
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS



**Padrões De Descarga Neuronal Na Região De CA1
Do Hipocampo De Pacientes Com Epilepsia Do
Lobo Temporal E De Ratos Com Epilepsia Induzida
Pela Pilocarpina: Um Estudo Comparativo**

ANDREA LUISA ALENCAR TAVARES

Orientador: **Prof. Dr. JADERSON COSTA DA COSTA**

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências
– Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Requisito para a obtenção do
Título de Doutor em Neurociências.

Porto Alegre, agosto de 2006.

"...Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só fazer outras maiores perguntas..."

João Guimarães Rosa.

"...Conforme adquirimos mais conhecimento, as coisas não se tornam mais compreensíveis e sim mais misteriosas..."

Albert Schweitzer.

Agradecimentos Especiais

Ao meu Orientador **DR. JADERSON COSTA DA COSTA** por acreditar no meu potencial, pela orientação e incentivo tanto no mestrado quanto no doutorado. Pelo seu exemplo profissional e pela paixão a ciência básica contagiando a todos que o cercam

Aos Neurocirurgiões: **DR. NEY AZAMBUJA, DR. ELISEU PAGLIOLI NETO** e **AO PROGRAMA DE CIRURGIA DA EPILEPSIA-HSL/PUCRS** , pois sem eles seria impossível a realização da parte experimental que envolvia o Tecido Humano. Em especial ao colega e amigo **DR NEY AZAMBUJA** pela luta em associar a pesquisa clínica e básica, mas principalmente pelo apoio nos momentos críticos

*Ao professor **JULIO VELLUTI** pelos ensinamentos do universo do registro intracelular*

*Ao prof Dr **MARTIN P. CAMMAROTA** e **PROF. DR. IVAN IZQUIERDO** pelo incentivo e revisão desta tese*

*A colega **SIMONE SALAMONI**; companheira de batalha, pela amizade, apoio e auxílio na revisão desta tese. Aos colegas **RICARDO BREDA, ZAQUER COSTA** e a **TODOS DO NEUROLAB** pela amizade, pelo apoio e por tornar possível a realização deste trabalho*

A professora **MATILDE ACHAVAL ELENA** pela ajuda no desenvolvimento da técnica de revelação da biocitina.

Aos **PACIENTES** com Epilepsia por contribuírem para este trabalho.

*Ao **PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS- UFRGS** pela oportunidade de desenvolver o mestrado e agora o doutorado.*

A CAPES pela bolsa concedida, pois sem ela seria impossível a realização deste doutorado

Agradecimentos Pessoais

A **DEUS** por todas as oportunidades e por me dar tudo o que tenho

Ao meu filho **GABRIEL** por ser a luz da minha vida, pelo sorriso, carinho e compreensão pela minha ausência nos momentos críticos que antecederam a elaboração da tese

Ao meu marido **ADRIANO LUIS**, pelo seu amor, companheirismo, amizade, carinho, apoio e muita paciência.

Aos meus pais, **JORGE** (in memorian) e **CLEONICE** por serem os grandes guias e inspiradores de minha formação como ser humano e profissional. Devo-lhes tudo o que sou.

A minha sogra, **NANCI** por me acolher como filha e cuidar do Gabriel durante várias noites em que precisei me ausentar por causa dos experimentos e viagens.

A minha avó **NILDA** pelo exemplo de força. e coragem. A memória do meu avô postigo **ROBERTO** pelo exemplo de coragem.

ABREVIATURAS

AHP	Hiperpolarização pós-potencial (do inglês <i>after-hyperpolarization</i>) componentes : f AHP- AHP rápida (do inglês <i>fast</i>), m AHP- AHP médio (do inglês <i>medium</i>)
AMP	amplitude do 1° potencial de ação
AMPA	(α -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxasole Propionato
CA	Corno de Amon
CER	Crises Espontâneas Recorrentes
CE	Córtex Entorrinal
CPCs	Crises Parciais Complexas
DAP	Despolarização pós-potencial (do inglês <i>Depolarizing after-polarization</i>)
DUR	duração do 1° potencial de ação
ELT	Epilepsia Do Lobo Temporal
EMT	Esclerose Mesial Temporal
FAEs	Fármacos Antiepilépticos
BZP	Benzodiazepínico
CBZ	Carbamazepina
LMT	Lamotrigina
OCBZ	Oxcarbamazepina
PB	Fenobarbital
PHT	Fenitoína
VPA	Valproato sódico
FH	Formação Hipocampal
FCS	(Fibras) colaterais de Schaffer
FM	<i>Fibras musgosas</i>
GABA	<i>Ácido gama-amino-butírico</i>
GD	<i>Giro Denteado</i>
NGD	Neurônios Granulares do GD
$I_{Na,p}$	Correntes de Sódio
$I_{CaT, N, L, P}$	Correntes de Cálcio
$I_{K(KDR), A, D, M}$	Correntes de Potássio
I_H	Corrente Catiônica Mista
$I_{c, AHP}$	Corrente Iônica Ativada Pelo Cálcio Intracelular
ICAP	Corrente injetada para o 1° potencial de ação (do inglês <i>intracellular "current needed to elicit the first action potential"</i>).
IR	Resistência de Entrada (do inglês <i>"input resistance"</i>)
LIM	limiar do 1° potencial de ação
nA	Nano amperes
NMDA	Receptor N-metil-d-aspartato
O/A interneurônios	<i>oriens/alveous</i> interneurônios <i>Potencial de membrana</i>
PM	
Padrões de disparo	-Potenciais de ação com intervalos curtos (<i>sigla do inglês fast spiking</i>)
FS	-Neurônios com atividade em salva (<i>sigla do inglês intrinsic bursting</i>); AIB - com acomodação e wIB - sem acomodação.
IB (AIB e wIB)	-Neurônios com atividade em salva oscilatória (<i>sigla do inglês repetitive oscillatory bursting</i>) $fROB$ - acomodação rápida; $sROB$ acomodação lenta e $wROB$ - sem acomodação.
ROB ($fROB$, $sROB$ e $wROB$)	-Potenciais de ação com intervalos regulares (<i>sigla do inglês regular spiking</i>)

RS (_F RS, _S RS e _L RS)	<p>_FRS- com acomodação rápida, _SRS- acomodação lenta e _LRS- latência para o primeiro potencial.</p> <p>Onda despolarizante ativada na despolarização</p>
SAG	<i>Status Epilepticus</i>
SE	
SG	<i>stratum granulosum</i>
SM	<i>stratum moleculare</i>
SLM	<i>stratum lacunosum-moleculare</i>
SL	<i>stratum lucidum</i>
SO	<i>stratum oriens</i>
SP	<i>stratum pyramidale</i>
SR	<i>stratum radiatum</i>
TC	<i>Constante de tempo</i> (do inglês "time constant")

Lista de Figuras

FIGURA 1. A) Camadas da área de CA1 de rato e B) diferenças no posicionamento anatômico dos hipocampos de ratos e tecido humano. (adaptado de Duvemoy, 1988).	5
FIGURA 2. A) Esquema da formação hipocampal e para-hipocampal (Stafstron, 2005). B) Sumário das conexões intrínsecas da formação hipocampal controle. (O'Mara et al, 2001)	8
FIGURA 3: Hipótese do GABA excitatório (adaptado de Kohling, 2002).	13
FIGURA 4: Diferenças entre RS e FS.(Connors e Gutnick, 1990).	23
FIGURA 5. Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina .e do Grupo Controle:	33
	36
FIGURA 7. Obtenção das fatias hipocampais de ratos	37
FIGURA 8 - Hipocampo Esquerdo antes (a) e depois (b) da ressecção cirúrgica	39
FIGURA 9- Seqüência de procedimentos da obtenção das fatias até a identificação da área de CA1.	41
FIGURA 10- Equipamento de registro intracelular.	44
FIGURA 11: Parâmetros eletrofisiológicos medidos:	46
FIGURA 12. Registros Eléctrofisiológico dos três padrões básicos de disparo encontrados em CA1 de ratos controles	57
FIGURA 13. Exemplo de um neurônio com padrão RS de CA1 rato controle.	59
FIGURA 14: Registros eletrofisiológicos representativos das subclasses do padrão RS e suas respectivas curvas de acomodação mediante a aplicação de 0,8 nA	61
FIGURA 15 Exemplo de um neurônio típico padrão IB de CA1 rato controle.	63
FIGURA 16. Neurônio ROB de CA1 rato controle. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina	65
FIGURA 17. Registros eletrofisiológicos dos subtipos do padrão ROB e comportamento de acomodação mediante a aplicação de 0,8 nA.	67
FIGURA 18. Registros dos 3 padrões básicos encontrados em CA1 de ratos tratados com pilocarpina	69
FIGURA 19. Neurônio com padrão RS de CA1 rato tratado com pilocarpina.	71
FIGURA 20: Registros eletrofisiológicos representativos das subclasses RS e suas respectivas curvas de freqüências instantâneas	73

FIGURA 21 Neurônio IB de CA1 rato tratado com pilocarpina.	75
FIGURA 22 Registros eletrofisiológicos representativos e comportamento de acomodação dos potenciais de ação das subclasses do padrão IB mediante a aplicação de 0,8 nA.	77
FIGURA 23. Neurônio ROB de CA1 rato tratado com pilocarpina. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina.	78
FIGURA 24. Registros eletrofisiológicos representativos e comportamento de acomodação dos potenciais de ação das subclasses do padrão ROB mediante a aplicação de 0,8 nA.	80
FIGURA 25. Registros Eletrofisiológicos dos 4 padrões básicos encontrados em CA1 do tecido hipocampal humano.	86
FIGURA 26 Exemplo de um neurônio RS humano.	87
FIGURA 27: Registros eletrofisiológicos representativos das subclasses do padrão RS e suas respectivas curvas de acomodação mediante a aplicação de 0,8 nA.	89
FIGURA 28: Neurônios RS marcados com biocitina.	91
FIGURA 29 Características elétricas do padrão FS humano.	93
FIGURA 30 Características elétricas do padrão IB humano.	95
FIGURA 31 Registros eletrofisiológicos representativos e comportamento de acomodação dos potenciais de ação das subclasses do padrão IB mediante a aplicação de 0,8 nA.	96
FIGURA 32. Neurônio ROB de CA1 humano. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina, desenho em câmara clara	97
FIGURA 33. Registros eletrofisiológicos representativos dos subtipos dos neurônios ROB registrados de tecido humano	100
FIGURA 34. Distribuição (em porcentagem) das principais classes de disparo neuronal encontrado em ratos controles (A);	103

