugerem uma resposta mais estável em animais adultos, por volta dos 70 dias (Doretto e cols, 2003). Esta avaliação consiste em 3 estímulos acústicos com intervalo de 48 horas entre os estímulos. Desta forma, de acordo com a metodologia previamente descrita por Garcia-Cairasco e Sabbatini em 1983 os animais são classificados quanto ao índice de severidade (IS). O IS representa uma escala linear de severidade gradual variando de 0 a 1 e leva em conta a seqüência de eventos característicos das crises audiogênicas. Quanto mais severo for o comportamento, maior será o seu valor no índice (Garcia-Cairasco e Sabbatini, 1983; Garcia-Cairasco e cols, 1996). Os valores de IS mais freqüentemente observados estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Índices de severidade (IS)**

ÍNDICE	COMPORTAMENTO
0,00	Ausência de qualquer comportamento convulsivo
0,11	Um episódio de corrida
0,23	Um episódio de corrida + pulos e quedas atônicas
0,38	Dois episódios de corrida + pulos e quedas atônicas
0,61	Todos os comportamentos anteriores + convulsão tônica com arqueamento dorsal da cabeça
0,73	Todos os comportamentos anteriores + convulsões clônicas parciais e generalizadas
0,85	Todos os comportamentos anteriores + espasmos clônicos
0,90	Todos os comportamentos anteriores + flexão ventral da cabeça
0,95	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão dos membros anteriores
1,00	Todos os comportamentos anteriores + hiperextensão de membros posteriores

Fonte: Garcia-Cairasco e cols., 1996.

Seguindo o protocolo de estimulação sonora, o animal é colocado dentro de um cilindro de acrílico transparente de 32x36x32cm de modo a não interferir na expressão motora da crise, mas permitir uma nítida observação da resposta comportamental. O cilindro, por sua vez, é colocado dentro de uma caixa de madeira acusticamente isolada, medindo 41x41x46cm com a parede frontal de acrílico transparente para permitir a visualização do animal. O estímulo sonoro consiste no som de uma campainha elétrica, gravado em CD, com intensidade sonora equivalente a 120 dB SPL (*Sound Pressure Level*) apresentado durante

um período de 60 segundos ou até que se inicie a crise. O comportamento do animal deve ser registrado 1min anterior, durante e 1 min posterior ao estímulo sonoro.

Uma variante da crise audiogênica aguda, acima descrita, é o abrasamento audiogênico. O termo “abrasamento” ou “*kindling*”, na sua concepção original, refere-se à indução de crises límbicas em animais normais, mediante uso de estímulos elétricos sub-límbicos, administrados repetidamente por um período determinado de tempo, através de eletrodos implantados cronicamente em áreas cerebrais de baixo limiar epiléptico, como amígdala e hipocampo (Goddard, 1967).

O abrasamento ou *kindling* audiogênico difere um pouco da definição original de Goddard, pois no caso do abrasamento audiogênico, os animais são portadores de susceptibilidade epiléptica e os estímulos são supralímbicos, ou seja, o estímulo sonoro aplicado é indutor de crises. Após estímulos repetidos, o padrão original de crise tônico-clônico generalizada é gradativamente substituído por crises cuja expressão motora se assemelha a crises do lobo temporal (crises límbicas) observadas em seres humanos (Marescaux e cols., 1987; Garcia-Cairasco e cols., 1996 ; Moraes e cols., 2000).

A descoberta deste fenômeno ocorreu quando Delgado e Sevillano (1961) observaram que a administração repetitiva de baixos níveis de corrente elétrica no hipocampo induzia a uma progressiva intensificação da crise (citado por McNamara e cols, 1980). Outros pesquisadores observaram que estímulos elétricos diários, através de eletrodo bipolar, em regiões subcorticais de ratos, eventualmente causavam convulsão, apesar da intensidade do estímulo ser baixa e de inicialmente não causar efeito. Observaram também a diminuição da latência da crise, que passou a durar mais tempo, sugerindo o seu agravamento. Denominaram este fenômeno de abrasamento (*Kindling*) e sugeriram que este seria um modelo para estudos da epileptogênese humana, plasticidade neuronal, aprendizagem e memória (Goddard, 1967; Goddard e cols, 1969).

Vergnes e colaboradores (1987) observaram que a estimulação audiogênica crônica e repetitiva, necessária para o abrasamento, provoca uma mudança no fenótipo da crise sugerindo o recrutamento de estruturas límbicas e o agravamento da crise, como o observado no abrasamento elétrico por

Goddard (1969), então cunhou-se o termo “abrasados audiogênicos” ( citado por Moraes e cols, 2000). Corroborando com esta idéia, Hirsch e colaboradores (1993) também sugerem que o abrasamento audiogênico envolve mecanismos similares ao abrasamento obtido por estimulação elétrica e demonstrou o envolvimento de estruturas do sistema límbico (Hirsch e cols, 1993).

Hoje se observa a utilização do termo abrasamento para se referir à evolução progressiva da severidade das crises em resposta à administração periódica e constante de um estímulo qualquer, inicialmente sub-limiar.

Goddard e colaboradores (1969) demonstraram que realizando o abrasamento em uma determinada área, o número de estímulos elétricos necessários para induzir o abrasamento em uma segunda área foi reduzido, ou seja, a susceptibilidade local da segunda área foi alterada, efeito definido como transferência positiva. Foi observado também que, posteriormente, a primeira área perde a habilidade em gerar crise quando estimulada. Este fenômeno de transferência positiva confirma que durante o abrasamento audiogênico, descargas epiléticas do tronco encefálico são disseminadas para estruturas límbicas do prosencéfalo (Hirsch e cols, 1992), fato que explica a mudança no fenótipo da crise.

Alguns pesquisadores relacionaram o abrasamento observado em modelos animais com fenômenos observados em humanos. Assim, existem semelhanças entre o abrasamento em animais, o desenvolvimento progressivo e a intensificação dos sintomas em alguns casos clínicos de epilepsia, pois a redução do limiar para crise pode ser análoga ao primeiro estágio da epileptogênese, quando o irritante neural inicialmente apresenta severidade insuficiente para disparar descargas epiléticas, mas que posteriormente induz a gênese de crises (Pinel, 1981).

Outras sugestões de abrasamento em humanos incluem: a emergência de crises espontâneas e a progressão da intratabilidade clínica após crises febris e dano cerebral, e o posterior recrutamento do lobo temporal contralateral em indivíduos portadores de epilepsia parcial de lobo temporal unilateral (McNamara e cols., 1980; Sutula, 2004).

Este e outros modelos genéticos de epilepsia têm função importante em elucidar os aspectos farmacológicos, eletrofisiológicos e neuroetológicos das síndromes epiléticas.

#### 1.4. Os Substratos neurais envolvidos na Crise Audiogênica

Os substratos neurais envolvidos na crise convulsiva audiogênica aguda são basicamente estruturas do tronco cerebral. A substância negra e o colículo inferior são de importância fundamental na origem e propagação deste tipo de crise (Garcia-Cairasco e cols, 1993; Browning, 1994). O colículo superior, a substância negra e outros sub-núcleos reticulares parecem ser componentes moduladores da via eferente (Doretto e Garcia-Cairasco, 1995).

Dados epidemiológicos europeus e norte americanos indicam que o tipo de crise mais freqüente em humanos é a parcial complexa, com ou sem generalização secundária, acometendo 40-50% de todos os pacientes com epilepsia. A maioria (70-85%) das crises parciais complexas se originam no lobo temporal, ou seja, envolvendo estruturas do sistema límbico, particularmente o hipocampo e na amígdala. Apesar de ser a mais comum é a que apresenta pior prognóstico, com 60-70% dos pacientes desenvolvendo epilepsia intratável (Löscher, 1997).

Uma característica freqüentemente observada na maioria dos pacientes que tem epilepsia do lobo temporal é a extensiva perda neuronal no hipocampo, conhecida como esclerose hipocampal. Pode também ocorrer maciça neurodegeneração em outras estruturas do sistema límbico, incluindo a amígdala (Brandt e cols, 2004).

Na década de 50, vários autores observaram lesão na amígdala em pacientes que morreram devido ao *status epilepticus* (Pitkanen e cols, 1998). Investigando as observações da década de 50, Goddard e colaboradores (1969) descreveram o abrasamento elétrico como um modelo de epilepsia de lobo temporal, e a amígdala foi reconhecida como sendo uma das áreas mais sensíveis, do sistema límbico, para o desenvolvimento deste fenômeno (Goddard e cols, 1969). Como esperado, devido às similaridades entre o abrasamento elétrico e o audiogênico, em 1997, Hirsch e colaboradores indicaram o papel crítico da amígdala na propagação da crise audiogênica do tronco encefálico para o prosencéfalo (Hirsch e cols, 1997).

Dados da literatura sugerem haver alterações genéticas generalizadas em substratos neurais de WAR, que tornam seus substratos mais hiperexcitáveis, facilitando o recrutamento de focos epilépticos quando submetido à estimulação sonora tanto aguda quanto crônica.

#### **1.4.1.Hipocampo**

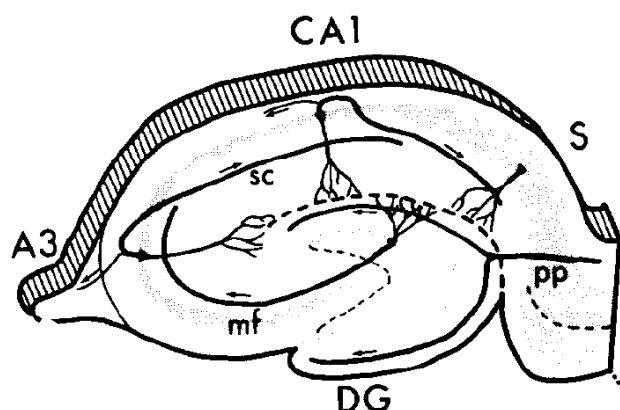
O hipocampo é uma estrutura do sistema límbico situada adjacente ao córtex entorrinal que desempenha função importante no aprendizado e memória (Seling e Malenka, 1997).

A formação hipocampal compreende quatro regiões relativamente simples que incluem o giro denteado, o hipocampo propriamente dito (o qual pode ser dividido em três subdivisões chamadas CA1, CA2 e CA3), o complexo subicular (o qual pode ser dividido em três subdivisões chamadas subiculum, presubiculum e parasubiculum) e o córtex entorhinal, o qual particularmente em roedores, é subdividido em lateral e medial (Amaral e Witter, 1989) Fig.1.

O giro denteado recebe entradas do córtex entorhinal através da via perforante. As células granulares do giro denteado projetam para CA3. As células piramidais de CA3 projetam para CA1 através do chamado colateral de Schaffer (Amaral e Witter, 1989).

As células granulares e piramidais são as principais componentes envolvidas na fisiologia do hipocampo, e GABA e Glutamato são os neurotransmissores dominantes. A sua arquitetura simplificada, com uma separação entre os corpos neuronais das células piramidais de suas sinapses, permite o registro do Potencial Excitatório Pós-sináptico (PEPS) de campo ou os disparos das células piramidais (chamados “population spikes”) dependendo do posicionamento do eletrodo de registro (Seling e Malenka, 1997 ; Mesquita e cols., 2005).





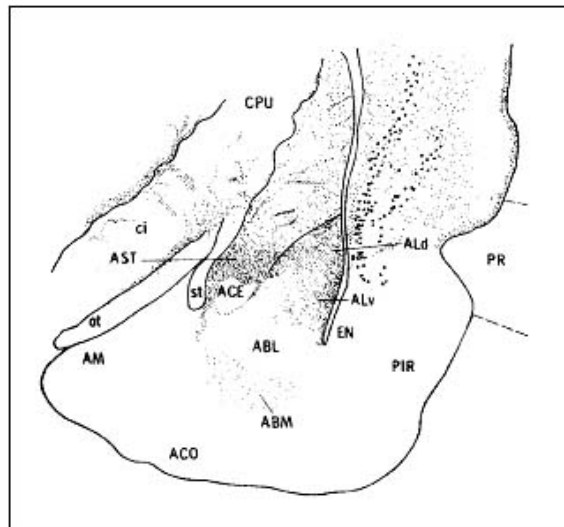
**Figura 1: Regiões da formação hipocampal.** DG: Giro denteado, sc: colateral de Schaffer, pp: via perforante, mf: fibras musgosas (Witter e Amaral, 1989).

#### 1.4.2. A Amígdala

A amígdala é composta por um conjunto heterogêneo de núcleos localizados profundamente no lobo temporal; faz parte do sistema límbico; seus núcleos são interconectados entre si e recebem e projetam impulsos para praticamente todos os níveis do sistema nervoso central. Integra informações do meio interno e externo e tem conexões diretas com núcleos que controlam respostas neurovegetativas e comportamentais relacionadas ao estado emocional e motivacional. (Paré e cols, 2002; Yaniv e cols, 2004; Lamont e cols, 2005).

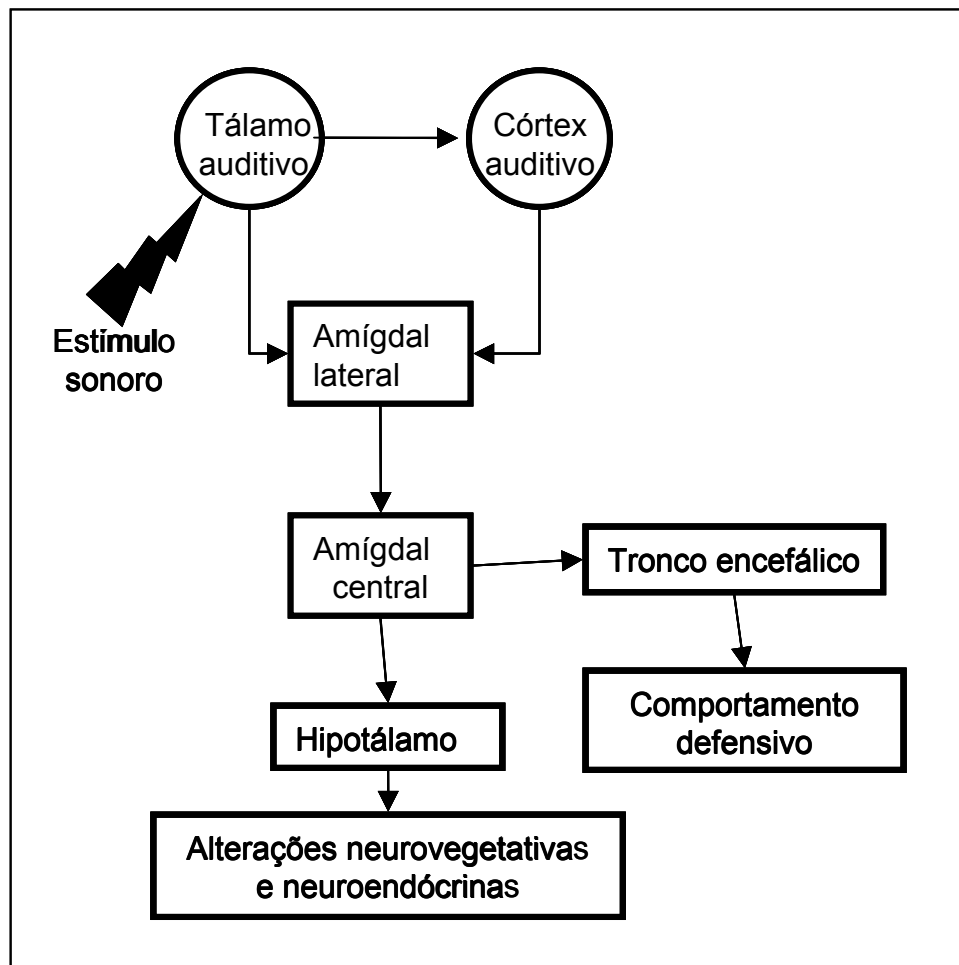
Em humanos, a amígdala está envolvida com a memória emocional de estímulos visuais e auditivos, e em ratos, é descrita como um componente importante na rede que gera respostas comportamentais em resposta a estímulos com significância emocional (Pitkanen e cols, 1998).