TABELAS REFERENTES AOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 1. Sumário das propriedades elétricas neuronais de CA1 de ratos controles.	67
TABELA 2. Sumário das propriedades elétricas neuronais de CA1 de ratos tratados com pilocarpina.	81
TABELA 3: Dados Clínicos	83
TABELA 4. Sumário das propriedades elétricas neuronais de CA1 tecido hipocampal humano.	101
TABELA 5- Sumário dos principais achados encontrados em ratos controles, ratos tratados com pilocarpina e tecido hipocampal Humano.	105
Tabela 6- Análise de Variância das propriedades eletrofisiológicas mensuradas no tecido hipocampal humano	111
TABELA 7- Comparações Múltiplas das propriedades	111
TABELA 8: Presença dos parâmetros qualitativos nos 4 padrões básicos registrados em CA1 humano	112
TABELA 9- Ajustes Residuais da Presença dos parâmetros qualitativos entre os padrões IB X ROB registrados no tecido hipocampal humano	114
TABELA 10- Ajustes Residuais da Presença dos parâmetros qualitativos entre os padrões RS X IB registrados no tecido hipocampal humano	116
TABELA 11- Ajustes Residuais da Presença dos parâmetros qualitativos entre os padrões RS X ROB registrados no tecido hipocampal humano	118
TABELA 12- Ajustes Residuais da Presença dos parâmetros qualitativos entre os padrões sRS X lRS registrados no tecido hipocampal humano	121
TABELA 13 - Ajustes Residuais da Presença dos Parâmetros Qualitativos entre os padrões de disparo sRS X fRS registrados no tecido hipocampal humano	122
TABELA 14- Ajustes Residuais da Presença dos Parâmetros Qualitativos entre os padrões de disparo fRS X lRS , registrados no tecido hipocampal humano	124
TABELA 15- Estudo Comparativo: Análise de Variância das propriedades mensuradas	132
TABELA 16- Comparações Múltiplas entre e intra grupos de estudo;	133
TABELA 17: Tentativa de correspondência entre as classes eletrofisiológicas observadas (166

SUMÁRIO

	Página
Introdução	1
Epilepsia	1
<i>Epilepsia do Lobo temporal</i>	3
HIPOCAMPO	3
ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS NA ELT	10
ESTUDO EXPERIMENTAL	16
Estudo dos Disparos Neurais	18
CORRENTES IÔNICAS DOS NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS	19
ESTUDO DOS PADRÕES DE DISPARO NEURONAL:	22
Objetivos	31
Geral	31
Específicos:	31
Materiais e Métodos	30
ÉTICA	32
GRUPOS DE ESTUDO	32
OBTENÇÃO DAS FATIAS CEREBRAIS	35
MEIOS DE PERFUSÃO	42
REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS	42
ANÁLISE DOS PADRÕES DE DISPARO NEURONAL	47
Critérios para a classificação dos Padrões de disparo	47
Análise da Frequência dos potenciais de ação	48
Técnica de com marcação intracelular com biocitina	49
ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
Resultados	53
PARTE I: PADRÕES DE DISPARO OBSERVADOS EM RATOS	
CONTROLES, RATOS TRATADOS COM PILOCARPINA E	54
TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO	
RATOS CONTROLES	55
RATOS TRATADOS COM PILOCARPINA	68
TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO	82
SUMÁRIO DAS CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS	
PADRÕES DE DISPARO DOS GRUPOS: RATOS	
CONTROLES, RATOS TRATADOS E TECIDO HUMANO.	102
PARTE II: AS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DOS PADRÕES	
DE DISPARO OBSERVADOS DO TECIDO HIPOCAMPAL	107

HUMANO:	
ANALISE DAS VARIÁVEIS QUANTITATIVAS	108
ANALISE DAS VARIÁVEIS QUALITATIVAS	112
PARTE III: ESTUDO DAS COMPARATIVO DAS	
PROPRIEDADES ELÉTRICAS DOS PADRÕES DE DISPARO	126
COMUNS OBSERVADOS EM RATOS E TECIDO HUMANO.	
Discussão	134
Conclusões	169
Resumo	170
Abstract	172
Referências Bibliográficas	173

INTRODUÇÃO:

EPILEPSIA

Disfunções na atividade dos neurônios e na plasticidade sináptica estão associadas à diversas patologias cerebrais. A epilepsia é uma neuropatologia descrita há milhares de anos. Era mal compreendida e considerada como resultado da possessão da mente humana por uma entidade divina. Apenas em 1873, Hughlings Jackson formula a definição moderna da epilepsia como "uma desordem episódica do sistema nervoso, ocasionada pela excessiva descarga sincrônica e mantida por um grupo de células nervosas" (Fustes e Fustes, 1992).

A epilepsia é a denominação para uma série de distúrbios cerebrais humanas caracterizadas por crises periódicas e espontâneas que ocorrem mesmo na ausência da doença tóxica metabólica ou estado febril (Gastaut, 1973). Caracterizam-se por manifestações clínicas decorrentes do disparo intenso, sincronizado e rítmico, de populações neuronais no sistema nervoso central (McNamara, 1994). Outra situação importante é o *status epilepticus* (SE), no qual o indivíduo apresenta "crises epiléticas suficientemente prolongadas ou repetidas em intervalos curtos que resultam num estado epilético contínuo e duradouro". Esse evento pode ser seguido de um período silencioso que antecede a eclosão de crises espontâneas recorrentes (Gastaut *et al.*, 1975).

Estima-se que entre 1 e 8% dos pacientes epiléticos apresentaram, em algum período da sua doença, pelo menos um episódio de SE (Sander e Hart,

1999). Fernandes e colaboradores (Fernandes, 1993) determinaram uma prevalência de 16,5-20,3/1000 respectivamente para a epilepsia ativa e inativa em Porto Alegre. Cerca de 10-20% dos pacientes tem suas crises inadequadamente tratadas e aproximadamente 30% apresentam resistência a terapia medicamentosa (Remy e Beck, 2006). Em geral estes estudos demonstram que estes pacientes não respondem a 2-3 fármacos antiepilépticos (FAEs) (Regesta e Tanganelli, 1999; Remy e Beck, 2006). Os mecanismos celulares que levam a fármaco-resistência ainda são inconclusivos. Entre as epilepsias refratárias ao tratamento clínico as crises parciais complexas com origem no lobo temporal são as mais freqüentes (Regesta e Tanganelli, 1999; Remy e Beck, 2006). O conhecimento que se tem sobre os mecanismos envolventes da epilepsia, estão baseados principalmente em estudos tanto de pacientes (Remy e Beck, 2006) como em modelos epilepsia do lobo temporal.

Uma das hipóteses que tentam explicar a fármaco-resistência foi proposta por Kwan e Brodie em 2005 (revisado por Remy e Beck, 2006) onde foi postulada a “hipótese do transportador”. Em condições normais, a FAE penetra no parênquima e se ligam a moléculas transportadoras, localizadas nas células endoteliais, que exercem suas funções nos seus respectivos alvos. Nesta hipótese, a fármaco-resistência pode ser causada por modificações dessas moléculas. Existem relatos na literatura de modificações de alguns desses alvos como por exemplo: alteração da expressão das subunidades alfa dos canais de sódio voltagem dependentes e diminuição das subunidades $\alpha 1$ dos receptores GABAérgicos respectivamente de CA1 e giro denteado do

tecido humano; aumento da expressão de canal do tipo T ativado por cálcio e diminuição dendrítica da corrente catiônica mista, I_H em modelos experimentais (Remy e Beck, 2006)

EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)

De modo geral, a ELT se caracteriza por apresentar crises parciais simples, complexas, recorrentes, e com generalização secundária (crises Tônico-clônicas), pouco freqüentes. Os principais sintomas podem estar associados a lesões do sistema límbico temporal, em especial do hipocampo, da amígdala e parahipocampo (Blumcke *et al.*, 1999; Avoli *et al.*, 2002, 2005) .

HIPOCAMPO:

Anatomia:

Os principais componentes do sistema límbico são os córtices límbicos associativos, a formação hipocampal, o complexo amigdalóide, os núcleos septais, o hipotálamo e o bulbo olfatório. O complexo amigdalóide e a formação hipocampal estão localizados na região medial do lobo temporal, adjacentes ao giro parahipocampal que é constituído pelo complexo subicular e os córtices entorrinal e parahipocampal (O'Mara *et al.*, 2001).

A formação hipocampal (FH) foi assim denominada por sua semelhança com um cavalo marinho (hipocampo, em grego) quando observada no assoalho do corno inferior dos ventrículos laterais do cérebro humano. A formação hipocampal é constituída pelo hipocampo (HIPO), giro denteado (GD), complexo subicular e córtex entorrinal (CE) (revisado por Amaral e

Witter, 1989; Knowles, 1992). O HIPO é denominado *Cornus Ammonis*, ou Corno de Amon (CA), por sua forma lembrar a de um chifre de carneiro presente na cabeça do Deus Egípcio Amon (Figura 1 e 2).

A lâmina contínua de neurônios principais que origina o corno de Amon e o giro denteado dobra-se sobre si mesma e separa-se ao longo do desenvolvimento, obliterando a fissura hipocampal e formando duas estruturas interdigitadas em forma de C, ambas constituindo um arqueocórtex em três camadas ou *strata* denteado (Knowles, 1992; Affifi e Bergman, 1998) Neurônios são denominados principais quando recebem ou realizam sinapses com neurônios externos ao núcleo ou região em que estão situados. Interneurônio é a denominação de neurônios que apenas possuem sinapses locais, não necessariamente inibitórias (Shepherd e Koch, 1997; Turner *et al.*, 1998)

Os neurônios piramidais do CA e granulares no GD são encontrados no *stratum pyramidale* (SP) e *stratum granulosum* (SG), respectivamente. Os dendritos apicais dos neurônios piramidais do CA constituem o *stratum radiatum* (SR) e seus dendritos basais, o *stratum oriens* (SO) (figura 1a). Os dendritos apicais dos neurônios granulares do GD (NGD) constituem o *stratum moleculare* (SM) e seus dendritos basais misturam-se em um estrato polimórfico, com interneurônios, denominado hilus. Outros *strata* do hipocampo são o *stratum lucidum* (SL), formado pelos dendritos apicais proximais dos neurônios piramidais de CA3, e o *stratum lacunosum-moleculare* (SLM), formado pelos dendritos apicais distais dos neurônios granulares do GD.

Na região do CA, existe grande variedade de interneurônios. Estes incluem as células em cesto, localizadas próximas ao *SP* e fazem inibição via sinapse axo-somáticas, *oriens/alveous* interneurônios (O/A interneurônios), *moleculare-lacunosum* interneurônios (L/M interneurônios). E as células em candelabro que inibem as células piramidais em segmento inicial do axônio (Knowles, 1992; Turner *et al*, 1998).

A citoarquitetura da FH e as conexões entre as diversas regiões são bastante similares ao longo da escala filogenética, entretanto existem variações na posição dos hipocampus entre as espécies. Em roedores, por exemplo, a rotação hemisférica é parcial e o hipocampo é predominantemente dorsal. Podendo ser dividido em duas regiões distintas: inferior (com a região de CA1) e superior (com CA3). Na espécie humana a rotação hemisférica é completa, o hipocampo encontra-se posicionado ventralmente e a relação CA1 e CA3 é invertida quando comparada ao de rato (Figura 1).