Os estímulos acústicos que passam do colículo inferior para o tálamo chegam particularmente à amígdala lateral passando pela zona de transição amígdalo-estriatal. Esta via “tálamo-amígdala” foi caracterizada através de estudos de marcação anterógrada e retrógrada, como mostra a figura 2 (LeDoux e cols, 1990)



**Figura 2 : Marcação anterógrada para a amígdala do tálamo posterior.** Houve marcação significativa após injeção de WGA-HRP (marcador anterógrado) na AST: zona de transição amígdalo-estriatal e ALd: núcleo dorsolateral da amígdala. CPU: caudado-putamen; ci: cápsula interna; ot: trato óptico; AM: núcleo medial da amígdala; st: estria terminal; ACE: núcleo central da amígdala; ACO: núcleo cortical da amígdala; ABL: núcleo basolateral da amígdala; ABM: núcleo basomedial da amígdala; ALV: núcleo ventrolateral da amígdala; EN: córtex entorrinal; PIR: córtex piriforme; PR: córtex perirrinal ( LeDoux e cols, 1990).

Foi descrita, além da via tálamo-amígdala, a via córtico-amígdala, ambas convergindo o processamento auditivo para a amígdala lateral (LeDoux e cols, 1991). A amígdala lateral manda projeções diretas e indiretas para o núcleo central da amígdala que se comunica com o tronco encefálico e regiões hipotalâmicas e então podem desencadear comportamentos defensivos, respostas neurovegetativas e endócrinas, ver figura 3 (Blair e cols, 2001).



**Figura 3: Conexões da amígdala.** Vias pelas quais sinais auditivos chegam aos circuitos que controlam respostas defensivas e alterações neuroendócrinas e neurovegetativas (adaptado de Blair e cols, 2001).

### 1.5. Epileptogênese

Em geral crises epilépticas podem ser geradas por um desequilíbrio entre a excitação e a inibição neuronal, onde glutamato e GABA assumem um papel importante. Neste contexto, há a hipótese de que pode haver um aumento na ativação da via que utiliza o glutamato como neurotransmissor e/ou uma diminuição na via que utiliza o GABA como neurotransmissor (Morimoto e cols, 2004).

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório presente em estruturas cerebrais superiores, enquanto a glicina tem importante papel como neurotransmissor inibitório no tronco cerebral e na coluna vertebral (Nicholls, 1994). Aproximadamente 40% de todas as sinapses cerebrais dos vertebrados são GABAérgicas (Ure e Perassolo, 2000).

Os receptores GABA<sub>A</sub> são compostos pela combinação de subunidades protéicas transmembrânicas ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \rho, \epsilon$  e  $\pi$ ). Essas estruturas se juntam para formar uma estrutura heteropentamérica. A maioria dessas subunidades, porém, se subdividem em múltiplas isoformas polipeptídicas. Como exemplo, pode-se citar as seis isoformas da subunidade alfa ( $\alpha_{1-6}$ ), as três isoformas beta e as três isoformas gama. O receptor GABA<sub>A</sub> possui, além dos sítios de ligação para o GABA e seus agonistas e antagonistas diretos, sítios alostéricos para os benzodiazepínicos, tranquilizantes, esteróides, barbitúricos e picrotoxina. O receptor GABA<sub>A</sub> pode ser ativado seletivamente pelo muscimol e pelo 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridina-3-ol (THIP) e inibido por bicuculina, um antagonista competitivo. Os benzodiazepínicos aumentam a probabilidade de abertura dos canais de cloreto enquanto os barbitúricos prolongam o tempo de abertura desses canais. Já a picrotoxina e pentilenotetrazol bloqueiam o canal.

Apesar de o receptor GABA<sub>A</sub> promover rápida e potente inibição dos neurônios pós-sinápticos, essa propriedade parece depender do sítio de ação e da fase do desenvolvimento e maturação do SNC. Assim, em certas situações, a ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> pode levar à despolarização neuronal no lugar de promover hiperpolarização, mostrando que o GABA também pode ter atividade excitatória (Leinekugel e cols., 1997; Sperber e cols., 1987).

Desde que se verificou a importância da participação do sistema GABAérgico como um dos principais sistemas inibitórios do SNC, especula-se a possibilidade de ele estar envolvido na etiologia da epilepsia em humanos. Na tentativa de averiguar tais especulações, inúmeros trabalhos têm abordado pontos do sistema GABAérgico e apontado alterações que mostram disfunção desse sistema nos modelos experimentais de epilepsia e nos tecidos de necropsia de pacientes epiléticos. Não se pode afirmar, porém, que essas alterações sejam responsáveis diretamente pela gênese de alguma síndrome epilética em humanos.

Segundo Scarlatelli-Lima e colaboradores, os WARs são um modelo genético de epilepsia que apresentam maior susceptibilidade à crise, não somente quando expostos a estímulos sonoros, mas também ao eletrochoque, pentilenotetrazol e pilocarpina (Scarlatelli-Lima e cols, 2003). Portanto é

possível que os mecanismos que tornam esses animais susceptíveis à crises a por um determinado som, sejam decorrentes de fenômenos que criam neles redes neurais hiperexcitáveis e hipersincrônicas, uma vez que eles apresentam baixo limiar para outros agentes convulsivantes.

Investigaremos alteração no sistema GABA<sub>A</sub> em substratos do sistema límbico de WAR havendo a possibilidade de relacioná-la à hiperexcitabilidade e à indução de alterações plásticas deste modelo.

## 1.6. Potenciação Sináptica de Longo Prazo (LTP)

A plasticidade neural dependente da atividade do sistema, parece ser uma propriedade fundamental do sistema nervoso, e as crises convulsivas levam a esta plasticidade, induzindo uma remodelação estrutural e funcional dos circuitos do SNC (Sutula, 2004).

O fenômeno, LTP, foi observado em 1966 por Lomo em estudos de organização sináptica no hipocampo, mas somente em 1968, quando Bliss iniciou os trabalhos de registro no hipocampo para pesquisa sobre memória, foi que a análise dos dados obtidos em 1966 foram relacionados à memória e à plasticidade neuronal. Só em 1973 os pesquisadores publicaram um artigo que lançava o termo LTP à comunidade científica (Revisado por Lomo, 2003).

LTP é definida como um aumento na eficiência (força) sináptica e se caracteriza por ser dependente de experiência, específica da sinapse envolvida – o aumento na força sináptica normalmente não ocorre em outra sinapse na mesma célula -, de associação – a forte ativação de um local da sinapse pode facilitar LTP em uma sinapse ativa adjacente, se elas são ativadas em uma janela temporal pequena -, e apesar de ser disparada rapidamente, pode permanecer por horas em preparações *in vitro* ou por dias *in vivo* (Malenka e Nicoll, 1999; Abraham, 2003).

Existe um debate entre os pesquisadores que discutem se o aumento da força sináptica ocorre através de mecanismos pré-sinápticos e/ou por mecanismos pós-sinápticos. Nicoll propõe que esta confusão existe porque a LTP nos diferentes tipos de sinapses pode ter mecanismos diferentes (Nicoll, 2003).

Nos mecanismos pré-sinápticos, dois acontecimentos permitem o aumento nos níveis da concentração de glutamato na fenda sináptica: a diminuição da

autorregulação da liberação do glutamato, regulação esta, mediada pelos receptores pré-sinápticos; e a diminuição da capacidade dos transportadores de glutamato o retirarem da fenda sináptica. Entre os mecanismos pós-sinápticos podem ocorrer alterações da função e do número dos receptores pós-sinápticos (Morimoto, 2004).

McNamara e colaboradores relacionaram o aumento na resposta evocada, decorrente de uma remodelação funcional, que ocorre no abrasamento, com a potenciação sináptica de longo prazo (LTP), que é classificada como plasticidade sináptica dependente de atividade (McNamara e cols, 1980).

Feng e Faingold submeteram os animais ao protocolo do abrasamento audiogênico (os GEPR-9s) e registraram os potenciais de ação extracelulares, *in vivo*, na amígdala em resposta a um estímulo elétrico no núcleo geniculado medial do tálamo, eles sugeriram que a via tálamo amígdala tornou-se mais eficiente após o abrasamento (Feng e Faingold, 2002a e b). Também neste sentido, Costa utilizando a metodologia de densitometria de corrente sugere que o aumento significativo de sorvedouro na região da amígdala dos ratos WARs submetidos ao abrasamento é um processo de potenciação sináptica, uma vez que houve um aumento no influxo de íons (sorvedouro) (Costa, 2003).

Portanto, verificaremos a susceptibilidade de indução de LTP na amígdala de WAR.

## 1.7. Estudo Eletrofisiológico em Fatias

O desenvolvimento das preparações de fatias de tecido cerebral é um marco importante para os avanços em neurociências. São responsáveis pela maioria dos avanços na compreensão dos aspectos celulares das alterações sinápticas na memória, potenciação e depressão sináptica de longo prazo, principalmente nas sinapses glutamatérgicas (Teyler, 1999).

Estas preparações foram desenvolvidas por Henry McIlwain para estudos bioquímicos na década de 50. Ele foi influenciado pelos achados recentes sobre o diagnóstico eletroencefalográfico e tratamento farmacológico da epilepsia. Ele tinha como objetivo desenvolver uma preparação de tecido isolado, em que ambos os parâmetros químicos e elétricos pudessem ser mensurados e manipulados pelo pesquisador. Ele observou que as fatias não apenas eram metabolicamente viáveis, mas também continham neurônios que

mantiveram estáveis seu potencial de repouso da membrana. Em 1966 foi publicado um artigo por Yamamoto e McIlwain em que eles descreviam a primeira preparação de fatias sinápticamente viáveis, demonstrando que a resposta sináptica pode ser registrada em resposta a uma estimulação elétrica na via aferente (citado por Collingridge, 1995).

Esta metodologia é largamente usada em investigação eletrofisiológica das propriedades dos neurônios, transmissão sináptica, plasticidade sináptica, neurofarmacologia e neuropatologia (Xiao e Wang, 1998).

Apresentam vantagens quanto aos experimentos *in vivo*: Não requer a manutenção das funções fisiológicas do animal. Fácil acesso visual e físico para os eletrodos de registro e estímulo. A possibilidade de facilmente se manipular o ambiente externo, permitindo a observação do comportamento dos neurônios frente a diferentes estímulos, como por exemplo, a aplicação de fármacos neuroativos no banho. A possibilidade de se adquirir várias fatias de um só animal, permitindo que o animal seja teste e controle do experimento. A importante manutenção das relações anatômicas normais o que não ocorre em cultura de células neuronais (Selig e Malenka, 1997; Xiao e Wang, 1998; Suter e cols, 1999).

O registro eletrofisiológico extracelular é possível devido ao fato de que a despolarização intracelular decorrente da abertura de canais dependentes de voltagem ou de ligante é percebida no meio extracelular como uma pequena hiperpolarização. Assim, é possível obter informações sobre a atividade sincrônica dos neurônios. A resultante do potencial de campo obtido corresponde à soma das correntes que fluem em um pequeno volume local no meio extracelular. Como o potencial de campo normalmente não ultrapassa a amplitude de 1mV, deve-se dar especial atenção ao ruído, para que ele não dificulte a identificação do sinal (Selig e Malenka, 1997; Zhou e Poon, 2000).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Estudar o tônus GABAérgico em hipocampo e amígdala de ratos geneticamente epilépticos – os WAR; e verificar se alterações neste tônus interferem na indução de LTP na amígdala.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Padronizar os registros dos PEPS em hipocampo e amígdala, utilizando-se a técnica de eletrofisiologia em fatias;
- Avaliar o PEPS no hipocampo de WAR, na ausência e presença de picrotoxina.
- Avaliar o PEPS na amígdala de WAR, na ausência e presença de picrotoxina.
- Verificar se a LTP pode ser induzida na amígdala dorsolateral dos WARs após estimulação de alta frequência (HFS) nas fibras vindas do tálamo auditivo;
- Observar se a indução da LTP na amígdala dorsolateral por estimulação de alta frequência (HFS) na aferência talâmica pode ser influenciada pela presença de picrotoxina .



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Padronização dos Registros

- Descrição do sistema de registro:

Com o objetivo de criar uma blindagem eletromagnética o sistema de registro foi montado dentro de uma gaiola de Faraday (1m e 18cm de largura X 93cm de altura X 70cm de profundidade). No primeiro protocolo utilizamos uma lupa com capacidade de aumento de 40 vezes. Nos outros protocolos utilizamos um microscópio modelo Axioskop (Axon instruments, USA).

Como o sistema é muito sensível às vibrações externas utilizamos um sistema anti-vibratório sob o microscópio e sob os pés da mesa.

O aCSF do sistema de perfusão, necessário para a nutrição e oxigenação da fatia, foi aplicado à câmara de registro por meio da ação da gravidade e removida através de sucção à vácuo por um aparelho localizado fora da gaiola. Foi construída uma interface entre a câmara de registro e o vácuo, para que desta forma, evitássemos inserção de ruído eletromagnético no sistema.

As micropipetas de registro (eletrodos) foram fabricadas num estirador vertical a partir de capilares de vidro de borossilicato, parede fina e com monofilamento (World Precision Instruments, TW150F-3). A ponta do eletrodo possui diâmetro de 2-5 $\mu$ m, foi preenchido com a solução de aCSF e apresentava resistência de 0,5-1M $\Omega$  (Selig e Malenka, 1997; Zhou e Poon, 2000).

- O estimulador:

Uma vez que nosso trabalho consiste na observação de respostas evocadas, foi necessária também a utilização de um estimulador elétrico capaz de evocar respostas bioelétricas das fatias de cérebro. Foram testados 6 estimuladores, dois dos quais participei ativamente da construção e dos testes necessários para obtermos os parâmetros adequados. Atualmente utiliza-se, para os protocolos de eletrofisiologia em fatias, o Stimmt, estimulador desenvolvido pelo Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes e pelo aluno de doutorado Vinícius Rosa Cotta. O equipamento é um gerador de corrente

controlado por computador e oferece flexibilidade, pois todos os parâmetros necessários podem ser modificados, e alta qualidade, pois não gera ruído.



**Figura 4: Foto atual do setup de eletrofisiologia em fatias.** (1) Micromanipulador e eletrodo de estímulo (2) Micromanipulador e eletrodo de registro (3) Microscópio (4) Interface entre câmara e vácuo (5) Estimulador.