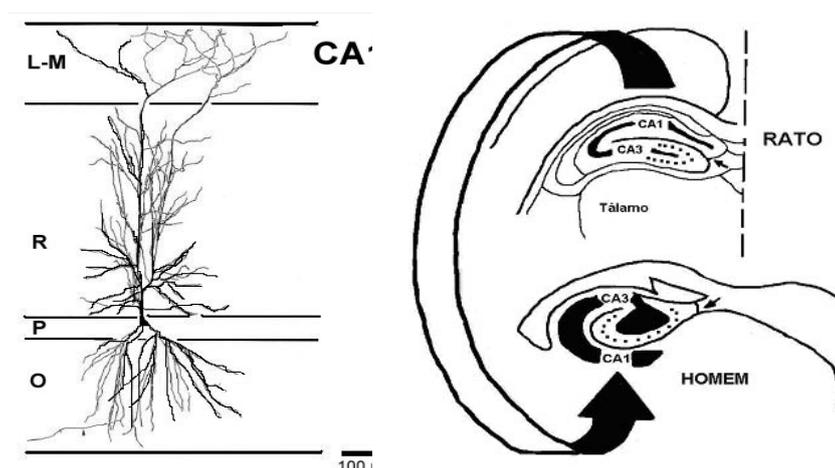


FIGURA 1. A) Camadas da área de CA1 de rato- *stratum lacunosum-moleculare* (L-M), *stratum radiatum* (R), *stratum pyramidale* (P), *stratum oriens* (O). (adaptado, Althemus, *et al* 2005). B) diferenças no posicionamento anatômico dos hipocampus de ratos e tecido humano. As pequenas setas indicam o sulco hipocampal. A seta grande indica a inversão no posicionamento do hipocampo com a rotação hemisférica. (adaptado de Duvemoy, 1988)

Organização espacial da Formação Hipocampal

O estudo fisiológico dessas conexões levou ao delineamento, por Anderson e colaboradores (Anderson *et al.*, 1971), de uma via trisináptica organizada em lamelas discretas dispostas transversalmente ao eixo septo-temporal do hipocampo. Esta via inicia nos neurônios da camada II do córtex entorrinal que projetam seus axônios, que constituem a via perfurante, assim denominada por perfurar a fissura hipocampal, até o *SM* do giro denteado, onde formam a primeira sinapse da via sobre os dendritos apicais dos neurônios granulares. A segunda sinapse é formada no *SL*, entre os axônios, sendo denominados fibras musgosas, dos neurônios granulares do giro denteado e os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA3. A terceira sinapse da via ocorre entre as projeções dos neurônios piramidais de CA3, chamadas colaterais de Schaffer (FCS) e os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA1.

A via de “saída” de informação do corno de Amon são os axônios dos neurônios piramidais de CA1, que se projetam para o complexo subicular. Anderson (Anderson *et al.*, 1971; Amaral e Witter, 1989) sugeriu que “através dessa organização lamelar, pequenas fatias do córtex hipocampal poderiam operar como unidades funcionais independentes, embora conexões septo-temporais excitatórias e inibitórias possam modificar o comportamento de disparo de lamelas vizinhas”.

Em uma revisão dos dados anatômicos e fisiológicos realizada por Amaral e Witter (Amaral e Witter, 1989), a proposição da organização lamelar do hipocampo foi fortemente contestada. A utilização de traçadores

anterógrados (especialmente PHAL, uma leucoaglutinina do feijão) permitiu a visualização de uma grande divergência septo-temporal das conexões da via trisináptica.

Na via perfurante observou-se que, de um ponto de partida no córtex entorrinal, os feixes axonal e septal divergem temporalmente ao longo de vários milímetros com maior intensidade no sentido septal. Além disso, a via perfurante estimula diretamente os neurônios piramidais de CA3, com intensidade igual à encontrada nos dois terços externos do *SM* do GD e, com menor intensidade, o complexo subicular e os outros campos do CA (Henze et al., 2000).

No giro denteado, os axônios dos interneurônios polimórficos do hilus projetam-se para o terço interno do *SM*, inervando-o. Essa é uma via associativa do giro denteado e distribui-se apenas ao longo do eixo septo-temporal, pois os axônios dos interneurônios inervam os neurônios granulares posicionados septal ou temporalmente, mas não os neurônios granulares na mesma lamela transversal que os estimulam através de colaterais das fibras musgosas (Amaral e Witter, 1989).

As FCS também percorrem o eixo septo-temporal organizado em diversos gradientes. Os neurônios piramidais localizados próximos ao giro denteado lançam projeções superficiais no *SR* e para regiões mais distantes em CA1; ou seja, próximas ao complexo subicular. As FCSs possuem ainda, muitos terminais sinápticos associativos sobre os dendritos dos próprios neurônios piramidais de CA3, o que, combinado com a existência de sinapses

elétricas entre esses neurônios, torna o disparo regional de neurônios de CA3 altamente sincronizado (Ishizuka *et al.*, 1990).

Apenas as fibras musgosas (FMs) percorrendo o *SL* parecem realmente obedecer a uma organização lamelar transversal ao eixo septo-temporal da formação hipocampal (Shepherd e Koch, 1997). As FMs receberam esse nome, assim como as fibras cerebelares, por assemelharem-se à musgo, ao microscópio óptico, quando coradas pelo método Golgi. (Brown e Zador, 1997).

Mais uma importante via da formação hipocampal é a via têmporo-amônica, constituída de contatos monossinápticos de projeções axonais de neurônios da camada III do córtex entorrinal para o complexo subicular e CA1 (Witter *et al.*, 1988 Avoli *et al*, 2002). Essa via realiza apenas uma influência modulatória no ritmo de disparo dos neurônios piramidais de CA1, pois encontram-se, em condições fisiológicas normais, sob controle inibitório de interneurônios O/A de CA3 (Maccaferri e McBain, 1995; Avoli *et al*, 2002).

“Assim sendo, parece ser razoável concluir que a formação hipocampal é uma região cortical de organização tridimensional que realiza processamento de informação em seus eixos transverso e longo” (Amaral e Witter, 1989) e onde as propriedades da rede surgem da interação entre neurônios principais e interneurônios.

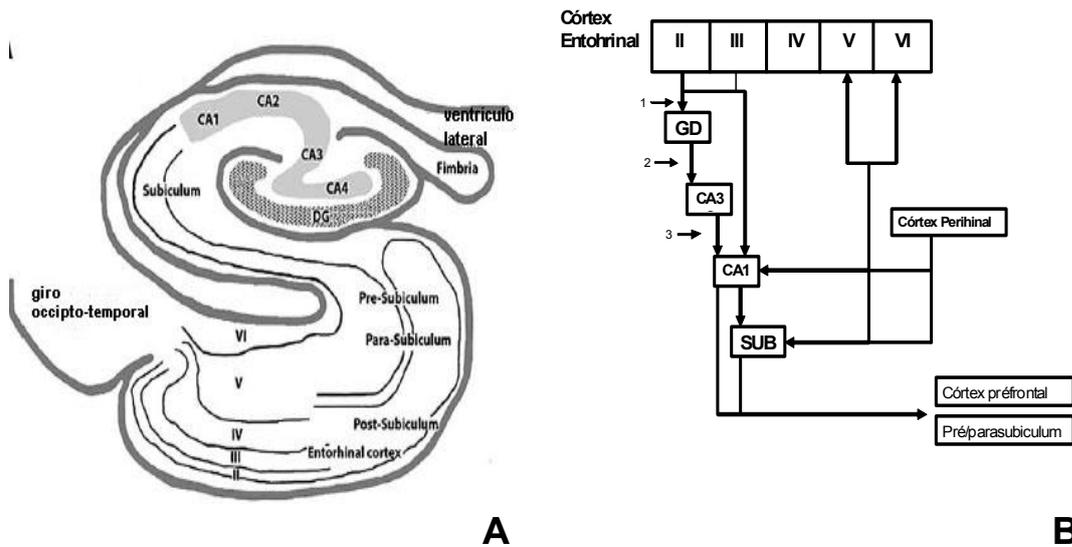


FIGURA 2. A) Esquema da formação hipocampal e para-hipocampal (Stafstron, 2005). B) Sumário das conexões intrínsecas da formação hipocampal controle. 1) via perfurante; 2) fibras musgosas, 3) fibra colateral de Schaffer. (O'Mara et al, 2001)
 Abreviaturas: II, III e IV) camadas externas do córtex entorrinal; V e VI camadas internas do córtex entorrinal; GD) giro denteado; CA3) área de CA3 hipocampal; CA1) área de CA1 hipocampal; SUB) subiculum.

Na ELT freqüentemente são observadas modificações histológicas como a esclerose mesial temporal (EMT) (Faulkner e Brown, 1999); Blumcke et al, 1999; Avoli et al, 2002). Os primeiros estudos que relatam esta patologia datam 1825, quando Bouchet e Cazaunovielle descreveram macroscopicamente a atrofia hipocampal (revisado por Sanabria *et al.*, 1997). Posteriormente Maynert (1867) e Pflieger (1880) interpretaram esta condição como resultado de distúrbios metabólicos provocados pela epilepsia. Somente em 1880, descreveu-se detalhadamente o processo de morte celular, predominantemente em CA1 e a assimetria hipocampal (revisado por Sanabria *et al*, 1997).

Uma característica marcante da EMT é a perda seletiva dos neurônios do o núcleo lateral da amígdala, setor de Sommer (pró-subículo), da camada III do

CE, no hilo dentado, CA3 e CA1 (Blumcke *et al.* 1999; Avoli *et al.*, 2002, 2005). Em contrapartida as células do giro denteado (CGD), CA2 bem como subículum que são pouco afetadas (Gloor, 1997 revisado por Avoli *et al.*, 2005). Há a preservação das células GABAérgicas localizadas no *stratum oriens* (Babb *et al.*, 1989). Danos similares são observados no modelo do ácido caínico (Ben-Ari, 1985) e pilocarpina, duas semanas após o estabelecimento da condição crônica com as CER (Turski *et al.*, 1983; Cavalheiro *et al.*, 1991; Cavalheiro *et al.*, 1996).

Após o SE induzidos pela estimulação elétrica mostraram que a progressão das crises dependia da morte das células do hilo (Gorter *et al.*, 2001). Foi observado ainda que o crescimento dos dendritos basais das células hilares após SE, o que levou a hipótese de que esta condição poderia favorecer a excitabilidade (Ribak *et al.*, 2000).