#### -Obtenção do Registro

O estímulo aplicado pelo estimulador para a obtenção de resposta basal através de um eletrodo bipolar foi monofásico e de baixa frequência, capaz de deflagrar respostas estáveis mas não causar facilitação ou depressão sináptica (Selig and Malenka, 1997).

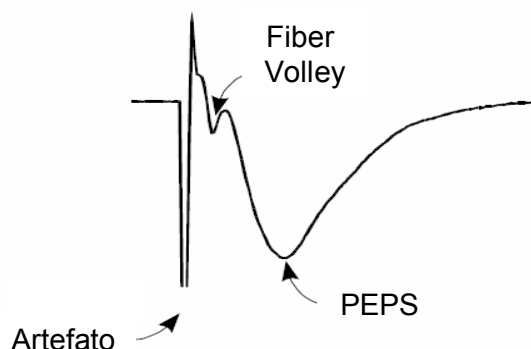
Existem na literatura vários parâmetros descritos como sendo capazes de gerar LTP em varias estruturas, escolhemos o que foi capaz de gerar LTP nos animais controle. Para a geração do LTP os parâmetros foram os seguintes: 4 estímulos de 1s a 100Hz aplicados quatro vezes, separados por um intervalo de 20s (Dalbem e cols., 2005).

#### - Os primeiros registros

De acordo com a literatura, registro eletrofisiológico em hipocampo é um ótimo ponto para o começo, pois as fatias são fáceis de preparar, apresentam respostas estáveis por horas bem como uma estrutura laminar bem definida.

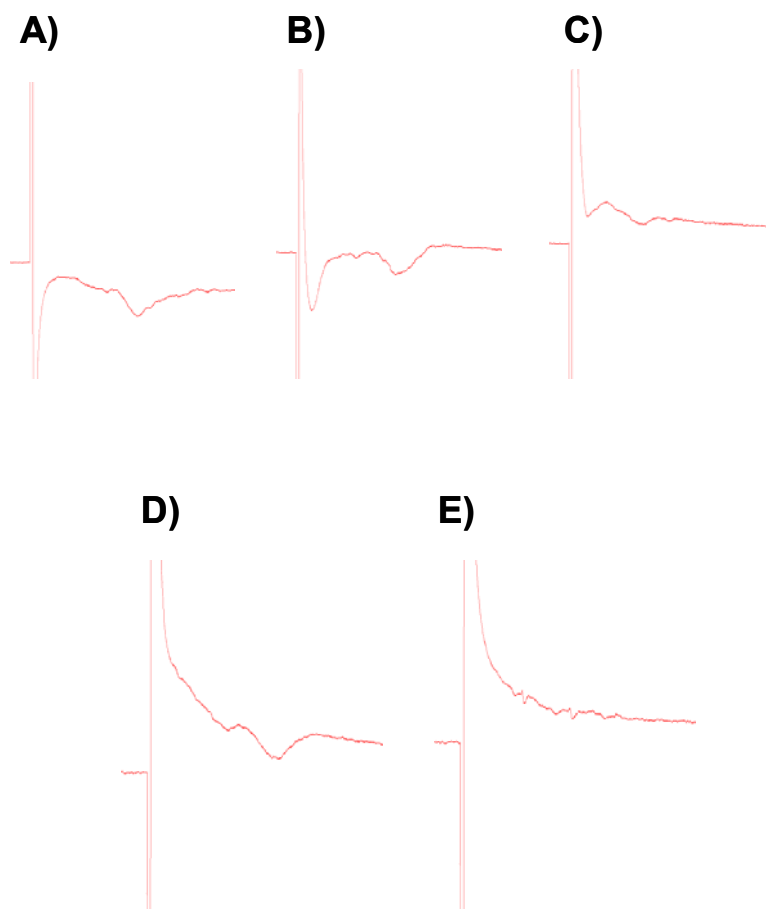
Frente a nossa inexperiência, realizávamos testes para garantir que o sinal observado era um sinal biológico, ou seja, um potencial de campo e não um

ruído ou um artefato gerado pelo estímulo. Tínhamos que obter um resposta que fosse visivelmente parecida com as respostas da literatura Fig.: 5.



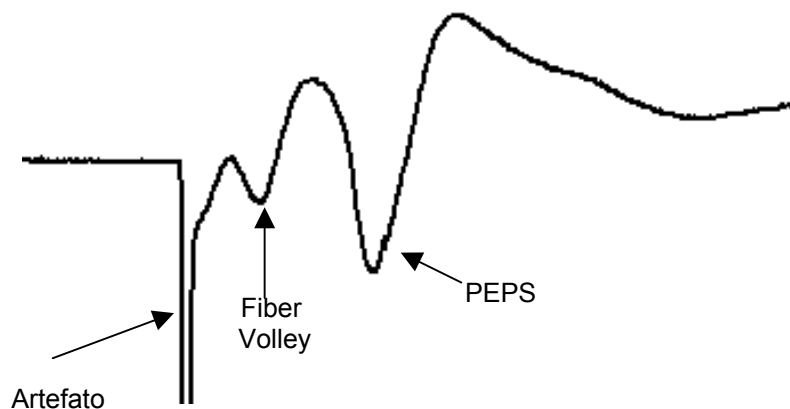
**Figura 5: Típico potencial de campo registrado em CA1 de Hipocampo.** Observa-se o artefato do estímulo, o Fiber Volley, que é a resposta das fibras pré-sinápticas e o PEPS, que é a resposta pós sináptica (Selig and Malenka, 1997).

O primeiro teste é fazer a inversão da polaridade do estímulo (Fig. 6. B) pois somente o que é artefato inverte sua polaridade e a resposta bioelétrica permanece na mesma polaridade e mesma latência. Retira-se o cálcio do aCSF e adiciona-se quelante (EGTA), desta forma esperou-se que toda resposta pós-sináptica, que é dependente de cálcio e que é o objeto deste estudo, diminuísse significativamente ou desaparecesse (Fig.6.C). No último teste adiciona-se lidocaína ao banho, e esperava-se que todo o sinal bioelétrico pré ou pós sináptico desaparecesse (Fig. 6.E), visto que a lidocaína é um bloqueador de canais de sódio, que é necessário para a propagação do estímulo nervoso.



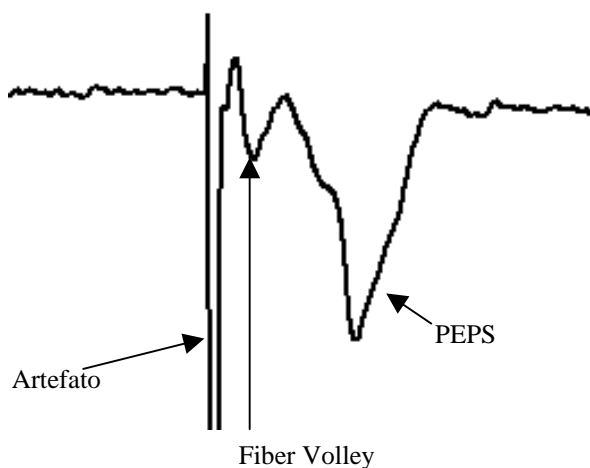
**Figura 6: Registro do primeiro potencial de campo obtido.** (A) Sinal estável. (B) Inversão da polaridade do estímulo. (C) Adição de aCSF livre de cálcio (D) Retorno do aCSF normal. (E) Adição de lidocaína ao banho.

O primeiro protocolo teve início quando se tinha certeza da confiabilidade dos dados e quando a resposta obtida tinha características idênticas às da literatura Fig. 7.



**Figura 7: Potencial de campo registrado em CA1 de Hipocampo.** Observa-se o artefato do estímulo, o Fiber Volley e o PEPS. Registro representativo dos demais obtidos durante os experimentos no NNC.

Depois de dominada a técnica de registro em hipocampo, passou-se então a fazer registro de potencial de campo na amígdala Fig.8.



**Figura 8: Potencial de campo registrado na Amígdala Lateral.** Observa-se o artefato do estímulo, o Fiber Volley e o PEPS. Registro representativo dos demais obtidos durante os experimentos no NNC.

### 3.2. Seleção dos Animais

Foram utilizados ratos machos da colônia WAR criados e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências

Biológicas da UFMG e ratos Wistar machos não susceptíveis ao estímulo sonoro indutor de crises, procedentes da população geral do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO).

O critério usado para excluir um animal do grupo resistente foi a apresentação de no mínimo uma corrida (ver tabela 1). A inclusão no grupo dos animais susceptíveis é a apresentação de no mínimo duas convulsões com índice maior ou igual a 0.85 segundo a escala de Garcia-Cairasco (Garcia-Cairasco e Sabbatini, 1991; Garcia-Cairasco e cols, 1996).

Os animais foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 14 horas de luz por 10 horas de escuro, iniciando o período de luz às 6 horas da manhã, com livre acesso à água e ração.

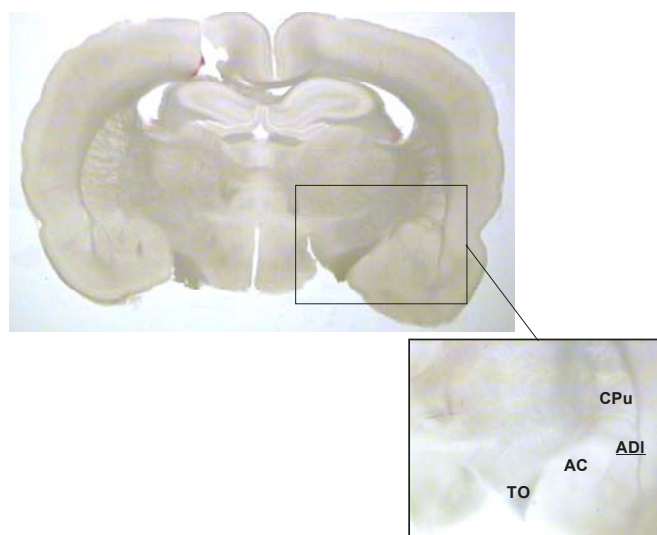
Cuidados foram tomados para se evitar sofrimento desnecessário, bem como para minimizar o número de animais utilizados. Todos os protocolos estão de acordo com o Comitê em Experimentação Animal (CETEA).

### 3.3. Preparação das Fatias

Após a decapitação e craniotomia, o cérebro foi rapidamente e cuidadosamente removido, transferido para imersão em uma solução resfriada a 2-3 °C e contendo baixo cálcio - o líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) (em mM): NaCl (125), KCl (2,5), MgCl<sub>2</sub> (3,0), CaCl<sub>2</sub> (0,1), glicose (25), NaHCO<sub>3</sub> (25), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,25). Esta solução possui osmolaridade entre 305 e 310 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O e pH próximo de 7,4 quando equilibrada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) por 3 a 5 minutos (Ogawa, 2002). Os sais utilizados na preparação do aCSF foram adquiridos da Merck S.A. (Darmstadt, Alemanha).

Em seguida o cérebro foi colado com éster de cianoacrilato (SuperBonder) na base de um suporte retangular de aço inox e o conjunto posicionado no interior da cuba do vibrátomo (Vibratome, Series 1000 – Technical Products International). Uma vez dentro da cuba o cérebro foi coberto com aCSF e foram cortadas fatias transversais de 400µm contendo a formação hipocampal, no primeiro protocolo e contendo a amígdala nos demais protocolos.

A amígdala, em um rato adulto, possui aproximadamente 2.860  $\mu\text{m}$ . Considerando que o núcleo dorsolateral da amígdala é o objeto de estudo e tomando como referências o trato óptico, o núcleo central da amígdala e o caudado-putamem, tem-se aproximadamente 1.500  $\mu\text{m}$ . No plano transversal, a amígdala apresenta fácil identificação devido a sua forma triangular e seu contorno lateral pela cápsula externa Fig.9.



**Figura 9: Ilustração de um corte coronal (400 $\mu\text{m}$ ) da amígdala.** ADI - núcleo dorsolateral da amígdala, e suas áreas de referência CPu:caudado-putamen; TO: trato óptico e AC: núcleo central da amígdala.

As fatias foram transferidas para uma câmara de incubação contendo aCSF, borbulhado continuamente com carbogênio e foram mantidas em temperatura ambiente por 60 minutos antes do registro. Este tempo de descanso deve ser respeitado, pois durante este período, há a possibilidade de nenhuma atividade neuronal ser observada, o que é devido ao trauma na preparação das fatias (Taschenberger e Gersdorff, 2000; Weisskopf e cols., 1999).

A fatia assim obtida, foi transferida, com auxílio de pipeta Pasteur, à câmara de registros que estava posicionada na lupa, que se encontra no interior da gaiola de Faraday. A câmara, com capacidade volumétrica de 1ml, foi perfundida com aCSF normal que continha as mesmas concentrações do aCSF baixo cálcio exceto por conter 1,0mM  $\text{MgCl}_2$  e 2,0mM  $\text{CaCl}_2$ . Esta

solução foi borbulhada, com carbogênio e foi perfundida a um fluxo de 1,5ml/min. A fatia foi imobilizada com uma arpa fabricada em nosso laboratório, utilizando-se aro metálico e fios de nylon.

Os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. Nesta temperatura a demanda metabólica da fatia é menor, o que retarda sua deterioração. Assim, é possível obter registros de boa qualidade e por tempo prolongado (Selig e Malenka, 1997; Weisskopf e LeDoux, 1999; Taschenberger e Gersdorff, 2000; Ogawa, 2002).

### 3.4. Bancada Experimental

No protocolo 4.1, o estímulo elétrico utilizado para evocar a resposta bioelétrica da fatia foi gerado pelo estimulador SD9 da marca Grass (Quincy, Massachusetts). Uma micropipeta conectada ao suporte-fixador da micropipeta (*holder*) que possui um eletrodo de Ag/AgCl e que se encaixa no *Headstage* modelo HS-2A 1LU (Axon Instrument, USA) captou o sinal bioelétrico gerado na fatia e o enviou para CyberAmp 380 (Axon Instruments, USA). Esse equipamento filtra (filtro passa banda – 1Hz a 3KHz) e amplifica o sinal captado. O sinal analógico, assim processado foi acoplado a uma placa de conversão analógica/digital (6023E, National Instruments) através de uma interface construída em nosso laboratório, para ser processado em computador. O programa utilizado para a aquisição dos dados foi o WinWCP V5.5. (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, Escócia) e para a análise o programa pClamp 9.2 (Axon, USA) Fig. 10.

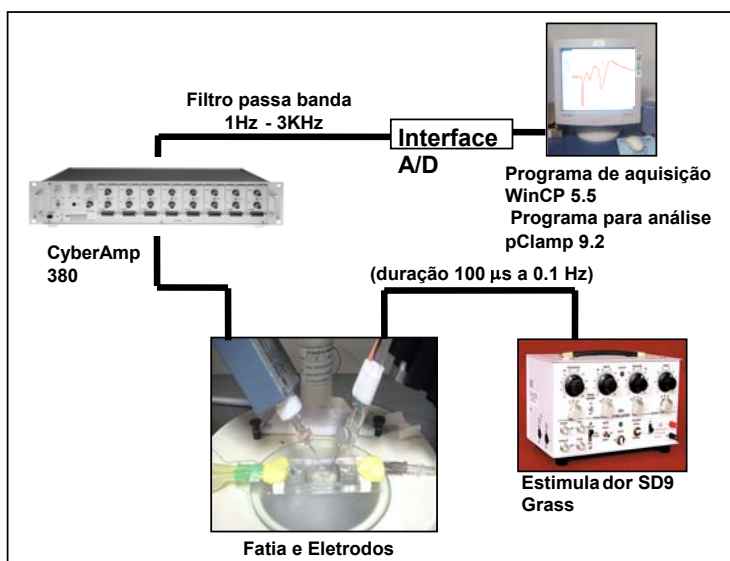


Figura 10: Esquema da bancada experimental do protocolo 4.1.



A bancada dos demais protocolos foi o mesmo descrito acima, com exceção da lupa que foi substituída pelo microscópio Axioskop (Axon instrument, USA), do estimulador SD9 que foi substituído pelo Stimmt e do filtro utilizado (filtro passa banda - 0,1 a 600Hz) Fig 11.

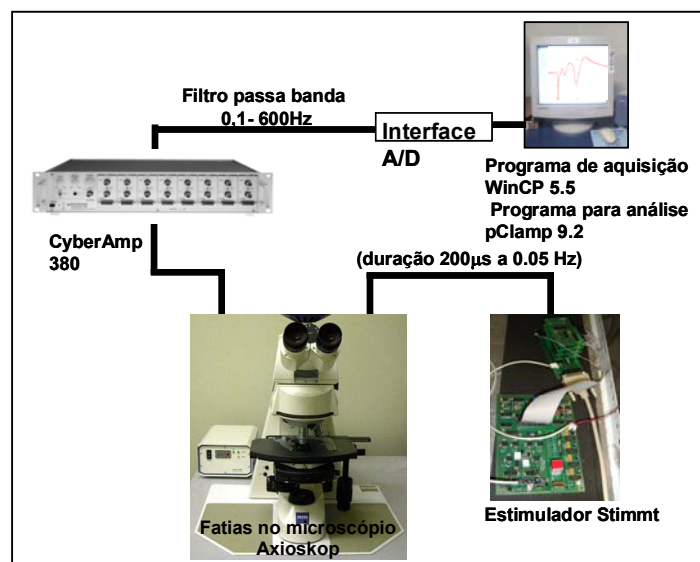


Figura 11: Esquema da bancada experimental dos protocolos 4.2, 4.3, 4.4.

### 3.5. Registro Eletrofisiológico

No hipocampo (protocolo 4.1) o eletrodo de registro foi posicionado no *stratum radiatum* de CA1 e o eletrodo de estímulo foi posicionado perpendicularmente às fibras do Colateral de Schaffer (Fig.12 ).

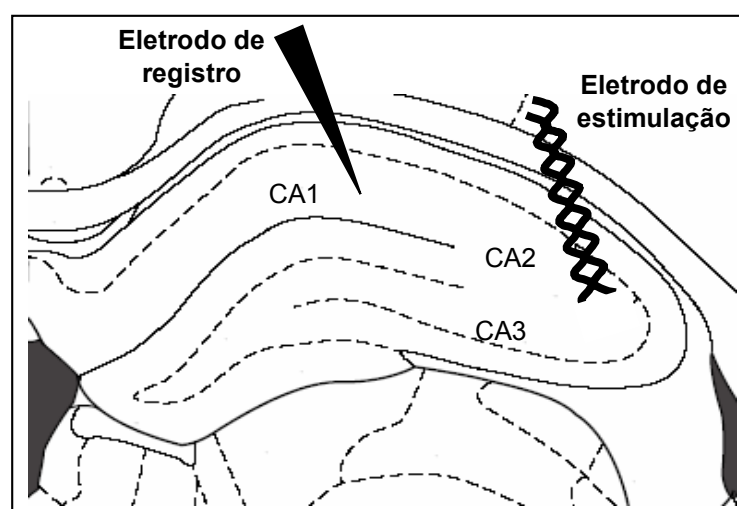
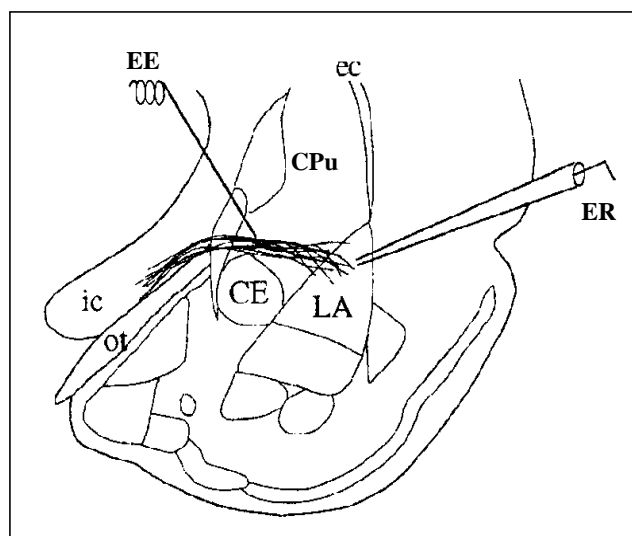


Figura 12: Posição dos eletrodos de estímulo e registro no hipocampo.

Na amígdala (protocolos 4.2, 4.3, 4.4) os registros foram realizados na divisão dorsolateral do núcleo lateral da amígdala. Pois nosso modelo experimental é audiogênico, e é esta região que recebe as informações auditivas do tálamo (Pitkanen e cols, 1998).

O eletrodo de estímulo foi posicionado nas fibras da via tálamo-amígdala (acústico-límbica), acima do núcleo central da amígdala. Esta via inicia-se no núcleo geniculado medial do tálamo, passa acima do núcleo central da amígdala, através do estriado acústico (caudado-putamen-CPu) e termina no núcleo lateral da amígdala. As aferências talâmicas, se dirigem à amígdala pelo pedúnculo cerebral e, passam medial e paralelamente ao trato óptico (LeDoux e cols, 1990). Portanto, o estímulo foi aplicado no CPu, logo acima do núcleo central da amígdala e foi registrado no núcleo lateral da amígdala Fig. 13.



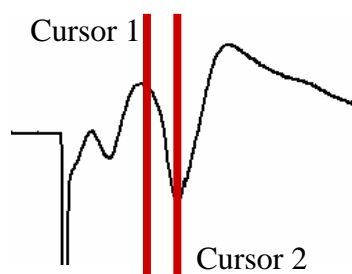
**Figura 13: Posição dos eletrodos de estímulo e registro em amígdala.** EE: eletrodo de estímulo; ER: eletrodo de registro; CE: núcleo central da amígdala; ec: cápsula externa; ic: cápsula interna; ot: trato óptico; CPu: caudado-putamen, LA: núcleo lateral da amígdala (Weisskopf e cols, 1999).

### 3.6. Análise dos Dados

- Inclinação

Análise do protocolo .4.1.

A cada estímulo gerado, gravava-se a resposta no computador. Terminada a aquisição, os dados eram exportados para o programa pClamp 9.2 (Axon, USA) e fazia-se a promediação dos sinais de 5 em 5min. Os 5min anteriores à adição de picrotoxina foram considerados a resposta basal e foram comparados com os demais pontos posteriores à adição da droga. Extraia-se a maior inclinação do PEPS (Fig.14) e então se comparavam as inclinações obtidas antes e após a adição da picrotoxina.

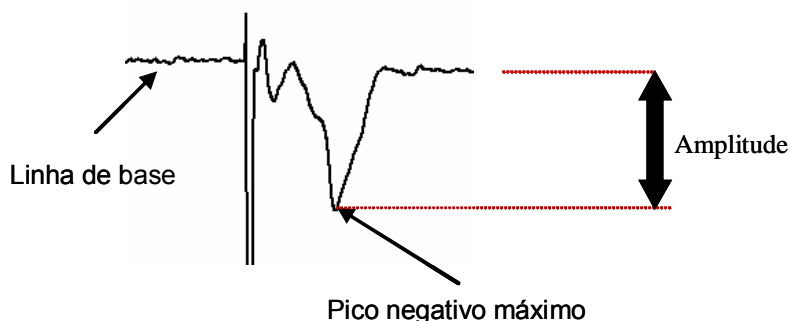


**Figura.14: Ajuste dos cursores para seleção da região de análise da inclinação**

- Amplitude

Análise do protocolo .4.1.2, 4.3, 4.4.

Fez-se a promediação dos sinais de 5 em 5 min e comparou-se o ponto imediatamente anterior à adição de picrotoxina (considerado 100%) com os demais pontos. Nos traços obtidos considerou-se a linha de base, a linha anterior ao estímulo e o pico da amplitude, o pico negativo máximo (Fig.15).



**Figura 15: Parâmetros para o cálculo da amplitude**

## 4. PROTOCOLOS e RESULTADOS

### 4.1. EFEITO DA PICROTOXINA SOBRE OS PEPS EM HIPOCAMPO DE WAR E WISTAR

#### 4.1.1. Considerações Iniciais

Apesar de haver morte neuronal em hipocampo de humanos e de modelos animais de epilepsia de lobo temporal, os dados da literatura sugerem que, nos WAR, o hipocampo não é uma estrutura importante do sistema límbico para a geração de epilepsia de lobo temporal, pois a sua perda neuronal é tardia e não há reorganização estrutural após as crises (Galvis-Alonso e cols, 2004).

Entretanto dois estudos recentes demonstraram alteração no sistema GABAérgico em hipocampo destes animais (Ribeiro dos Santos, 2001; Mesquita e cols, 2005). Observou-se também, neste modelo experimental de epilepsia, um menor limiar para crises geradas por outros agentes convulsivantes (Scarlatelli-Lima e cols, 2003), sugerindo que não somente estruturas que fazem parte do sistema auditivo ou os gatilhos das crises audiogênicas tanto agudas como crônica podem apresentar alteração funcional genética neste modelo, mas que os substratos neurais destes animais estão inespecificamente alterados.

O objetivo deste protocolo é verificar se há alterações nas respostas basais e alteração funcional, relacionada ao sistema GABAérgico no hipocampo de WAR. Para isto será comparada a neurotransmissão GABAérgica em hipocampo de WAR versus wistar resistente.

Hipóteses:

A resposta basal em WAR esta aumentada

Há diminuição do tônus GABAérgico inibitório no hipocampo de WAR.

#### 4.1.2. Animais

Foram utilizados 6 ratos machos (n= 7 fatias) da colônia WAR e 7 ratos Wistar machos (n= 8 fatias), com idade média de 13 semanas.

#### 4.1.3. Protocolo Experimental

Os parâmetros do estímulo eram os seguintes: pulso monofásico, duração 100 $\mu$ s, frequência 0,1Hz e a intensidade variou de 50 a 80V.

Iniciou-se o registro do PEPS perfundindo aCSF normal por 5 minutos. Verificada a estabilização do sinal, perfundiu-se aCSF livre de cálcio e contendo EGTA por mais 5 minutos, a fim de verificar que o sinal observado representa a atividade de sinapses químicas, prosseguia-se o registro somente se o sinal diminuísse significativamente. Retornava-se o aCSF normal e esperava-se 30min para a estabilização da resposta, então adicionava-se picrotoxina (50 $\mu$ M) ao aCSF, para bloquear a transmissão GABAérgica rápida dos receptores tipo A (Fornecida pela Research Biochemicals International, Natick, Estados Unidos) e registrava-se por mais 30 minutos.

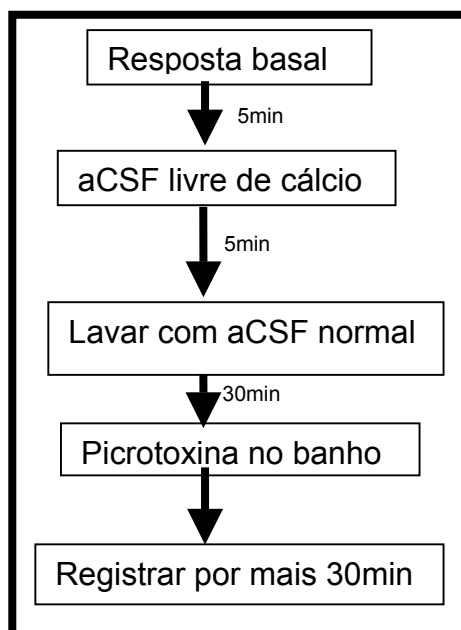


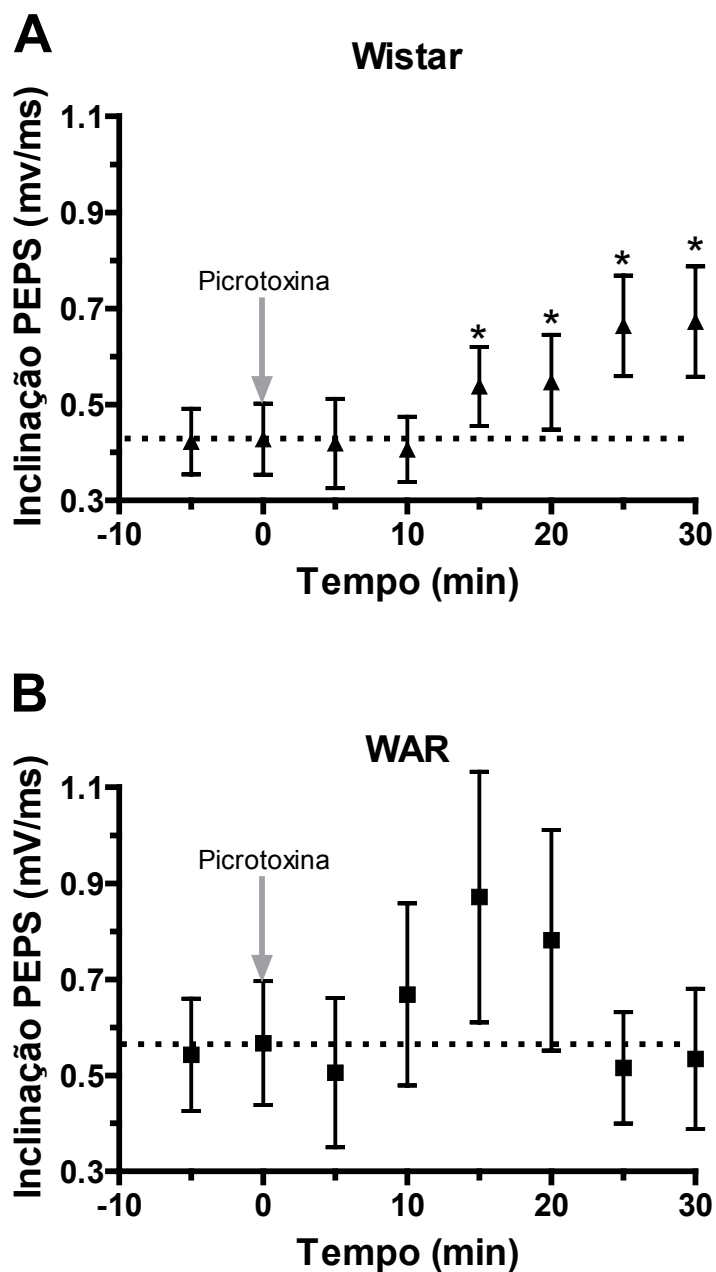
Figura 16: Esquema do protocolo experimental 4.1.