O “*sprouting*” é uma das possíveis causas de excitabilidade na ELT (Wuarin e Dudek, 1996, Lehmann *et al.*, 2000; Koyama e Ikegaya, 2004). As células emitem colaterais estabelecendo novas conexões sináptica aberrantes gerando um rearranjo sináptico dos pacientes com ELT. Esta condição foi inicialmente descrita no GD tanto em humanos quanto em animais epiléticos (Avoli, 2002, Buckmaster *et al.*, 2002). Além disso, as fibras musgosas do GD emitem colaterais para o seu próprio campo dendritico, resultando num circuito excitatório recorrente (Nadler *et al.*, 1980, Avoli, 2002; Buckmaster *et al.*, 2002). Foram encontrados resultados semelhantes em amostras de tecido epilético humano oriundo da cirurgia (Zhang e Houser, 1999). Esta característica não se restringe ao GD, mas também para CA1 e outras áreas extra hipocampais

contribuído para a cronicidade das crises (Lehmann *et al.*, 2000; Cavazos *et al.*, 2004)). Cavazos e colaboradores (2004) evidenciaram além do “*sprouting*” dentro de CA1, mas também a emissão de colaterais até o subiculum.

A perda neuronal e a reorganização sináptica geralmente coexistem, entretanto o fenômeno pode ser isolado (isto é na ausência da perda neuronal hilar) (Mathern *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 2003). A esclerose hipocampal em CA1 não necessariamente promove a atividade rítmica no subiculum *in vivo* ou *in vitro*. Além disso, a atividade gerada pelos circuitos excitatórios e inibitórios ocorrem mesmo na ausência da perda neuronal (Cohen 2003).

ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS NA ELT:

O termo epileptogênese pode ser aplicado para uma variedade de modificações bioquímicas, anatômicas, fisiológicas progressivas que propiciam o aparecimento de crises espontâneas recorrentes (Stables *et al.*, 2002). Os mecanismos celulares responsáveis pela epileptogênese permanecem indeterminados. Uma descrição das bases elétricas e celulares da epilepsia deveria definir as circunstâncias que dão origem a descarga elétrica inicial (ictal e interictal), especificar o que constitui e a causa da transição de interictal para ictal, além de analisar os mecanismos sinápticos e não sinápticos (Dudek, 2001) pelos quais as descargas elétricas se difundem e os mecanismos que levam a interrupção dessa atividade. Neste processo podem estar envolvidos diferentes mecanismos, porém ainda pouco se sabe e não existe consenso quanto ao que se conhece.

A localização da área epileptogênica da formação hipocampal é motivo de discussões. Existe uma corrente que aponta para as áreas CA3 e CE como geradoras das atividades interictais e ictais respectivamente (Avoli et al, 2002). Entretanto hoje se admite que o *subículum* seria responsável pela atividade interictal na ELT humana (Cohen *et al.*, 2002, 2003; Stafstrom, 2005; Avoli, 2005; de Lanerolle e Lee, 2005) e o CE, responsável pela geração de atividade ictal (de Lanerolle e Lee, 2005).

Um dos poucos consensos existentes na hiperexcitabilidade na ELT foi atribuída, pelo menos em parte, a quatro fatores: 1) aumento da excitação e propagação da atividade de determinados grupos de neurônios que disparam atividade em salva de potenciais de ação; 2) aumento da transmissão glutamatérgica, particularmente via conexões recorrentes 3) uma hipofunção das conexões inibitórias mediadas pelo GABA (ácido gama-amino butírico) (Mody e Heinemann 1987; Traub et al, 1996; Buckmaster et al, 2002) e 4) inibição preservada porém com o excesso da atividade excitatória não há uma inibição efetiva (Wittner *et al.*, 2005). Esse desbalanço entre excitação e inibição já tinha sido postulado por Gowers (1880) como causa das descargas anormais no cérebro (apud Treiman, 2001).

DIMINUIÇÃO DA INIBIÇÃO MEDIADA PELO GABA NA ELT

Há muito tempo sugere-se a existência de uma hipofunção dos sistemas inibitórios nas epilepsias, fundamentalmente nos sistemas de neurotransmissão mediados pelo GABA (Schwartzkroin, 1994, Bradford, 1995; Treiman, 2001;

Avoli et al, 2002, 2005). Os receptores são o **GABA_A** e o **GABA_B**, o primeiro é do tipo ionotrópico responsável por uma resposta inibitória rápida e de curta duração, e o segundo é metabotrópico apresentando uma resposta mais tardia e duradoura (Barnard *et al.*, 1998)

A diminuição do controle GABAérgico pode ser resultado de uma perda de conexão dos interneurônios com os seus “*inputs*” excitatórios. Originalmente esta idéia foi proposta por Sloviter (Sloviter, 1991, 1999), onde os interneurônios estariam dormentes. Conclusões similares foram observadas em modelos experimentais, onde o SE era auto-sustentado pela estimulação elétrica (Bekenstein e Lothman, 1993; Mangan e Lothman, 1996) e epilepsia focal induzida pela toxina tetânica (Empson e Jefferys, 1993) e na área de CA1 após o tratamento com ácido caínico (Williams *et al.*, 1993). Bear e colaboradores (1996) sugeriram que os interneurônios das camadas superficiais do CE de ratos epilépticos, estariam dormentes. Posteriormente, estes achados se estendiam para as camadas mais profundas (Fountain *et al.*, 1998).

Outras mudanças funcionais dos mecanismos inibitórios foram observadas na ELT, como déficit na função de transporte do GABA (Williamson *et al.*, 1995) alteração da composição das subunidades de GABA_A (Fisher, 2004), redução da densidade desses receptores (Treiman, 2001) alteração da afinidade desses receptores (Brooks-Kayal *et al.*, 1998, Treiman, 2001) alteração da função do GABA_A mediada pelo Zinco (Brooks-Kayal, 1998; Coulter, 2000; Dudek, 2001)

Recentemente o conceito de defeito na inibição GABAérgica vem sendo reformulado. Em algumas formas de epilepsia com crises de ausência e em alguns modelos de epilepsia o GABA e seus receptores exercem função excitatória (Kohling, 2002) Estas observações levaram a postular uma nova hipótese: “GABA excitatório”. Em condições fisiológicas normais os interneurônios gabaérgicos são ativados; através de sinapses excitatórias, a liberarem GABA para inibir a atividade das células adjacentes. Em situações patológicas, como a epilepsia com crises de ausência, o GABA exerce um efeito excitatório nos neurônios piramidais aberrantes. Os interneurônios neste caso recrutam novos neurônios dentro da atividade sincrônica patológica.

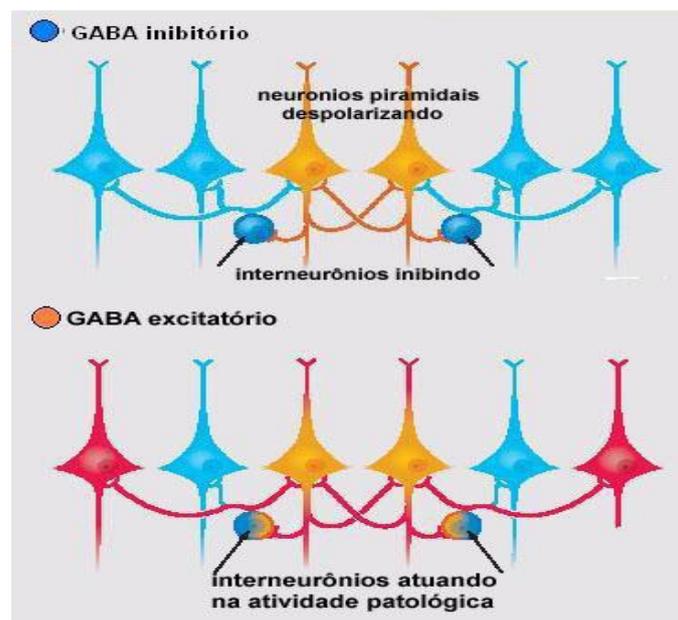


FIGURA 3: HIPÓTESE DO GABA EXCITATÓRIO: GABA inibitório- em resposta a ativação dos neurônios piramidais (neurônios em laranja) o GABA é liberado pelos interneurônios (círculo azul) produzindo inibição das células adjacentes (azul). GABA excitatório- em resposta a ativação dos neurônios piramidais (laranja) o GABA é liberado pelos interneurônios (círculo azul/laranja) provocando a inibição em alguns neurônios (neurônios em azul) e excitação dos neurônios patológicos (neurônios em vermelho). *(adaptado de Kohling, 2002).*

AUMENTO DA EXCITAÇÃO MEDIADA PELO GLUTAMATO NA ELT

A hiperexcitabilidade na ELT foi atribuída, pelo menos em parte, à função aumentada de uma subpopulação de sinapses glutamatérgicas que utilizam receptores NMDA (Mody e Heinemann, 1987; Bradforrd, 1995). A base pode estar relacionada a uma alteração na fosforilação do receptor, no caso do receptor NMDA (Kohr e Mody, 1994), gerando mudanças na expressão de subunidades do receptor específico para glutamato, observada em pacientes com ELT (Babb *et al.*, 1996; Blumcke *et al.*, 1996) e em modelos experimentais de epilepsia (Mathern *et al.*, 1997).

Essas mudanças na composição das subunidades de receptores glutamatérgicos poderiam ter conseqüências importantes nas propriedades cinéticas assim como na permeabilidade aos íons cálcio (Nakanishi, 1992, Bradford, 1995;). Recentemente foi demonstrado que na ELT uma alteração de receptores tipo AMPA, e participação de circuitos polissinápticos na gênese da atividade epileptiforme (Kohling *et al.*, 1998).

Trabalhos realizados por Choi e colaboradores, relacionaram a excitotoxicidade do glutamato com um influxo de Ca^{2+} extracelular através da membrana (Choi *et al.*, 1987). A via de entrada do cálcio, através de receptores sensíveis a AMPA e Kainato (Ca-A/K), foi determinada com o uso de antagonistas dos diferentes grupos de receptores ionotrópicos de glutamato (Gill e Lodge, 1997). A morte neuronal é seletiva, assim apenas alguns receptores dos tipos AMPA e Cainato, canais permeáveis a cátions como o canal Ca-A/K, tornam-se mais sensíveis (Weiss e Sensi, 2000). Hollman e

colaboradores (1991) descobriram que a ausência da subunidade GluR2 (também conhecida como GluR-B) do receptor de glutamato do tipo AMPA é responsável pela mudança na permeabilidade seletiva do canal iônico. A diminuição do mRNA para a subunidade GluR2, e também da quantidade da proteína receptora, nos neurônios piramidais de CA1 e CA3 após uma injúria como o *status epilepticus* foi demonstrada por Grooms e colaboradores (Grooms *et al.*, 2000) e Friedman e colaboradores (Friedman *et al.*, 1994).