#### 4.1.4. Resultados

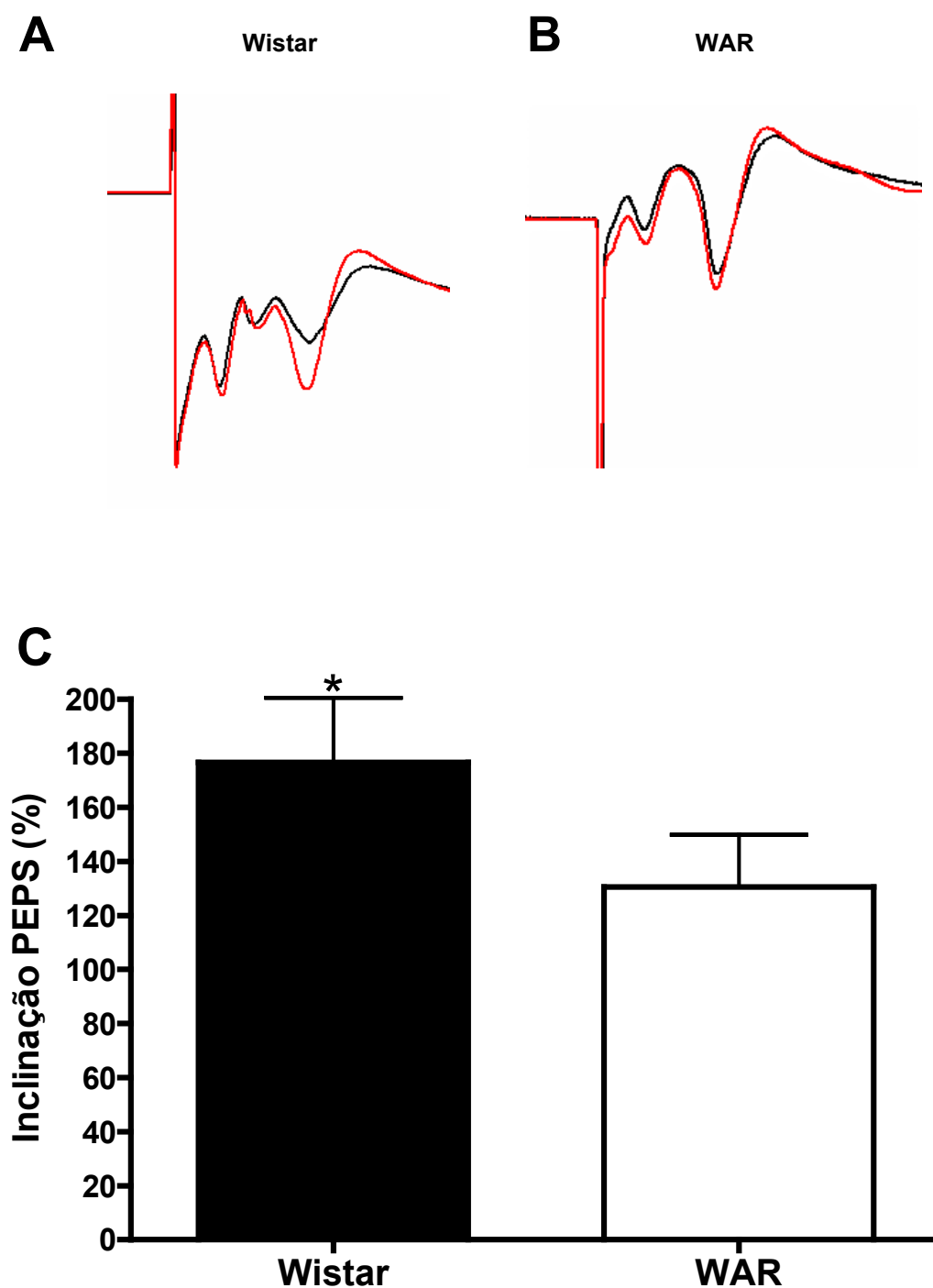
Quando picrotoxina foi aplicada ao banho, observamos no grupo Wistar resistente um aumento na inclinação do PEPS que iniciou após 15 minutos de tratamento e atingiu um máximo em 30 minutos (Fig 17A). Entretanto, no grupo de WAR, observamos grande variabilidade das respostas, resultando em grandes barras de erro, e nenhum ponto de aumento estatisticamente significativo (Fig. 17B).

Para compararmos os PEPS basais entre os dois grupos, utilizamos os dados brutos. A média das inclinações basais de wistar foi de  $0,42 \pm 0,07 \text{mV/ms}$  (Fig. 19A) e para WAR foi de  $0,56 \pm 0,12 \text{mV/ms}$  (Fig. 19B)  $p > 0,05$ . Comparamos também a média basal dos WAR com a média dos wistar 30 min após adição da picrotoxina  $0,67 \pm 0,11 \text{mV/ms}$ ,  $p > 0,05$ . (Teste *t* de Student).

Para reduzir a variabilidade que existe entre as fatias, normalizamos os valores das inclinações do PEPS, considerando 100% o ponto imediatamente anterior ao tratamento com picrotoxina. Com esta análise, calculamos que a inclinação de PEPS após 30 minutos de tratamento (efeito máximo da droga) foi de  $176 \pm 23\%$  no grupo Wistar resistente (**\* $p < 0.02$** ) e de  $130 \pm 19\%$  no grupo de WAR,  $p > 0.05$ . (Teste *t* de Student) (Fig 18).



**Figura 17. Efeito da picrotoxina em hipocampo.** Os valores representam os dados brutos das inclinações dos PEPS. Os pontos representam as médias das inclinações dos PEPS a cada 5min (media  $\pm$  e.p.m). As respostas basais foram registradas por 10 min, no momento 0 foi adicionada picrotoxina e registradas as respostas por mais 30 min **(A)** Observamos aumento significativo da inclinação  $*p < 0,05$  iniciando-se 15min após aplicação da picrotoxina nos animais wistar ,porém não para os WAR **(B)**  $p > 0,05$ . A média basal para wistar  $0,42 \pm 0,07 \text{mV/ms}$  e para WAR foi  $0,56 \pm 0,12 \text{mV/ms}$   $p > 0,05$ . Comparamos também a média basal dos WAR com a média dos wistar 30 min após adição da picrotoxina  $0,67 \pm 0,11 \text{mV/ms}$   $p > 0,05$  (Teste t de Student).



**Figura 18: Efeito máximo da picrotoxina em hipocampo.** (A) e (B) representam os registros eletrofisiológico antes (em preto) e no efeito máximo da picrotoxina (em vermelho) (30min) para wistar e WAR respectivamente. Em (C) as barras representam as médias normalizadas das inclinações dos PEPS 30min após a adição de picrotoxina no hipocampo. Nos wistar houve aumento significativo das inclinações dos PEPS em resposta à picrotoxina, média 30 min após aplicação da picrotoxina  $176 \pm 23\%$   $*p=0,02$ , enquanto que para os WAR o mesmo não ocorreu, média  $130 \pm 19\%$   $p>0,05$ . Para os 30min entre WAR e Wistar  $p>0,05$  (Teste t de Student).



## 4.2. EFEITO DA PICROTOXINA SOBRE OS PEPS EM AMÍGDALA LATERAL DE WAR E WISTAR

### 4.2.1. Considerações Iniciais

Em 2002 foi descrita a importância da via tálamo-amígdala (do corpo geniculado medial do tálamo para o núcleo lateral da amígdala) na transmissão acústico-límbica, e foi sugerido que transformações plásticas nesta via podem contribuir para a resposta aumentada e a expansão da rede neuronal para estruturas límbicas no abramento audiogênico (Feng e Faingold, 2002). Outro estudo mostrou que neste modelo de epilepsia de lobo temporal há morte neuronal e reorganização estrutural (brotamento axonal) na amígdala (Galvis-Alonso e cols.,2004).

Ou seja, em modelo crônico audiogênico os dados da literatura mostram que a amígdala faz parte dos substratos neurais envolvidos na crise. O recrutamento da amígdala a partir de um foco primário sugere alterações genéticas funcionais nesta estrutura de WAR. Outro fator interessante é que em amígdala, há resultados que descrevem o potente efeito modulatório excitatório de receptores GABAérgicos (Woodruff e cols. 2006).

O objetivo deste protocolo é verificar se há alterações nas respostas basais e alteração funcional, relacionada ao sistema GABAérgico na amígdala lateral de WAR. Para isto será comparada a neurotransmissão GABAérgica em amígdala de WAR versus wistar resistente.

Hipóteses:

A resposta basal em WAR esta aumentada

Há diminuição do tônus GABAérgico modulatório excitatório na amígdala de WAR.

### 4.2.2. Animais

Foram utilizados 4 ratos machos (n= 4 fatias) da colônia WAR com idade média de 18 semanas e 3 ratos Wistar machos (n= 3 fatias) resistentes com idade média de 15 semanas.

### 4.2.3. Protocolo Experimental

Obtidos os primeiros PEPS, fazia-se a curva corrente versus resposta em que selecionava-se o estímulo elétrico capaz de evocar 50% da resposta. Para o estímulo, aplicamos pares de pulsos a 0,05 Hz (intervalo entre os pulso de 50

ms) de 100 - 300  $\mu$ A, e de 200 us de duração (somente a primeira resposta foi avaliada).

Iniciou-se o registro dos PEPS perfundindo-se aCSF normal por 20 minutos. Verificada a estabilização do sinal adicionava-se picrotoxina (50 $\mu$ M) ao aCSF e registrava-se por mais 30 min.

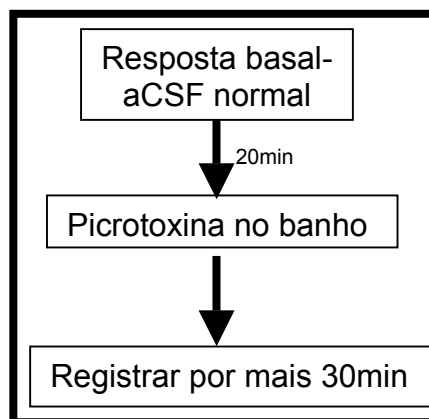


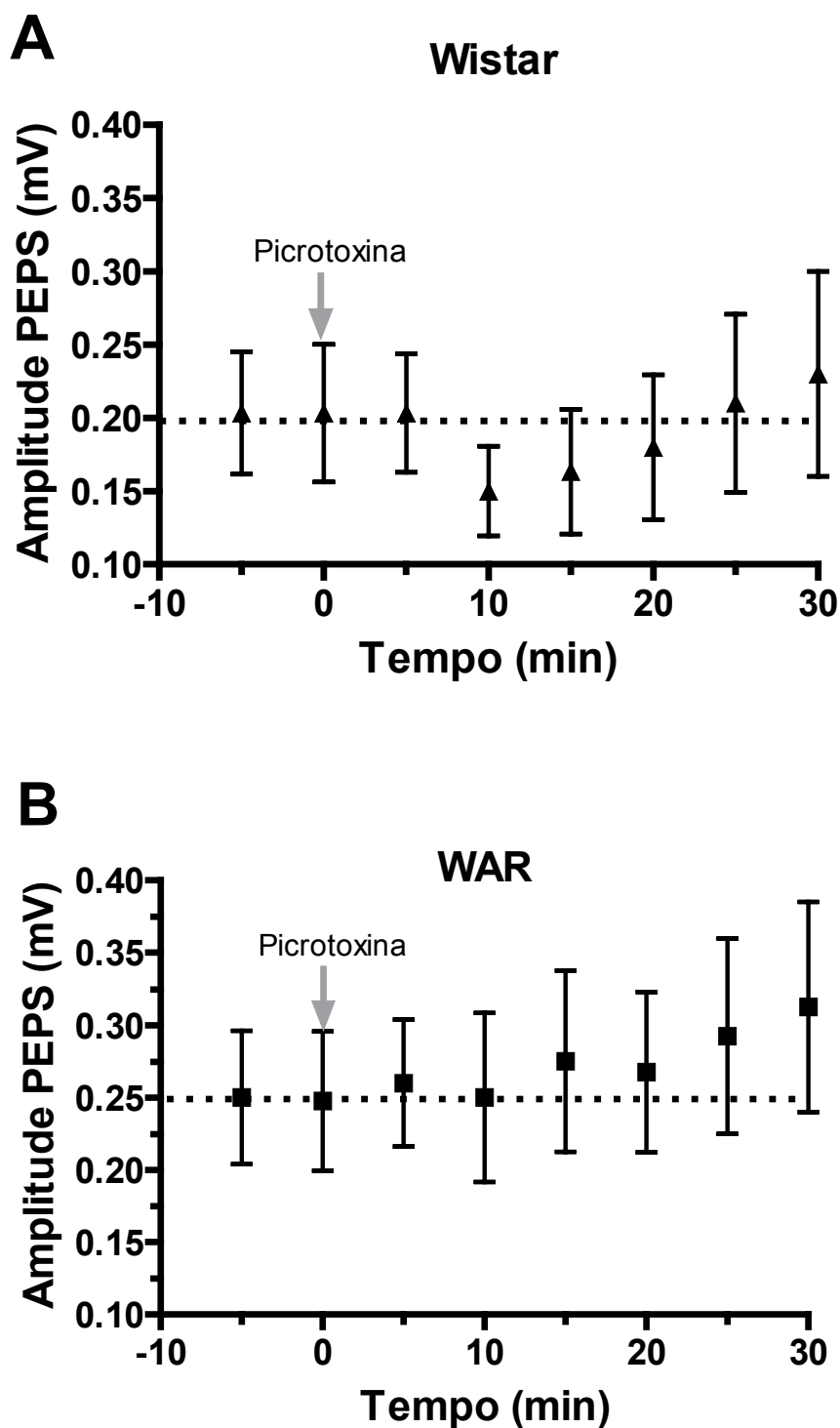
Figura 19: Esquema do protocolo experimental 4.2.

#### 4.2.4. Resultados

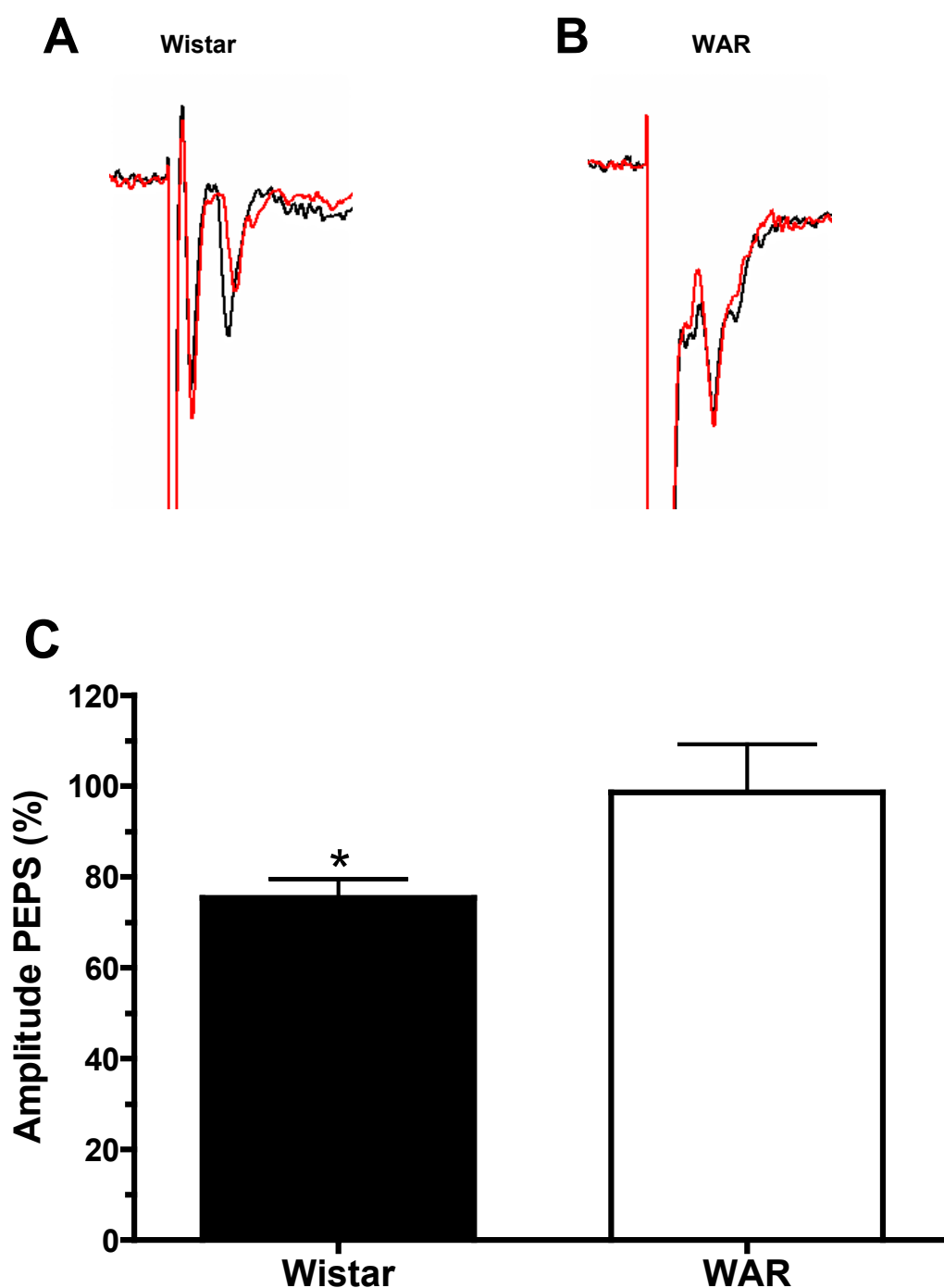
Quando picrotoxina foi aplicada ao banho, observamos no grupo Wistar resistente uma diminuição na amplitude do PEPS em 10 minutos, seguida por uma recuperação das respostas ao nível basal e até uma ultrapassagem destes valores (Fig 20A). Entretanto, no grupo de WAR, não observamos esta diminuição, porém houve discreto aumento da resposta quando comparada ao nível basal (Fig. 20B).

Para compararmos os PEPS basais entre os dois grupos, utilizamos os dados brutos. A média das amplitudes basais de wistar foi de  $0,20 \pm 0,04$  mV (Fig. 20A) e para WAR foi de  $0,24 \pm 0,04$  mV (Fig. 20B)  $p > 0,05$ . Comparamos também a média basal dos WAR com a média dos wistar 30 min após adição da picrotoxina  $0,23 \pm 0,07$  mV  $p > 0,05$ . (Teste *t* de Student).

Para reduzir a variabilidade que existe entre as fatias, normalizamos os valores das amplitudes do PEPS, considerando 100% o ponto imediatamente anterior ao tratamento com picrotoxina. Com esta análise, calculamos que a amplitude dos PEPS após 10 minutos de tratamento (efeito máximo da droga) foi de  $75 \pm 4\%$  no grupo Wistar resistente ( $*p < 0,02$ ) e de  $98 \pm 10\%$  no grupo de WAR,  $p > 0,05$ . (Teste *t* de Student) (Fig. 21).



**Figura 20. Efeito da picrotoxina em amígdala.** Os valores representam os dados brutos das amplitudes dos PEPS. Os pontos representam as médias das amplitudes dos PEPS a cada 5min (média  $\pm$  e.p.m.). As respostas basais foram registradas por 20 min, no momento 0 foi adicionada picrotoxina e registradas as respostas por mais 30 min **(A)** Observamos diminuição na amplitude dos PEPS 10min após aplicação da picrotoxina nos animais wistar resistentes porém não foi observado este efeito para os WAR **(B)**  $p > 0,05$ . A média basal para wistar foi de  $0,20 \pm 0,04$ mV e para WAR foi de  $0,24 \pm 0,04$ mV  $p > 0,05$ . Comparamos também a média basal dos WAR com a média dos wistar 10 min após adição da picrotoxina  $0,23 \pm 0,07$ mV  $p > 0,05$  (Teste t de Student).



**Figura 21: Efeito máximo da picrotoxina em amígdala.** (A) e (B) representam os registros eletrofisiológico antes (em preto) e no efeito máximo da picrotoxina (em vermelho) (10min) para wistar e WAR respectivamente. Em (C) as barras representam as médias normalizadas das amplitudes dos PEPS 30min após a adição de picrotoxina na amígdala. Nos wistar houve diminuição significativa das amplitudes dos PEPS em resposta à picrotoxina, média após 10min da aplicação da droga  $75 \pm 4\%$   $*p=0,02$ , enquanto que para os WAR o mesmo não ocorreu, média  $98 \pm 10\%$   $p>0,05$ . Para os 10min entre WAR e Wistar  $p>0,05$  (Teste t de Student).

## 4.3 INDUÇÃO DE LTP NA AMIGDALA LATERAL DE WAR

### 4.3.1. Considerações Iniciais

Os WAR são um modelo animal de epilepsia genética no qual crises são induzidas por estímulos sonoros de alta intensidade (Doretto e cols, 2003). Quando estimulados agudamente apresentam crises de tronco encefálico (Browning, 1994; Garcia-Cairasco, 1995) porém, quando estimulados cronicamente há o recrutamento de estruturas prosencefálicas, incluindo a amígdala (Marescaux e cols, 1987; Garcia-Cairasco e cols, 1996; Hirsch e cols, 1997; Moraes e cols, 2000).

Estudos sugerem que um dos mecanismos envolvidos no recrutamento desta estrutura é a potenciação de longo prazo (LTP) (McNamara, 1980; Feng e Faingold, 2002; Costa, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de indução de LTP, através dos registros dos Potenciais Excitatórios Pós Sinápticos (PEPS), em amígdala lateral, de WAR.

Hipótese: haverá maior facilidade de indução de LTP em amígdala de WAR.

### 4.3.2 Animais

Foram utilizados 4 ratos Wistar machos (n= 5 fatias) resistentes com idade média de 20 semanas e 6 ratos machos (n= 7 fatias) da colônia WAR com idade média de 27 semanas.

### 4.3.3 Protocolo Experimental

A curva corrente versus resposta e o estímulo basal foram os mesmos descritos no protocolo 4.2. O estímulo indutor de LTP foi: 4 estímulos de 1s a 100Hz aplicados quatro vezes, separados por um intervalo de 20s (Dalbem e cols., 2005).

Iniciou-se o registro do PEPS perfundindo aCSF normal por 20 minutos. Verificada a estabilização do sinal aplicava-se o estímulo de alta frequência (HFS) e registrava-se por mais 60 min. O aCSF livre de cálcio foi aplicado ao final do experimento para certificar que o sinal registrado era um PEPS Fig. 22.

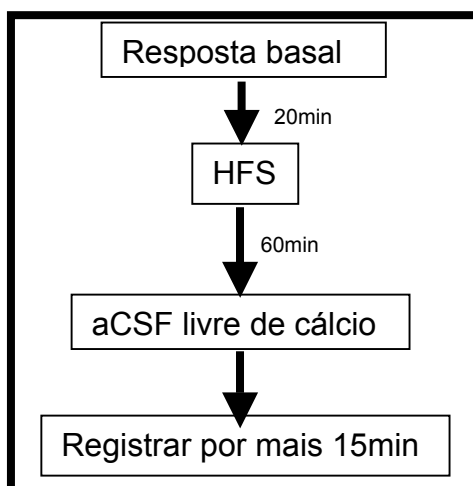


Fig.22: Esquema do protocolo experimental 4.3

#### 4.3.4. Resultados

Em ratos Wistar resistente (Fig. 23A e 24A) houve aumento significativo nas amplitudes do PEPS iniciando-se 25min após a aplicação do HFS e atingindo seu pico de aumento em 45min (média  $148 \pm 10\%$ )  $*p < 0,05$ . Os WAR (Fig. 23B e 24B) apresentaram uma resposta pouco estável. Obtivemos 3 pontos de aumento significativo, 5min, 45min e 60min; a média nos 45min foi de  $125 \pm 4\%$   $*p < 0,05$ . Comparando as médias de maior aumento nos dois grupos (45min)  $p > 0,05$  (Teste t de Student).

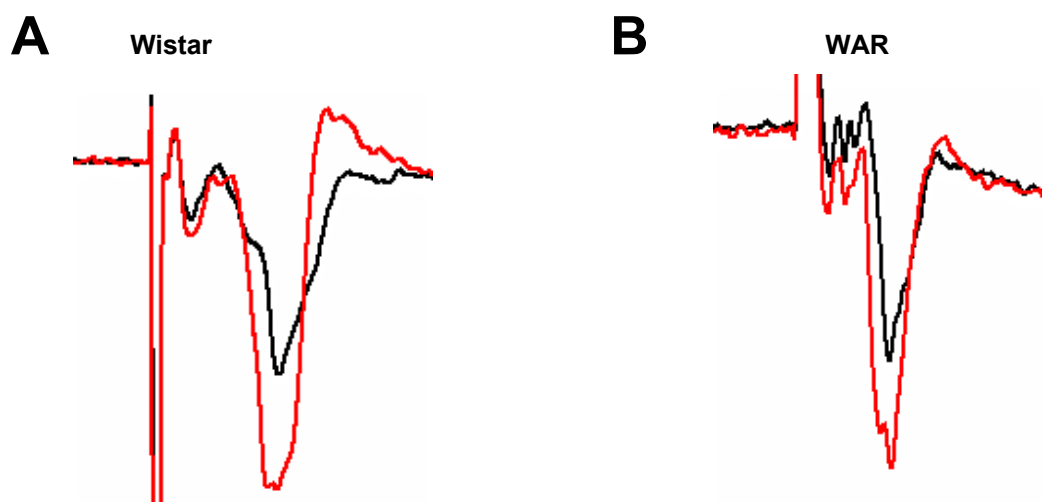
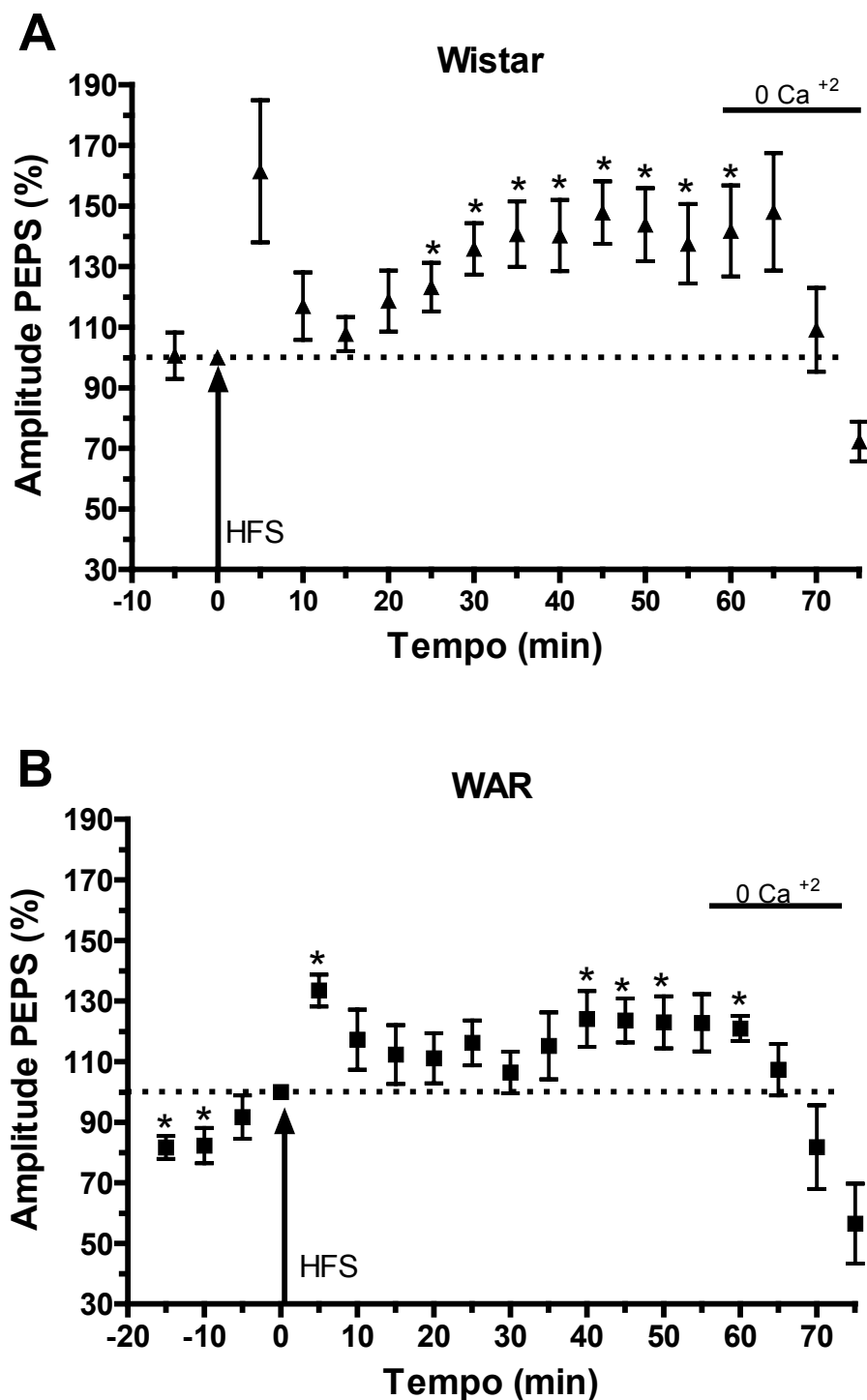


Figura 23. Registro eletrofisiológico na amígdala lateral antes (em preto) e 45min após o HFS (em vermelho). Wistar (A) e WAR (B).



**Figura 24. LTP na amígdala lateral.** Os pontos representam as médias normalizadas das amplitudes dos PEPS a cada 5min (média  $\pm$  e.p.m.). Após 20min um estímulo de alta frequência (HFS) foi aplicado. **(A)** Wistar apresentou aumento significativo das médias das amplitudes iniciando-se em 25min após HFS  $*p < 0,05$ . **(B)** Os WAR apresentaram aumento da resposta somente após 40min  $*p < 0,05$  (Teste t de *Student*). Após 60min aCSF livre de cálcio foi adicionado à perfusão para se certificar que a resposta registrada era pós sináptica.

## 4.4. EFEITO DA PICROTOXINA SOBRE A INDUÇÃO DE LTP NA AMIGDALA LATERAL DE WISTAR E WAR

### 4.4.1. Considerações Iniciais

No protocolo 4.2, fig.20A observamos que em ratos wistar resistentes, a diminuição da amplitude dos PEPS é acompanhada por uma recuperação da resposta a seus níveis basais. Este fenômeno é muito semelhante ao aumento dos PEPS que ocorre na indução do LTP. Considerando que os mecanismos envolvidos nesta recuperação sejam os mesmos envolvidos na geração de LTP, espera-se que na amígdala pré-tratada com picrotoxina haja maior dificuldade na indução do LTP, visto que estes mecanismos podem estar saturados.