Os canais Ca-A/K são permeáveis também a zinco, e sob condições de grande liberação sináptica desse íon, como ocorre na epilepsia e em isquemias, o Zn^{2+} pode translocar-se através da sinapse, acumulando-se no neurônio pós-sináptico (Frederickson *et al.*, 1989) O aumento da concentração citoplasmática de Zn^{2+} e também de Ca^{2+} leva a uma despolarização mitocondrial e a uma produção intensa de espécies reativas de oxigênio que causam a morte neuronal (Sensi *et al.*, 1999)

ESTUDO EXPERIMENTAL

ESTUDO DA EPILEPSIA *IN VIVO*:

A utilização de tecido humano, para o esclarecimento dos mecanismos básicos que envolvem a epileptogênese é extremamente difícil. Dentre os vários problemas identificados existem questões éticas, reprodutibilidade, efeitos da própria medicação e aplicação de intervenções experimentais necessárias para a dissecação dos vários processos celulares e sinápticos que contribuem para a atividade epiléptica.

Grande parte do conhecimento acerca dos mecanismos básicos das epilepsias provém de estudos em modelos animais. Dentre os modelos *in vivo* existentes, o que mais se aproxima da ELT é o modelo da pilocarpina. O hidrocloreto de pilocarpina é retirado de extratos de folhas das árvores sul-americanas *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*. A administração sistêmica de pilocarpina, em ratos, pode causar um estado comportamental crônico que é similar à epilepsia do lobo temporal humana (Turski *et al.* 1983).

Este modelo experimental foi inicialmente descrito por Turski e colaboradores (Turski *et al.*, 1983). A injeção sistêmica de pilocarpina, um agonista colinérgico do subtipo muscarínico, induz o *status epilepticus* em ratos. Isso é causado, provavelmente, pela ativação dos receptores muscarínicos de acetilcolina, do subtipo m1, nos neurônios da camada II do córtex entorrinal. A ativação dos receptores m1 é ampliada por influxo de íons de cálcio. Essa propriedade introduz um mecanismo em que a ativação do receptor muscarínico causa uma despolarização robusta da membrana e disparo repetitivo dos neurônios somente se acompanhada de atividade da célula pós-sináptica (Klink e Alonso, 1997). Como nas células de origem da via perfurante, os neurônios da camada II do córtex entorrinal estão em uma posição crucial para causar a hiperexcitação dos neurônios da formação hipocampal. A hiperatividade dos neurônios hipocampais também pode ser resultado da inibição dos interneurônios hipocampais por neurônios GABAérgicos septo-hipocampais que são sensíveis à agonistas muscarínicos (Wu *et al.*, 2000).

Até o estabelecimento das crises espontâneas recorrentes, o animal passa por 3 fases: fase aguda, fase silenciosa ou latente e fase crônica (Cavalheiro *et al.*, 1991). Estas fases serão abordadas no item materiais e métodos.

ESTUDO DA EPILEPSIA *IN VITRO*:

Uma das técnicas amplamente utilizadas para o estudo do tecido epilético *in vitro* é técnica das fatias de cerebrais (ou do inglês, *brain slices*). Esta técnica utiliza cortes de cérebro com espessuras que variam de 100 a 700 μm , mantidos vivos em ambiente controlado, tanto físico como **quimicamente** (Alger *et al.*, 1984; Lynch e O'Mara, 1997; Contreras, 2004).

As preparações foram desenvolvidas por Henri McIlwain e colaboradores na década de 50, com o intuito de estudar a bioquímica do SNC (McIlwain e Buddle, 1953). Os primeiros registros da atividade elétrica obtidas de fatias de cérebro foram realizadas em preparações de córtex piriforme por Yamamoto e McIlwain (Yamamoto e McIlwain, 1966). Hoje em dia esse procedimento se expandiu para outras áreas além da bioquímica, oferecendo inúmeras oportunidades de pesquisa para anatomistas, fisiologistas, farmacologistas, biólogos moleculares e biofísicos no estudo dos mecanismos básicos das epilepsias, especificamente no estudo da epilepsia do lobo temporal. A técnica de fatias cerebrais está intimamente relacionada com o estudo eletrofisiológico, apresenta inúmeras vantagens como por exemplo, possibilidade de visualização do local onde serão realizados os registros. Outra facilidade é a possibilidade de manipulação do meio externo, modificando sua concentração iônica (Henderson, 1993). Através disto, é possível não só mimetizar condições morfo-fisiológicas normais *in vivo*, além de patológicas (Schwartzkroin, 1994) mas também a realização de estudos mais refinados que demonstram a abertura e fechamento dos canais iônicos ("*patch clamp*") (Neher *et al.*, 1978).

Em 1955, Ward e Thomas registraram extracelularmente a atividade dos neurônios neocorticais humanos epiléticos que haviam sido cirurgicamente removidos. Em 1976, Schwartzkroin e Prince relataram os primeiros registros intracelulares *in vitro* de tecido humano epiléticos (Schwartzkroin e Prince, 1976). A metodologia de obtenção das fatias será detalhadamente descrita nos materiais e métodos do presente estudo.

ESTUDO DOS DISPAROS NEURONAIS

Sabe-se que nenhum neurônio responde da mesma forma quando ativado por pulsos de correntes despolarizantes ou hiperpolarizantes (Llinas, 1988). Um dos parâmetros dinâmicos que está em estreita relação com o processamento de informação do cerebral é a própria atividade neuronal, que não se restringe apenas a interações excitatórias e inibitórias, mas também as suas propriedades intrínsecas elétricas e a frequência de descarga são reflexos da excitação (Karpuk e Vorob'ev, 2004). Estas características, são o resultado de um rico repertório de canais iônicos diferentes daqueles que geram os potenciais de ação (Hammond, 2000) , da distribuição e densidade dos mesmos ao longo da membrana dendro-somática (Llinas, 1988; Contreras, 2004). Tanto as propriedades eletrofisiológicas quanto o próprio potencial de ação gerado podem determinar diferentes classes eletrofisiológicas (Steriade, 2004). Segundo Connors e Gutnick (1990), os disparos dos neurônios neocorticais diferem drasticamente em resposta a despolarização provocada pela injeção de pulsos de correntes supralimíares. A caracterização

eletrofisiológica por meio de pulsos despolarizantes é de grande importância na determinação das possíveis modificações que ocorrem em patologias como a epilepsia. Ao mesmo tempo devemos tomar estas características com cuidado, pois nos animais como um todo e mesmo em fatias, o comportamento bioelétrico de um neurônio pode mudar com os estados funcionais como vigília, sono e ativação de determinadas aferências.

CORRENTES IÔNICAS EM NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS:

As correntes iônicas constituem a base para o entendimento do funcionamento dos neurônios hipocampais tanto isoladamente, quanto como elementos de uma população neuronal interligados por circuitos elétricos. Elas também são essenciais para a compreensão do funcionamento dos neurotransmissores. Dessa forma, o maior (ou menor) nível de atividade elétrica de um neurônio é resultante do somatório de todas as condutâncias iônicas de membrana que determinarão por fim, os potenciais propagáveis da célula.

Na hipótese do transportador para a resistência aos fármacos, como já foi abordado anteriormente, foi proposta modificações de moléculas alvo, onde destacam-se alterações de determinados canais iônicos. As tabelas 1 e 2 mostram respectivamente um resumo das características das correntes iônicas e um sumário dos alvos da FAEs.

Tabela 1- Resumo das principais correntes hipocampais

- **CORRENTES DE SÓDIO (I_{Na})**

I_{NaR}	Corrente de sódio rápida (I_{NaR}) registrada em CA1, comporta-se como corrente convencional do tipo voltagem dependente, com limiar de ativação de -50 a 60 mV e um tempo de ativação máxima de $0,9$ ms (Hammond, 2000). É sensível a TTX. A I_{NaR} é descrita no soma e terminações dendríticas. Função básica é a genese e propagação do potencial de ação
I_{Nap}	Corrente de sódio de longa duração (I_{Nap}). Sua inativação é lenta se comparada a I_{NaR} responsável pelo PA. Ela é ativada com potenciais cerca de 10 mV mais positivos do que o Potencial de membrana. Em células piramidais de CA1 e células neocorticais a gênese das descargas em salva endógenas são mediadas pelo I_{Nap} . Na presença de TTX ou quando o sódio é substituído pelo íon colina essa corrente de retificação desaparece (Hammond, 2000).

- **CORRENTES DE CÁLCIO (I_{Ca}) :**

I_{CaT}	Ela é uma corrente de baixo limiar e é ativada e rapidamente desativada. Os mecanismos de ativação e desativação são tempo e voltagem dependentes sendo que essas propriedades cinéticas participariam na gênese de espículas de cálcio de baixo limiar. Em células granulares em desenvolvimento a IT parece ativar atividade em salva e despolarização pós-potenciais (Zhang <i>et al.</i> , 1993).
$I_{CaN,L,P}$	São correntes de alto limiar. A corrente tipo L, contribui para a corrente de cálcio de longa duração ao ser ativada por intensa despolarização. As do tipo N são ativadas a partir de potenciais hiperpolarizados (similar ao I_{CaT}), mas precisa de uma despolarização potente para ser ativada (O'Dell e Alger, 1991) são encontradas na parte pré-sináptica de células piramidais e contribuem para a liberação do neurotransmissor. A corrente tipo P diferencia das tipo N e L em que é ativada a potenciais de membranas mais negativos e por apresentar propriedades farmacológicas diferentes (Poncer <i>et al.</i> , 1997). Essas correntes de Ca podem participar na gênese de descargas em salva (Hammond, 2000).

- **CORRENTES DE POTÁSSIO (I_K)**

$I_K(I_{KDR})$	Retificador tardio ("Delayer rectifier"): É encontrada em todo o Sistema Nervoso, é ativada em potenciais de -40 mV e lenta inativação. Acredita-se que contribua para a repolarização dos potenciais de ação e de sua hiperpolarização pós-potencial (Storm, 1987).
I_A	A corrente do tipo IA, é uma corrente transitória com cinética de ativação suficientemente rápida para participar na repolarização pós-potenciais de ação (Storn, 1987). Além disso regula a excitabilidade neuronal. (Segal <i>et al.</i> , 1984).
I_D	Corrente transitória de inativação lenta do tipo D: Apresenta uma rápida ativação e uma lenta inativação foi descrito por Storm (1988) em células piramidais hipocampais. Um dos efeitos do I_D é a demora no disparo do potencial de ação (PA) induzida justamente após a despolarização do potencial de membrana ao limiar. Um outro efeito seria um aumento da repolarização após PA (Storn, 1987).