O objetivo deste protocolo é observar como se comportam os ratos wistar resistentes e os WAR quando induzimos LTP em amígdala pré-tratada com picrotoxina.

Hipótese:

Há dificuldade de indução de LTP em amígdala pré-tratada com picrotoxina.

A amígdala dos animais wistar resistentes sobre o efeito de picrotoxina se comporta de forma semelhante aos WAR sem o efeito da picrotoxina, quando induzimos LTP.

### 4.4.2. Animais

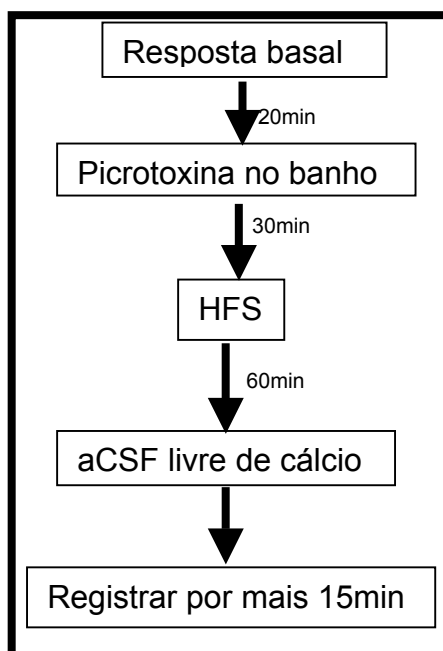
Foram utilizados 3 ratos Wistar machos (n= 3 fatias) resistentes com idade média de 15 semanas e 4 ratos machos (n= 4 fatias) da colônia WAR com idade média de 18 semanas.

### 4.4.3. Protocolo Experimental

A curva corrente versus resposta, os parâmetros do estímulo basal e o estímulo para a indução de LTP foram os mesmos descritos no protocolo 3.

Iniciou-se o registro do PEPS perfundindo aCSF normal por 20 minutos. Verificada a estabilização do sinal aplicava-se a picrotoxina e após 30min aplicava-se o estímulo de alta frequência (HFS) e registrava-se por mais 60 min. O aCSF livre de cálcio foi aplicado ao final do experimento para certificar que o sinal registrado era um PEPS.

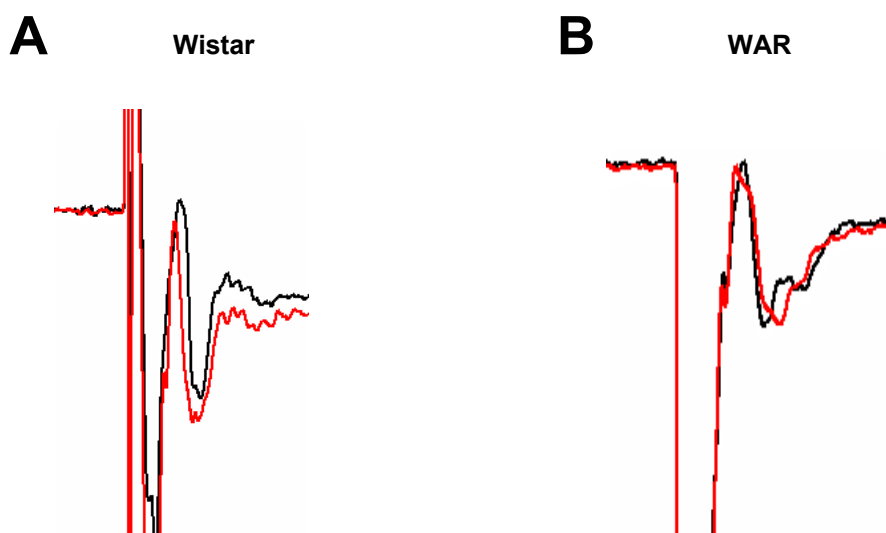




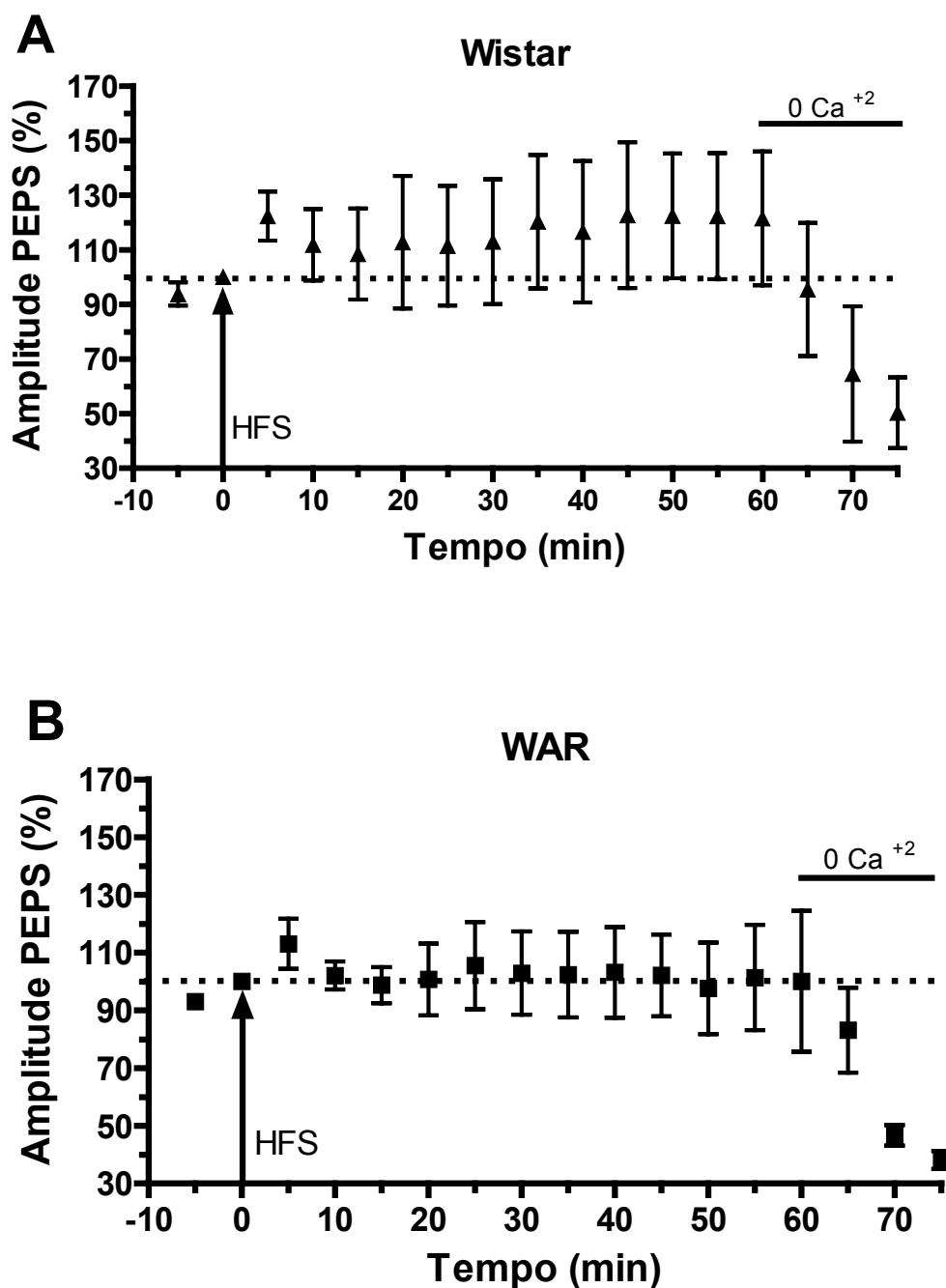
**Figura 25: Esquema do protocolo experimental 4.4**

#### 4.4.4. Resultados

Não houve aumento significativo nas amplitudes dos PEPS em nenhum dos pontos após o HFS na presença de picrotoxina. Nos Wistar (Fig 26A e 27A) a maior média foi 45min após HFS  $122\pm 26\%$   $p>0,05$ . Nos WAR (Fig 26B e 27B) a maior média foi 45min após HFS  $102\pm 14\%$   $p>0,05$ . Comparamos também os 45min wistar versus WAR  $p>0,05$ . (teste t de Student).



**Figura 26. Registro eletrofisiológico na amígdala lateral, na presença de picrotoxina, antes (em preto) e após 45min do HFS (em vermelho). Wistar (A) e WAR (B).**



**Figura 27: Indução de LTP na amígdala lateral em presença de picrotoxina.**

Os pontos representam as médias normalizadas das amplitudes dos PEPS a cada 5min (media  $\pm$  e.p.m). As respostas foram registradas na presença de picrotoxina, após 30min de resposta basal estável um estímulo de alta frequência (HFS) foi aplicado. Não foi observado nenhum ponto de aumento significativo das médias após o HFS. **(A)** Wistar e **(B)** WAR  $p > 0,05$  (Teste t de Student). Após 60min aCSF livre de cálcio foi adicionado à perfusão para se certificar que a resposta registrada era pós sináptica.

## 5. DISCUSSÃO

A função inibitória do GABA em hipocampo é conhecida a bastante tempo (Curtis e cols., 1970). Portanto quando inibimos a função GABA<sub>A</sub> nos animais controle observamos um aumento, seguido por estabilização dos PEPS. Um déficit no tônus GABA<sub>A</sub>, ou seja, um déficit no sistema de inibição em hipocampo de WAR, representado por uma baixa responsividade ao bloqueador dos receptores GABA<sub>A</sub>, pode explicar, pelo menos em parte, a hiperexcitabilidade decorrente de um desequilíbrio entre excitação/inibição associada aos circuitos neurais destes animais.

Nossos resultados corroboram outros realizados com o mesmo modelo animal. Ribeiro dos Santos (2001) em investigação neuroquímica em hipocampus de WAR, observou que a liberação de GABA, evocada pelo KCl em sinaptossomas, estava reduzida quando comparada com o grupo controle (Ribeiro dos Santos, 2001). Utilizando-se a técnica eletrofisiológica de Whole-cell, foi demonstrado uma redução em 55% na corrente GABAérgica inibitória em hipocampo de WAR quando comparada com Wistar resistentes (Mesquita e cols, 2005).

Podemos sugerir que esta menor responsividade para GABA em hipocampo de WAR, e a conseqüente redução na inibição GABAérgica pode ser explicada por: modificação endógena nos receptores pós sinápticos GABA<sub>A</sub>, por uma redução de densidade de subunidades específica deste receptor, pela menor produção de neurotransmissor GABA ou deficiência em algum transportador deste neurotransmissor.

Estudos anatômicos demonstram a existência de vários núcleos e uma conectividade complexa dentro da amígdala (Doron e LeDoux, 1999 e Savander e cols., 1995).

Não há na literatura estudos eletrofisiológicos sobre a via tálamo-amígdala em modelos experimentais de epilepsia. Existem vários estudos sobre o núcleo Basolateral em modelo de epilepsia de lobo temporal (Gean e cols., 1989; Rainnie e cols., 1992, Smith e Dudek, 1997). Entretanto Pitkanen e colaboradores (1998) citam a divisão dorsolateral do núcleo lateral como a responsável por receber as informações auditivas do tálamo (Pitkanen e cols,

1998). Visto que este é o percurso do estímulo sonoro e os animais em estudo são audiogênicos, então os registros foram feitos nesta região.

Woodruff e colaboradores (2006), em estudo eletrofisiológico em fatias, observaram o bloqueio do Potencial Inibitório e do Potencial Excitatório Pós-Sináptico na amígdala basolateral quando aplicada bicuculina, sugerindo haver um interneurônio GABAérgico com função modulatória sobre a via excitatória nesta região (Woodruff e cols. 2006).

Especulando-se que o sistema GABAérgico em amígdala lateral funcione da mesma forma descrita acima, podemos então explicar nossos resultados da seguinte forma: Quando aplicamos picrotoxina ao banho diminuímos a modulação GABAérgica sobre a via excitatória, então a resposta final diminuirá. Este foi o resultado encontrado nos animais wistar 10 min após a aplicação da droga. Os WAR porém não apresentaram este padrão, sendo sua média 10 min após a aplicação da picrotoxina indistinguível da sua resposta basal. Entretanto, para um sistema considerado previamente hiperexcitado era de se esperar que a modulação excitatória estivesse aumentada. Sugerimos que a baixa responsividade ao bloqueador dos receptores GABA<sub>A</sub> na amígdala lateral pode ser decorrente de uma alteração compensatória do sistema excitatório glutamatérgico exacerbado nestes animais, tentando conter a hiperexcitabilidade deste circuito.

Analisamos também os dados brutos, comparando as médias basais de wistar (0,42mV/ms) e WAR (0,57mV/ms) em hipocampo e wistar (0,20mV) e WAR (0,24mV) em amígdala. Apesar de não obtermos diferença estatística nestas comparações os resultados sinalizam um aumento das médias basais de WAR, justificando um circuito mais hiperexcitável e mais predisposto à geração de crises epilépticas nestes substratos.

E considerando a hipótese de que os WAR se assemelham aos Wistar quando estes apresentam o sistema GABAérgico bloqueado, comparamos a média basal dos WAR (0,57mV/ms) com a média dos wistar após aplicação da picrotoxina (0,67mV/ms) em hipocampo, e a média basal dos WAR (0,24mV) com a média dos wistar após aplicação e adaptação à presença de picrotoxina (0,23mV) em amígdala. **Não obtivemos diferença estatística apesar de**

aparentemente serem parecidas. O aumento no número de animais nos grupos poderia nos ajudar a confirmar estas hipóteses.

Dados da literatura sugerem que nos WAR o hipocampo parece não ser uma estrutura do sistema límbico importante para a geração de epilepsia de lobo temporal (Galvis-Alosa e cols., 2004) e que a amígdala faz parte dos substratos neurais envolvidos nesta crise límbica de animais audiogênicos (Feng e Faingold, 2002; Galvis-Alosa e cols., 2004). Embora não existam evidências sobre o envolvimento do hipocampo em crises audiogênicas agudas e crônicas, nossos resultados sugerem uma alteração no equilíbrio entre excitação/ inibição, que acomete de forma generalizada os circuitos neurais de WAR, visto que houve alteração do sistema GABAérgico tanto em hipocampo, quanto em amígdala.

Uma vez que existem indícios do aumento das respostas basais nos circuitos neurais de WAR, e considerando que há um limite fisiológico para o aumento desta resposta, a indução de LTP seria muito mais eficiente em ratos wistar resistentes do que em WAR, visto que esses já estariam perto dos níveis de saturação. Os nossos resultados corroboram esta hipótese, pois obtivemos potenciação na via tálamo-amígdala de wistar resistentes, entretanto nos WAR a indução foi instável, não mantendo o aumento da resposta.

Observamos também que em presença de picrotoxina na amígdala, o efeito inibitório na amplitude dos PEPS é seguido por uma recuperação, sugerindo haver mecanismos fisiológicos que aumentam os PEPS tentando recuperar o desequilíbrio causado por esta droga. Este aumento da resposta é muito semelhante ao que ocorre com a geração do fenômeno de LTP, em Sprague Dawley, induzido artificialmente por estímulo elétrico na via tálamo-amígdala (Weisskopf e cols, 1999).

Então, se os mecanismos geradores de LTP forem os mesmos utilizados para a recuperação do insulto causado pelo bloqueio da neurotransmissão GABA, ao tentarmos induzir LTP em um circuito pré-tratado com esta droga não observaremos aumento significativo das suas respostas, pois estes mecanismos provavelmente estarão saturados. Neste protocolo não obtivemos LTP em ratos wistar resistentes pré-tratados com picrotoxina, e dificultamos

ainda mais a obtenção de aumento da resposta em WAR, corroborando esta hipótese.

Outra comparação interessante é que os wistar tratados com picrotoxina se comportam como os WAR sem este tratamento. A média de aumento da resposta após o HFS dos wistar tratados com picrotoxina foi de 22% e dos WAR, sem este tratamento, foi de 24%, sugerindo que a diferença de comportamento entre os dois grupos é decorrente de alterações do sistema GABA<sub>A</sub>. Entretanto, Hirsch e colaboradores indicaram o papel crítico da amígdala na propagação da crise audiogênica do tronco encefálico para o prosencéfalo (Hirsch e cols, 1997) sugerindo que a amígdala apresenta um menor limiar para a indução de transformações plásticas. Consideramos uma hipótese para explicar este achado: se possivelmente há uma resposta basal já elevada nos WAR, qualquer aumento pode ser suficiente para evidenciar alterações funcionais nestes substratos.

Embora os dados analisados mostrem alteração do sistema GABAérgico, não há informações suficientes para afirmar que as alterações detectadas sejam a causa da susceptibilidade audiogênica dos WAR. Mas pode-se supor que essas alterações tenham contribuído ou sejam conseqüências da excitabilidade aumentada dos WAR.

Um estudo mais abrangente sobre a causa da susceptibilidade audiogênica dos WAR e da hiperexcitabilidade neural de seus substratos incluiria a investigação da função de outros receptores GABA, do sistema Glutamatérgico e também de outros substratos neurais.

## 6. CONCLUSÕES

- Os animais WAR apresentam diminuição do tônus GABAérgico em hipocampo e amígdala.
- Os WAR são menos susceptíveis à indução de LTP na amígdala lateral;
- A indução de LTP em amígdala lateral de WAR e Wistar depende dos receptores GABAérgicos do tipo A.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham W (2003) How long will long-term potentiation last? **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** 358: 735-744.
- Aicard J (1980). Course and prognosis of certain childhood epilepsies with predominantly myoclonic seizures. WADA, JA., PENRY, J.K. e cols Advances in epileptology. **The X<sup>th</sup> Epilepsy International Symposium**. New York; Raven, p. 159-63.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**. 31(3):571-91.
- Avoli M and Goor P (1982) Interaction of cortex and thalamus in spike and wave discharges of feline generalized penicillin epilepsy. **Exp Neurol**. 76(1):196-217.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. **Learning & Memory** 8: 229-242.
- Brandt C, Ebert U, Löscher W (2004) Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. **Epilepsy Research** 62: 135–156.
- Browning R (1994). Anatomy of generalized convulsive seizures. In Idiopathic generalized epilepsies; Clinical, experimental and genetic aspects. A. Malafosse, P et al (Eds.), John Libbey & Company Ltd p 366-413.
- Collingridge G (1995) The brain preparation: a tribute to the pioneer Henry McIlwain. **Journal of Neuroscience Methods** 59 5-9.
- Costa C. M. B. **Potenciação da resposta evocada auditiva no complexo amigdalóide durante o abrasamento audiogênico em modelo animal de epilepsia**. 2003. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Ref Type: Dissertation
- Curtis DR, Felix D, McLellan (1970) GABA and hippocampal inhibition GABA and hippocampal inhibition. **British Journal of Pharmacology**; 40(4):881-3.
- Dailey J, Reigel C, Mishra P, Jobe PC (1989). Neurobiology of seizures predisposition in genetically epilepsy-prone rats. **Epilepsy Res**. 3: 3-17.



- Dalbem A, Silveira CV, Pedroso MF, Breda RV, Baes CV, Bartmann AP, Costa da Costa J (2005) Altered distribution of striatal activity-dependent synaptic plasticity in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. **Brain Res.** 1047(2):148-58.
- Doretto MC and Garcia-Cairasco N (1995) Differential audiogenic seizure sensitization by selective unilateral substantia nigra lesions in resistant Wistar rats. **Physiol Behav.** 58(2):273-82.
- Doretto MC, Fonsceca CG, Lôbo RB, Terra VC, Oliveira JAC and Garcia-Cairasco N (2003). Quantitative study of the response to genetic selection of the wistar audiogenic rats strain (WAR). **Behavior Genetics** 33: 33-42.
- Doron NN, LeDoux JE (1999) Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. **J Comp Neurol.**412(3):383-409. Erratum in: *J Comp Neurol* 2000 Feb 14;417(3): 385-6.
- Feng HJ, Faingold CL (2002a) Repeated generalized audiogenic seizures induce plastic changes on acoustically evoked neuronal firing in the amygdala. **Brain Research** 932: 61-69.
- Feng HJ, Faingold CL (2002b) Synaptic plasticity in the pathway from the medial geniculate body to the lateral amygdala is induced by seizure repetition. **Brain Research** 946: 198-205.
- Fisher R, Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J (2005) Epileptic Seizures and Epilepsy: definition proposed by the international league against epilepsy (ILAE) and the international bureau for epilepsy (IBE). **Epilepsia** 46(4) 470-472.
- Galvis-Alonso OY, Cortes de Oliveira JA, Garcia-Cairasco N (2004) Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). **Neuroscience.**125(3):787-802
- Garcia-Cairasco N, Sabbatini R (1983) Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. **Braz J Med Biol Res.** 16(2):171-83.
- Garcia-Cairasco N, Sabbatini R (1991) Possible Interaction Between the Inferior Colliculus and the Substantia Nigra in Audiogenic Seizures in Wistar Rats. **Physiology & Behavior** 50: 421-427.
- Garcia-Cairasco N, Terra VC, Doretto MC (1993) Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behavioural Brain Research** 58: 57-67.
- Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JAC, Gomes ELT, Del Bel EA, Mello LEAM (1996) Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic

kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research** 26: 177-192.

Gean PW, Shinnick-Gallagher P, Anderson AC (1989) Spontaneous epileptiform activity and alteration of GABA- and of NMDA-mediated neurotransmission in amygdala neurons kindled in vivo. **Brain Res.** 494(1):177-81.

Goddard G (1967) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature** 214: 1020-1021.

Goddard G, McIntyre D and Leech C (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Experimental Neurology** 25: 295-330.

Hisch E, Maton B, Vergnes M, Depaulis A, Marecaux C (1992) Positive transfer of audiogenic kindling to electrical hippocampal kindling in rat. **Epilepsy** 11: 159-166.

Hisch E, Maton B, Nehlig A, Vergnes M, Depaulis A, Marecaux C (1993) Reciprocal positive transfer between kindling of audiogenic seizures and electrical kindling of inferior colliculus. **Epilepsy Research** 15: 133-139.

Hisch E, Danober L, Smler S, Vasconcelos A, Maton B, Nehlig A, Marecaux C, Vergnes M (1997) The amygdala is critical for seizure propagation from brainstem to forebrain. **Neuroscience** 77: 975-984.

International League Against Epilepsy (2003) Epidemiology. **Epilepsia** 44(6): 17-18

Jobe PC, Brown RD, Dailey JW(1981) Effect of Ro 4-1284 on audiogenic seizure susceptibility and intensity in epilepsy-prone rats. **Life Sci.** 28(18):2031-8.

Kiesmann M, Marescaux C, Vergnes M, Micheletti G, Depaulis A (1988) Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological and electroencephalographic studies. **J. Neural Transm.**, 72: 235-244.

Killan K.F., Killan E.F., Naquet, R.J. (1966). Mise in evidence chez certains singes d'une syndrome photomyochlonique. **C. R. Acad. Sci**, v. 262, p. 1010-1012.

Krushinsky I, Molodkina I, Fless D, Dobrokhotova I, Steshenko A, Semiokhina A, Zorina Z, Romanova I (1970) The functional state of the brain during sonic stimulation. In: *Physiological effects of noise*. Eds Welch, B. e Welch, A. New York; Plenum Press: 151

- Lamont E, Robinson B, Stewart J, Amir S (2005) The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. **Proc Natl Acad Sci USA** 102(11): 4180-4184.
- LeDoux J, Farb C, Ruggiero D (1990). Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **The Journal of Neuroscience** 10(4): 1043-1054.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA<sub>A</sub> and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. **Neuron** 18, 243-255.
- Löscher W, Schmidt D (1988) Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res.** 2(3):145-81.
- Löscher, W., Fassbender, C.P., Nolting, B. (1991) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models. **Epilepsy Res.** 8: 79-94.
- Löscher W (1997). Animal models of intractable epilepsy. **Progress in Neurobiology** 53: 239-258.
- Lomo T (2003) The discovery of long term potentiation. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** 358: 617-620.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long term potentiation \_ A decade of progress? **Science** 285: 1870-1874.
- Mares P, Zouhar A (1988) Experimental models of epileptic seizures. **Cesk Neurol Neurochir.** 51(6):353-6.
- Marescaux C, Micheletti G, Vergnes M, Depaulis A, Rumbach I, Warter J (1984) A model of chronic spontaneous petit mal-like seizures in the rat: comparison with pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsia** 25: 326-331.
- Marescaux C, Vergnes M, Kiesmann M, Depaulis A, Micheletti G, Warter J (1987) Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. **Exp Neurol.** 97(1):160-8.
- McCormick D, Contreras D (2001) On the cellular and network bases of epileptic seizures. **Annu. Rev. physiol.** 63: 815-846.
- McNamara J, Byrne M, Dasheiff R, Fitz G (1980) The kindling model of epilepsy a review. **Progress in Neurobiology** 15: 139-159.

- McNamara J (1994) 15: 139-159. Cellular and molecular basis of epilepsy. **The journal of neuroscience** 14(6): 3413-3425.
- Mesquita F, Aguiar JF, Oliveira JA, Garcia-Cairasco N, Varanda W (2005) Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic Rats. **Brain Res Bull.** 15;65(2):177-83.
- Moraes MF, Galvis -Alonso OY, Garcia-Cairasco N (2000) Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research** 39: 251-259.
- Morimoto K, Fahnstock M, Racine R (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Progress in Neurobiology** 73: 1–60
- Nicholls DG (1994) *Proteins, Transmitters and Synapses*. **Blackwell Science Ltd**; Oxford.
- Nicoll R (2003). Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. **The Royal Society** 358:721-726.
- Ogawa W. N. **Transmissão sináptica modulada pela neurotensina em células do núcleo do trato solitário**. 2002. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ref Type: Thesis.
- Paré D, Collins D, Pelletier J (2002) Amygdala Oscillations and the consolidation of emotional memories. **Trends in cognitive sciences** 6: 306-314.
- Paxinos G, Watson C **The rat Brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, San Diego. 1997. Ref Type: Serial (Book)
- Pinel, J. (1981) .Spontaneous Kindled Motor Seizures in Rats. New York: Wada.
- Pitkanen A, Tuunanen J, Kalviainen R, Partanen K, Salmenpera (1998). Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research** 32: 233-253.
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol.** 32(3):269-79.
- Ribeiro dos Santos R (2001) **Investigação neuroquímica em hipocampus de ratos com epilepsia audiogênica**. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Ref Type: Dissertation.
- Rainnie DG, Asprodini EK, Shinnick-Gallagher P. (1992) Kindling-induced long-lasting changes in synaptic transmission in the basolateral amygdala. **J Neurophysiol.** 67(2):443-54.

- Savander V, Go CG, LeDoux JE, Pitkanen A (1995) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the basal nucleus. **J Comp Neurol.** 361(2):345-68.
- Scarlattelli-Lima A, Magalhães L, Doretto M and Moraes M (2003). Assessment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to eletroshock, pentyleneferazole and pilocarpine. **Brain Research** 960: 184-189.
- Selig DK, Malenka RC (1997) Extracellular field potential recording in brain slices. **AxoBits** 20:7-10.
- Smith BN, Dudek FE (1997) Enhanced population responses in the basolateral amygdala of kainate-treated, epileptic rats in vitro. **Neurosci Lett.** 222(1):1-4.
- Sperber EF, Wong BY, Wurpel JN, Moshe SL ( 1987) Nigra infusions fo muscinol or bicuculine facilitate seizure in developing rats. **Brain Res;** 465:243-50.
- Suter K, Smith B , Dudek F (1999) Eletrophysiological recording from brain slices. **Methods: a companion to methods in enzymology.** 18: 86-90.
- Sutula T (2004) Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. **Epilepsy Research** 60: 161-171.
- Taschenberger H, Gersdorff H (2000) Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. **The Journal of Neuroscience** 20: 9162-9173.
- Teyler T (1999). Use of brain slices to study long-term potentiation and depression as examples of synaptic plasticity. **Methods: A companion to methods in enzymology** 18: 109-116.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Coimbra C, DA Penha BM, Ikonomidou-Turski C, Turski L (1987). Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain Res** v. 434, p. 281-305.
- Ure JA, Perassolo M, (2000) Update on the pathophysiology of the epilepsies. **Journal of Neurological Sciences** 177, p.1-17;.

- Velisk L, Kubova H, Pohl M, Stankova L, Mares P, Schickerova R (1992). Pentylenetetrazol-induced seizures in rats : na ontogenetic study. **Naunyn Schniedebergs Arc. Pharmacol** (346): 588-591
- Vergnes M, Kiesmann M, Marescaux C, Depaulis A, Micheletti G, Warter (1987) Kindling of audiogenic seizures in the rat. **Int J Neurosci.** 36(3-4):167-76.
- Vergnes M, Marescaux C, Lannes B, Depaulis A, Micheletti G, Warter (1989) Interhemispheric desynchronization of spontaneous spike-wave discharges by corpus callosum transection in rats with petit mal-like epilepsy. **Epilepsy Res.** 4(1):8-13.
- Weisskopf MG, Bauer EP, LeDoux JE (1999) L-type voltage-gated calcium channels mediate NMDA-independent associative long-term potentiation at thalamic input synapses to the amygdala. **The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience** 19:10512-10519.
- Weisskopf M, LeDoux JE (1999) Distinct populations of NMDA receptors at subcortical and cortical inputs to principal cells of the lateral amygdala. **The American Physiological Society** 930-934.
- Woodruff A, Monyer H, Sah P (2006) GABAergic excitation in the basolateral amygdala. **J Neurosci.** 26(46):11881-7.
- Xiao J and Wang SR (1998) A new slicing method for the lower vertebrate brain: Brain mould and adjustable stage. **Journal of Neuroscience Methods** 13–17
- Yaniv D, Desmedt A, Jaffard R, Richter-Levina G (2004) The amygdala and appraisal processes: stimulus and response complexity as an organizing factor. **Brain Research Reviews** 44: 179-186.
- Zhou Z, Poon CS (2000) Field potential analysis of synaptic transmission in spiking neurons in a sparse and irregular neuronal structure in vitro. **Journal of Neuroscience Methods** 94:193-2003.