I_M	Corrente de K muscarina-sensível, com condutância sublimiar e com cinética de não inativação. Esta corrente participa do na gênese do pós-potencial hiperpolarizante rápido e intermediário (fAHP, mAHP) e também contribui na acomodação neuronal após descargas de potenciais de ação durante longas despolarização. Ela pode ser ser bloqueada por agentes colinérgicos muscarínicos (ex.pilocarpina) (Hammond, 2000).
⇒ Correntes de Cationicas Mistas	
I_H	Essa família de correntes tem nomes variados: I_H (“hiperpolarização”), I_Q (“ <i>queer</i> ”) ou (“ <i>funny</i> ”) (Pape, 1996). Elas carregam tanto Na^+ quanto K^+ em células hipocâmpais de CA1, a I_H participa do controle do padrão de disparo neuronal na resposta neuronal a estímulos excitatórios assim como na fase de despolarização que segue o AHP não dependentes de Ca. Esta corrente também é conhecida como “camaleão” pois, dependendo da situação ela pode contribuir tanto na excitação quanto inibição) (revisado por Chen <i>et al.</i> , 2002; Poolos, 2004; Inaba <i>et al.</i> , 2006). Na epilepsia ela parece ajudar na excitabilidade (Poolos, 2004, Inaba <i>et al.</i> , 2006).
⇒ Correntes ativadas por Ca^{2+} intracelular	
I_C	Nas células do hipocampo encontramos outro grupo de correntes ativadas por Ca^{2+} intracelular (Lancaster e Adams, 1986), a I_C . Esta, além de ser regulada pelo Ca^{2+} intracelular, é tempo dependente de voltagem. Ela é fortemente ativada pelo potencial de ação simples e sua ativação contribui para a repolarização e gênese da hiperpolarização rápida (Hammond, 2000).
I_{AHP}	Corrente semelhante a I_C , mas com cinética mais lenta e participando da gênese do pós-potencial hiperpolarizante lento (Madison e Nicoll, 1984). Ela pode ser modulada por diversos neurotransmissores (ex.acetilcolina, dopamina e glutamato). A ação dos mesmos pode alterar a excitabilidade neuronal (Hammond, 2000). A I_{AHP} participa no processo de acomodação neuronal controlando a frequência de disparo (Madison e Nicoll, 1984).

Tabela 2- Sumário dos alvos dos fármacos- antiepilépticos

DAE	Canais voltagem-dependentes						neurotransmissore	
	I_{NaR}	I_{NaP}	I_{Ca}	I_K	I_M	I_H	GABA	GLU
PHT	X	X	X	X				
CBZ	X		X					
OCBZ	X		X					
LMT	X	X	X	X		X		
VPA	X	X	X				X	
TOP	X	X	X	X			X	X
RET					X			
GAB			X	X		X		
PB			X				X	
BDZ			X				X	

Dados revisados por (Remy e Beck, 2006)

Abreviaturas: -lamotrigina (LMT), - retigabina (RET); gabapentina (GAB), - benzodiazepínico (BDZ), fenobarbital (PB); carbamazepina (CBZ), topiramato (TOP), fenitoína (PHT) valproato sódico (VPA), oxcarbamazepina (OCBZ),

PADRÕES DE DISPARO NEURONAL:

Como já foi dito anteriormente, um dos parâmetros que está em estreita relação com o processamento de informação do cerebral é a própria atividade neuronal e a frequência de descarga é um reflexo da excitação (Karpuk et al, 2004). A partir das características elétricas observadas no potencial de ação foram feitas diferentes classificações do disparo neuronal.

Connors e colaboradores (1982) ao categorizarem os disparos neuronais corticais avaliaram o comportamento da frequência dos intervalos dos potenciais de ação. Nestes estudos, foram observados que pulsos despolarizantes provocavam uma atividade tônica com um decréscimo da frequência dos intervalos dos potenciais de ação e em outros, ausência deste comportamento. Desta forma os neurônios corticais cerebrais foram classificados como: RS (do inglês *regular spiking*) células que apresentavam potenciais de ação isolados e intervalo dos mesmos regular entre um potencial de ação e outro e acomodação dos disparos evidente, isto é onde se observou uma frequência mínima dos intervalos (figura 4).. FS (do inglês *fast spiking*) células com potenciais de ação isolados como o RS, porém intervalo curtos e acomodação pequena ou ausente (figura 4). As células RS e FS foram descritas originalmente por Mountcastle e colaboradores 1969 durante os registros de campo em córtex de macaco (Mountcastle *et al.*, 1969), revisado por Connors e Gutnick, 1990, Contreras, 2004). E IB (do inglês *“intrinsic bursting”*) células que apresentavam descargas em salva, trens de potenciais da ação que emergem de uma onda despolarizante lenta. Este padrão foi descrito no registro intracelular em neurônios neocorticais, originalmente por

Connors e colaboradores, (Connors *et al.*, 1982). O padrão ROB (do inglês “*repetitive oscillatory bursting*”) apresenta descargas em salva repetidas ou intercaladas com disparos simples, sendo descrito originalmente por Silva e colaboradores (1991). A partir dos trabalhos de Connors e colaboradores (Connors *et al.*, 1982; Connors e Gutnick, 1990) e Agmon (Agmon e Connors, 1989) surgiram novos estudos e várias classificações alternativas. A tabela 3 mostra os principais trabalhos referentes aos disparos dos neurônios.

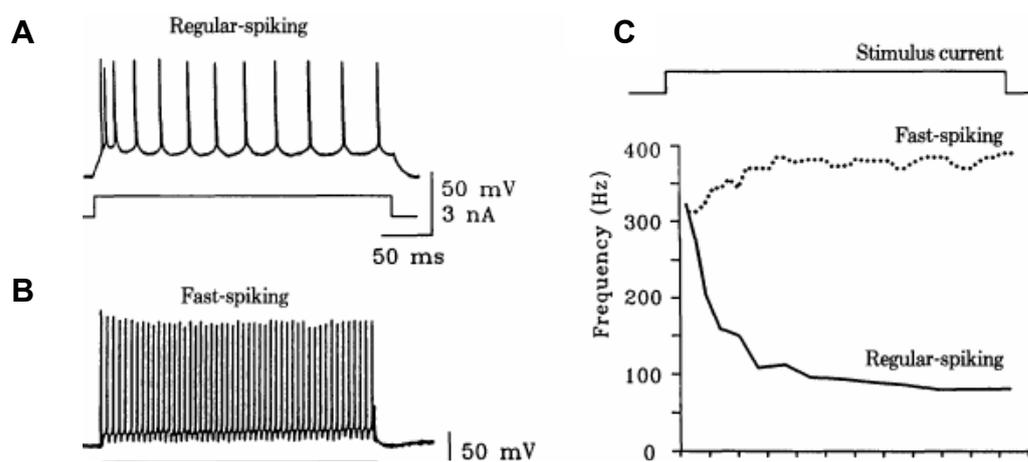


FIGURA 4: DIFERENÇAS ENTRE RS E FS. – A) A estimulação com correntes supralimíares, no neurônio RS, provocam o aparecimento de um potencial de ação com alta frequência seguido por declínio; em B) nas mesmas condições, os neurônios FS respondem com disparos de alta frequência que se mantém durante a estimulação. C) Gráfico mostrando a evolução da frequência dos disparos em função do tempo. (linha contínua) declínio da frequência nos neurônios RS. (linha pontilhada) manutenção da frequência nos neurônios FS

(Connors e Gutnick, 1990).

Tabela: 3 Classificação dos padrões de disparo em neurônios Neocorticais e

Autor	Animal	Características
Connors et al, (1982); McCormick et al., (1985)	cobaia	<p>RS: a maioria das células estudadas, trem de disparo simples e evidente acomodação dos disparos, alta frequência dos disparos.</p> <p>FS: intervalos dos disparos com curta duração, sem acomodação dos disparos e estes com alta frequência.</p> <p>IB: “clursters” de potenciais de ação com 2-5 espículas, geravam atividade do tipo “tudo ou nada”, propriedades similares a RS.</p>
Agmon e Connors (1989)	Camundongo	<p>RS: a maioria das células estudadas, trem de disparo simples e evidente acomodação dos disparos.</p> <p>IB: “clursters” de potenciais de ação com 2-5 espículas.</p>
Chagnac-Amitai e Connors, (1989)	Ratos Spraque-Dawley	<p>RS: RS1-presença de Despolarização pos-potencia (DAP) após 1º potencial de ação (PA); RS2- ausência de DAP, RS3- presença de DAP após cada PA. IB e FS igual a Connors et al (1982)</p>
Foehring e Wyler, (1990); Foehring et al., (1991)	Tecido Humano	<p>RS: a maioria das células estudadas, trem de disparo simples e evidente acomodação dos disparos.</p> <p>IB: atividade dupla (1990, 1991) e LTS (do inglês <i>low-threshold spike</i>) neurônios com características RS que apresentam baixo limiar (1991)</p>
Silva et al (1991); Yang et al., (1996)	Camundongo	<p>RS: trem de disparo simples e evidente acomodação dos disparos, alta frequência dos disparos.</p> <p>FS: intervalos dos disparos com curta duração, sem acomodação dos disparos e estes com alta frequência.</p> <p>IB: “clursters” de potenciais de ação com +3 espículas, geravam atividade do tipo “tudo ou nada”, propriedades similares a RS (silva et al, 1991). Neurônios com atividade dupla (Yang et al, 1996).</p> <p>ROB: similar a IB, descarga em salva seguido novamente por uma atividade em salva ou disparos simples. IM (Intermediária): características intermediárias a RS e IB, inicialmente disparam potencial de ação isolado, estímulos maiores provocam o aparecimento de descargas em salva.</p>
Agmon e Connors (1992)	Rato	<p>RS: trem de disparo simples e evidente acomodação dos disparos, alta frequência dos disparos. RS1: acomodação rápida nos primeiros 50-100ms; RS2: adaptação mais moderada.</p> <p>FS: (Ver Connors, 1982);</p> <p>IB: “clursters” de potenciais de ação com 2-5 espículas, geravam atividade do tipo “tudo ou nada”, propriedades similares a RS.</p>

Chen et al.(1996a, 1996b)	Gato	RS e FS (ver Connors, 1982). DBS (“Doublet-or-bursting firing”): geram descargas com no mínimo duas espículas. A frequência dos disparos mostra um platô inicial de alta frequência seguido por queda abrupta. NS (“ <i>narrow-spiking</i> ”) são semelhantes a FS, porém os disparos são de baixa frequência sem acomodação.
Gottlieb e Keller (1997)	Rato	RS1 : intervalos dos potenciais de ação regulares. Os disparos mostram inicialmente alta-frequência seguida por queda sem haver acomodação dos disparos (40Hz); RS2 : intervalos dos potenciais de ação irregulares. Os disparos mostram inicialmente alta-frequência seguida por acomodação dos disparos.
Williams e Stuart,(1999)	Ratos	RS de acordo com Connors et al, (1982) IB subdividido em WB (<i>do inglês weak bursting</i>) e SB (<i>do inglês strong bursting</i>); WB : um disparo em salva (2-3 espículas) seguido por vários disparos isolados; SB : um disparo em salva (>3 espículas) seguido ou por disparo em salva ou vários disparos isolados.
Hefti e Smith(2000)	Ratos long-Evans hooded	RS1 potenciais de ação isolados com taxa rápida de acomodação. RS2 potenciais de ação isolados com taxa lenta de acomodação. IB descargas em salva seguido por potenciais de ação isolados.
Beggs et al., (2000)	Ratos	RS (Connors et al, 1982 ; Connors e Gutnick, 1990) LS (<i>do inglês “late-spiking”</i>): são caracterizadas pela latência no aparecimento dos potenciais de ação simples em resposta a aplicação de pulsos de correntes despolarizantes.
Degenetais et al. (2002)	Rato	RS foi subdividido em: RSSA (<i>do inglês “slow adaptation”</i>): com adaptação lenta grupos I e II; grupo I, inicialmente alta-frequência seguida e por queda e mantida em torno dos 30Hz até o final; grupo II, inicialmente alta-frequência seguida e por queda até o final; RSFA (<i>do inglês “fast adaptation”</i>): com adaptação rápida . IB foram classificados de acordo com Connors et al,(1982). NIB (“ <i>non-inactivating bursting</i> ”): com variação dos disparos conforme pulso de corrente aplicada, podendo aparecer características RS, ou descargas irregulares ou IB.
Nowak et al., (2003)	Gato	Estudo in vivo, RS -potenciais isolados com acomodação lenta dos potenciais de ação. FS -sem acomodação dos potenciais de ação. IB - descargas em salva seguido ou não por potenciais isolados; CH (<i>do inglês chattering cells</i>) descargas em salva repetidas com curto intervalo.
Tateno et al., (2004)	Rato	Tipo 1 : similar ao RS de Connor et al, 1982 Tipo 2 : similar ao FS de Connor et al, 1982
Cho et al.,(2004)	Rato	IB foram classificados de acordo com Connors et al,(1982). RS, foi subdividido em: RSSA (“slow adaptation”) com adaptação lenta e RSFA (“fast adaptation”): com adaptação rápida IR (Irregular

		Spiking): apresentam disparos simples porém com intervalos irregulares
Contreras, (2004)	Revisão	RS, IB e FS (Connors et al,1982; Connors e Gutnick, 1990) FRB (do ingles: “fast repetitive bursting”) caracteriza-se por apresentar descargas em salva diferentes das IB e não apresentam adaptação dos disparos. LTS (do inglês “low threould spikes”); padrão complexo

A primeira classificação eletrofisiológica detalhada dos neurônios piramidais de CA2-CA4 foi feita por Kandel e Spencer na década de 60 em gatos. Os autores usaram a técnica de registro IC “*in vivo*”, onde os eletrodos de estímulos e registro eram posicionados no hipocampo do animal mediante o procedimento de craniotomia e canulação. Neste trabalho foram registrados neurônios das áreas de CA2-CA4. Foram identificadas duas formas básicas de disparo neuronal: 1) SS (do inglês “*single spikes*”) - potenciais de ação isolados e 2) BS (do inglês “*bursting spikes*”) disparos repetitivos ou em salva (Kandel e Spencer, 1961).

No início dos anos 70 O’ Keefe e Dostrovski mostraram através de técnicas EC *in vivo* a existência de um padrão característico de descarga neuronal em forma de salva de PA no hipocampo (O’Keefe e Dostrovsky, 1971). Este fenômeno estava presente enquanto os animais, no caso ratos, realizavam um teste comportamental específico (Ranck, 1973) . O padrão de disparos era extremamente complexo, formado por diversos PA. Fox e Ranck denominaram estas células geradoras de descargas de células de espícula complexa, sendo abundantes em CA1 do hipocampo (Fox e Ranck, 1981)

Alguns estudos demonstraram que algumas células piramidais de CA1 poderiam disparar em salva em resposta a injeção de corrente no soma (Schwartzkroin, 1975). Posteriormente verificaram que esta resposta era mais

frequente nos neurônios de CA3, os quais respondem em condições normais geralmente em forma de salva com 2-7 espículas. A diferença observada nos neurônios de ambas as áreas reside no fato de que em CA1 a BS endógena no soma era pouco frequente *in vivo* (Feder e Ranck, 1973) e *in vitro* (Schwartzkroin e Prince, 1978; Wong e Prince, 1978). Os autores mostraram ainda que as células hipocâmpais de CA1 possuem um diferencial de disparo de PA a nível dendrítico. O soma, por sua vez, gerava quase absolutamente disparos repetitivos de PA, únicos e isolados. Ao ser estimulado diretamente, as terminações dendríticas apresentavam predisposição para originar BS, que poderiam ser registrados no soma. Os trabalhos de classificação da formação hipocâmpal passaram a adotar a mesma nomenclatura adotada para o córtex cerebral utilizada por Connors e colaboradores (1982).

Jensen e colaboradores (1994) caracterizaram eletrofisiologicamente os neurônios de CA1, em condições normais e em atividade epileptiforme induzida, pelo aumento da concentração de potássio extracelular. Neste trabalho, foram possíveis detectar experimentalmente uma acentuada predisposição para a origem da BS intrínseca somática e este fenômeno estava associado ao aparecimento e manutenção da atividade epileptiforme. A tabela 4 mostra um resumo dos achados de Jensen e colaboradores (1994) e os estudos mais relevantes referentes aos padrões da formação hipocâmpal.

TABELA: 4 Classificação dos padrões de disparo em neurônios da formação hipocampal e outras estruturas Límbicas

Autor	Animal	Características
Kandel e Spencer, 1961	Gatos	Estudo <i>in vivo</i> , CA2-CA4. Heterogeneidade de resposta. Potenciais isolados e Descargas em salva .
Masukawa <i>et al.</i>, (1982), Bilkey e Schwartzkroin,(1990)*	Porco da Índia	Registros nas diferentes áreas do CA1-CA4 e CA3*. Heterogeneidade de resposta. SS (do inglês "single spikes")., BS (bursting spiking).
Jensen <i>et al.</i>, (1994,1996)	Rato	Registros nas diferentes áreas do CA1. RS foram classificados de acordo com Connors et al, (1982). IB : subclassificados em graus I, II e III . Grau I: a aplicação de corrente despolarizante provoca aparecimento de uma atividade BS seguida por disparos simples. Grau II: a aplicação de corrente despolarizante provoca aparecimento de uma atividade BS isolado. Grau III: a aplicação de corrente despolarizante. provoca aparecimento de uma atividade BS repetida
Ali <i>et al.</i>, (1998)	rato	Interneurônios de CA1 com características: RS, IB, FS (classificados de acordo com Connors et al, 1982) e FS R-AHP (do inglês "rounded spikes after hiperpolarization), a hiperpolarização apresenta-se de longa duração e de forma arredondada
Dietrich <i>et al.</i>,(1999)	Tecido Humano	Registros das células granulares do GD Tipo 1 : intervalos curtos entre um potencial e outro, disparos de baixa frequência e pouca acomodação, hiperpolarização pós-potencial predominantemente (AHP) monofásica com fAHP. Padrão comparável aos interneurônios do GD de ratos. Tipo 2 : intervalos longos entre os disparos, forte acomodação dos disparos, AHP evidente e geralmente bifásica
Staff <i>et al.</i>,(2000)	Ratos wistar	Subículum e CA1: Subículum : padrão RS ; de acordo com Connors et al,(1982): WB : um disparo em salva (2-3 espículas) seguido por vários disparos isolados. SB - um disparo em salva (>3 espículas) seguido ou por disparo em salva ou vários disparos isolados CA1 : padrão de CA1 potencial de ação simples e intervalos regulares
Dumont <i>et al.</i>, 2002	Ratos , cobaias e gatos	Núcleo central da amígdala, RS e FS (Connors et al, 1982 ; Connors e Gutnick, 1990). LS (do inglês "late-spiking"): são caracterizadas pela latência no aparecimento dos potenciais de ação simples em resposta a aplicação de pulsos de correntes despolarizantes.LTB (do inglês Low-threshold bursting) neurônios que ora disparam

		potenciais duplos, ora atividade em salva.
Wozny et al.,(2003)	Tecido Humano	Subiculum: RS e IB de acordo com Connors et al,(1982)
Altemus et al.,(2005)	Macaco	Neurônios de CA1 apresentando descargas isoladas ou com atividade em salva .
Knopp et al.,(2005)	Rato	Subiculum: padrão RS ; de acordo com Connors et al,(1982) WB: um disparo em salva (2-3 espículas) seguido por vários disparos isolados SB- um disparo em salva (>3 espículas) seguido ou por disparo em salva ou vários disparos isolados

O conhecimento das características elétricas do neurônio, como entidade, é de suma importância para a compreensão do funcionamento dos circuitos neuronais e conseqüentemente do sistema nervoso.

OBJETIVOS:**GERAL:**

Identificar e comparar os padrões de disparos obtidos a partir da curva da frequência instantânea de CA1 em tecido hipocampal humano, ratos controles e ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina .

Específico:

1. Identificar os padrões de disparo em CA1 de ratos controles, ratos tratados com pilocarpina e tecido hipocampal humano.
 2. Caracterizar os padrões de disparo de acordo com a acomodação dos mesmos, obtido através da curva da frequência instantânea.
 3. Comparar as semelhanças e diferenças entre as propriedades eletrofisiológicas passivas e ativas dos padrões de disparo comuns a ratos e tecido humano.
 4. Comparar as semelhanças e diferenças entre as propriedades eletrofisiológicas passivas e ativas dos padrões de disparo no tecido humano.
 5. Verificar a distribuição dos padrões de disparo nos grupos estudados.
-

MATERIAIS E MÉTODOS:

ÉTICA:

Os protocolos experimentais para a utilização de ratos e tecido humano oriundos da cirurgia foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

GRUPOS DE ESTUDO:

Os grupos de estudo, utilizados aqui, foram distribuídos conforme a tabela abaixo:

<i>GRUPOS DE ESTUDO</i>	
<i>RATOS</i>	<ul style="list-style-type: none">▪ Controles▪ Tratados com pilocarpina
<i>TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO</i>	

Animais Controles e Tratados com Pilocarpina :

Foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar, de 30-35 dias, distribuídos em dois grupos (tabela1). Estes animais apresentavam ciclo claro-escuro de 12 horas, água e comida ad libitum, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A linhagem utilizada não apresentou nenhuma propensão genética a crises convulsivas espontâneas.

No grupo dos ratos tratados com pilocarpina, foi utilizado o modelo de epilepsia descrito por cavalheiro (1991) em 50 animais. O protocolo consiste na administração de metilescopolamina (ms) (1mg/kg) injetada intraperitonealmente, trinta minutos antes da pilocarpina (380 mg/kg), que induz o Status epilepticus (se): o pré-tratamento com metilescopolamina, um antagonista colinérgico que não ultrapassa a barreira hematoencefálica, serviu como atenuador das manifestações periféricas da pilocarpina.

O animal é acometido do status epilepticus (se) logo após a administração da pilocarpina. Essa condição determina a fase aguda, que perdura em média, doze horas até a regressão do quadro de prostração do animal. As manifestações comportamentais (MCS) do se podem ser interrompidas com o uso de benzodiazepínicos ou barbitúricos. O SE mimetiza uma injúria precipitadora inicial, pois, após um período silencioso de quinze dias, o animal é acometido por crises espontâneas recorrentes (CER) com frequência de 2 a 5 vezes por semana. Esta é dita a fase crônica do modelo que perdura por vários meses, presumivelmente por toda a vida do animal (Cavalheiro et al., 1991) (figura 5). Mesmo não sendo observadas durante a fase do período silencioso, embora não sejam observadas as mcs durante o período silencioso a atividade eletroencefalografica pode ser verificada neste período (Arida et al, 1999)

Com a administração da pilocarpina foram observadas modificações comportamentais das primeiras manifestações da crise. Os animais apresentaram acinesia, ereção do pelo, automatismos orofaciais e de extremidades; tremores e clonias nas 4 patas, elevação das patas dianteiras e

queda, estes comportamentos límbicos foram medidos mediante a utilização da escala de Racine (tabela 2) (Racine, 1972). Além disso, os animais apresentaram salivação, incontinência urinária. Considerou-se, como critério de SE, a persistência de crises contínuas por no mínimo trinta minutos (Cavalheiro *et al*, 1991, Mello 1993). Noventa minutos após a instalação do SE, injetou-se 4 mg/kg de diazepam (valium) intraperitonealmente para atenuar a crise (Mello 1993). Os animais ainda receberam uma dose de soro fisiológico e nos dois dias seguintes adicionou-se na dieta alimentar banana esmagada para a reposição do potássio.

Tabela 2: Parâmetros comportamentais medidos durante o *status epilepticus*;

ESCALA DE RACINE
0- Imobilidade
1- Automatismos Faciais
2- Mioclonias da cabeça e pescoço
3- Clonias de patas anteriores
4- Clonias de patas posteriores
5- Elevação e Queda

No caso dos **ratos controles**, os procedimentos utilizados foram semelhantes aos realizados com os animais tratados, excetuando-se pela aplicação de solução salina em substituição da pilocarpina. Outra observação importante é o fato dos animais não apresentarem crises espontâneas recorrentes (Figura 5).

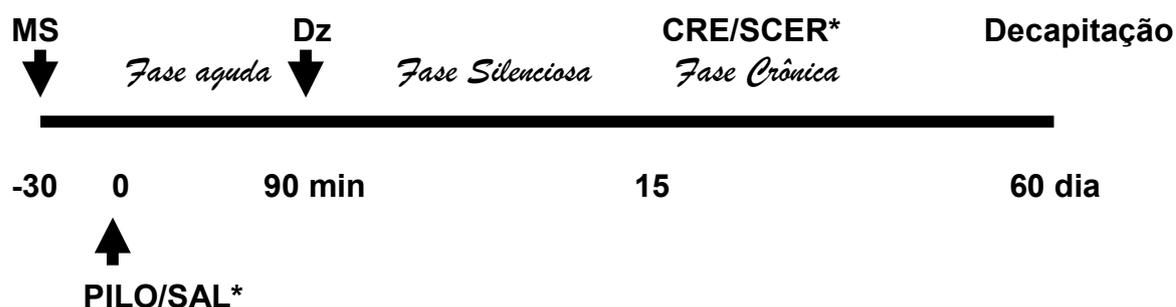


FIGURA 5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO MODELO DA PILOCARPINA .E DO GRUPO CONTROLE: MS- Metil Escopolamina, DZ- Diazepam, Pilo- Pilocarpina; CER- Crises Espontâneas Recorrentes. No caso dos animais controles (*): SAL- solução salina, SCER- sem crises espontâneas recorrentes

Dos 50 ratos injetados apenas 3 morreram no decorrer do experimento e 6 não evoluíram para o SE sendo excluídos do presente estudo. Durante este período, os animais permaneceram no alojamento de animais do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Decorridos 2 meses, período em que se verificou através de observações comportamentais o surgimento de manifestações de CER , os animais foram mortos para o estudo eletrofisiológico através da técnica de fatias de hipocampo.

TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

Os fragmentos de tecido foram obtidos de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, cuja investigação, no Programa de Cirurgia da Epilepsia do Hospital São Lucas da PUCRS, demonstrou origem

temporal das crises. Estes pacientes foram selecionados no Programa de Cirurgia da Epilepsia para avaliação de candidatos à cirurgia, sendo todos portadores de epilepsia com refratariedade ao tratamento medicamentoso.

A refratariedade é estabelecida pela comprovação da persistência das crises ou de efeitos colaterais intoleráveis após o uso de, no mínimo, 3 antiepilépticos em dose máxima tolerada por pelo menos 2 anos de epilepsia, exceto nas epilepsias catastróficas da infância, quando é necessária a comprovação da deterioração do desenvolvimento psicomotor independente da duração da epilepsia.

O processo de avaliação pré-cirúrgica incluiu os procedimentos padronizados no serviço de neurologia do Hospital São Lucas da PUCRS e que estão de acordo com as normas preconizadas pelo Ministério da Saúde e Comissão de Cirurgia de Epilepsia da Liga Brasileira de Epilepsia (de Paola et al, 2001). A indicação cirúrgica seguiu critérios como: a área de origem dos estímulos epileptogênicos deve ser localizada e unilateral, e deve permitir a ressecção sem causar danos neurológicos importantes, as epilepsias do lobo temporal são as que mais frequentemente preenchem estes critérios. É fundamental esta avaliação para determinar se a área afetada pode ser retirada adequadamente. Para isto existe um protocolo mínimo de avaliação que inclui de acordo com a Comissão de Cirurgia de Epilepsia da Liga Brasileira de Epilepsia (de Paola et al, 2001): 1) EEG monitorizado por vídeo por no mínimo 24 horas com registro inequívoco de pelo menos 1 crise epiléptica habitual 2) ressonância magnética encefálica, 3) testes neuropsicológicos

OBTENÇÃO DAS FATIAS CEREBRAIS

Ratos Controles e Tratados com Pilocarpina

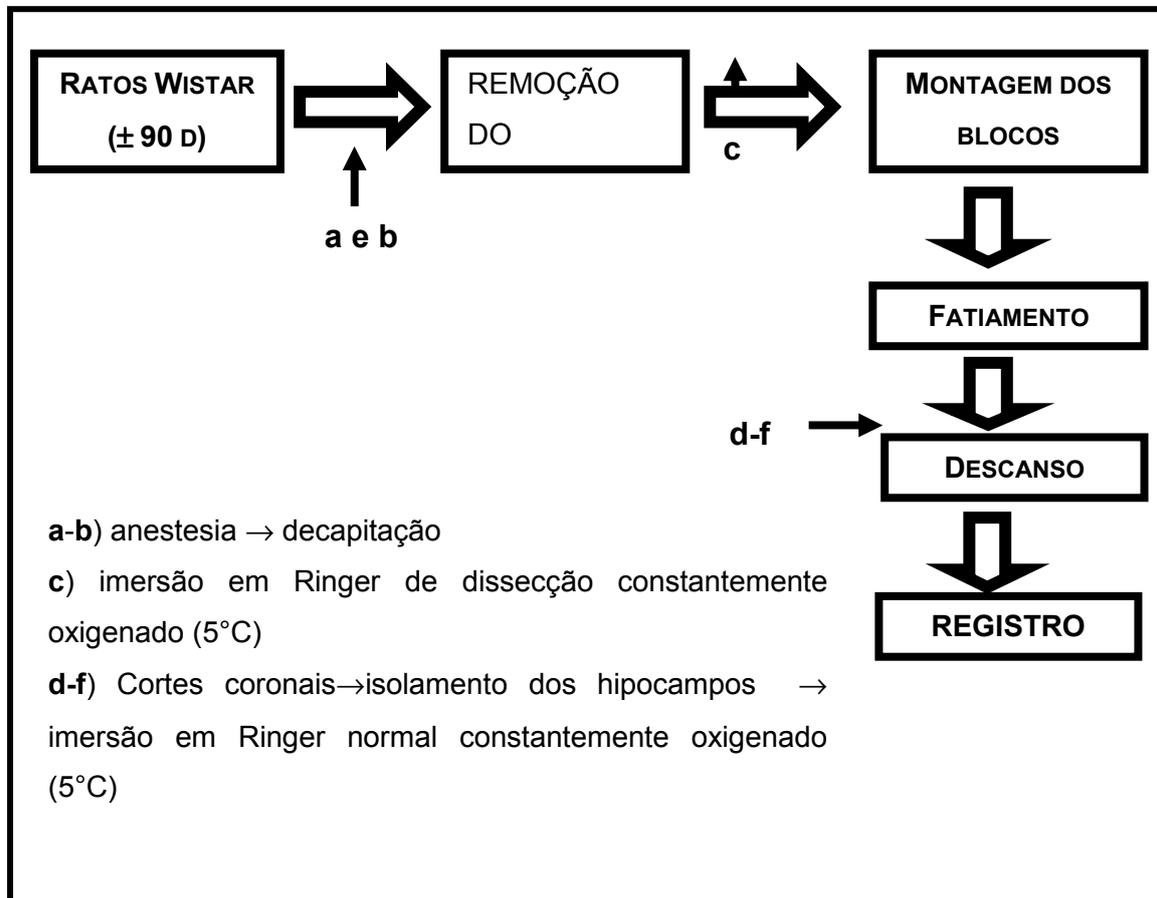
A figura 6 mostra um esquema das principais etapas deste procedimento. Os animais foram pesados, anestesiados com Tiopental (40 mg por Kg) e imediatamente decapitados com uma guilhotina. Após a decapitação foi feita a craniotomia para a remoção do encéfalo. Este procedimento não ultrapassou 3 minutos para que o mesmo não sofresse hipóxia/ isquemia.

Com auxílio de uma pinça, os ossos parietais foram afastados a partir da sutura sagital e o encéfalo foi removido utilizando-se de uma espátula curva. O encéfalo foi então imerso numa solução Ringer de dissecação mantida sob temperaturas de 4°C, sob constante oxigenação por aproximadamente 20 segundos para aumentar a consistência do tecido, tornando-o mais apto ao corte.

As fatias de 400µm, sentido coronal, foram obtidas a partir da montagem de blocos com o cérebro e o fatiamento foi feito utilizando-se de vibrátomo (Campden Instruments, EUA- modelo Vibroslice 752M) conforme Tavares et al, (2002) (Fig.7).

Uma vez que o presente estudo visa uma abordagem dos padrões eletrofisiológicos de hipocampus de ratos com os de seres humanos tomou-se o cuidado de deixá-los em condições semelhantes. No caso do tecido humano têm-se as perdas das aferências pela própria ressecção cirúrgica. Conseqüentemente os hipocampus de ratos foram isolados do restante da fatia e imersas no Ringer normal em temperatura ambiente sob constante

oxigenação permanecendo por 1 hora descansando Decorrido este período o material foi levado à câmara de incubação para os registros eletrofisiológicos.



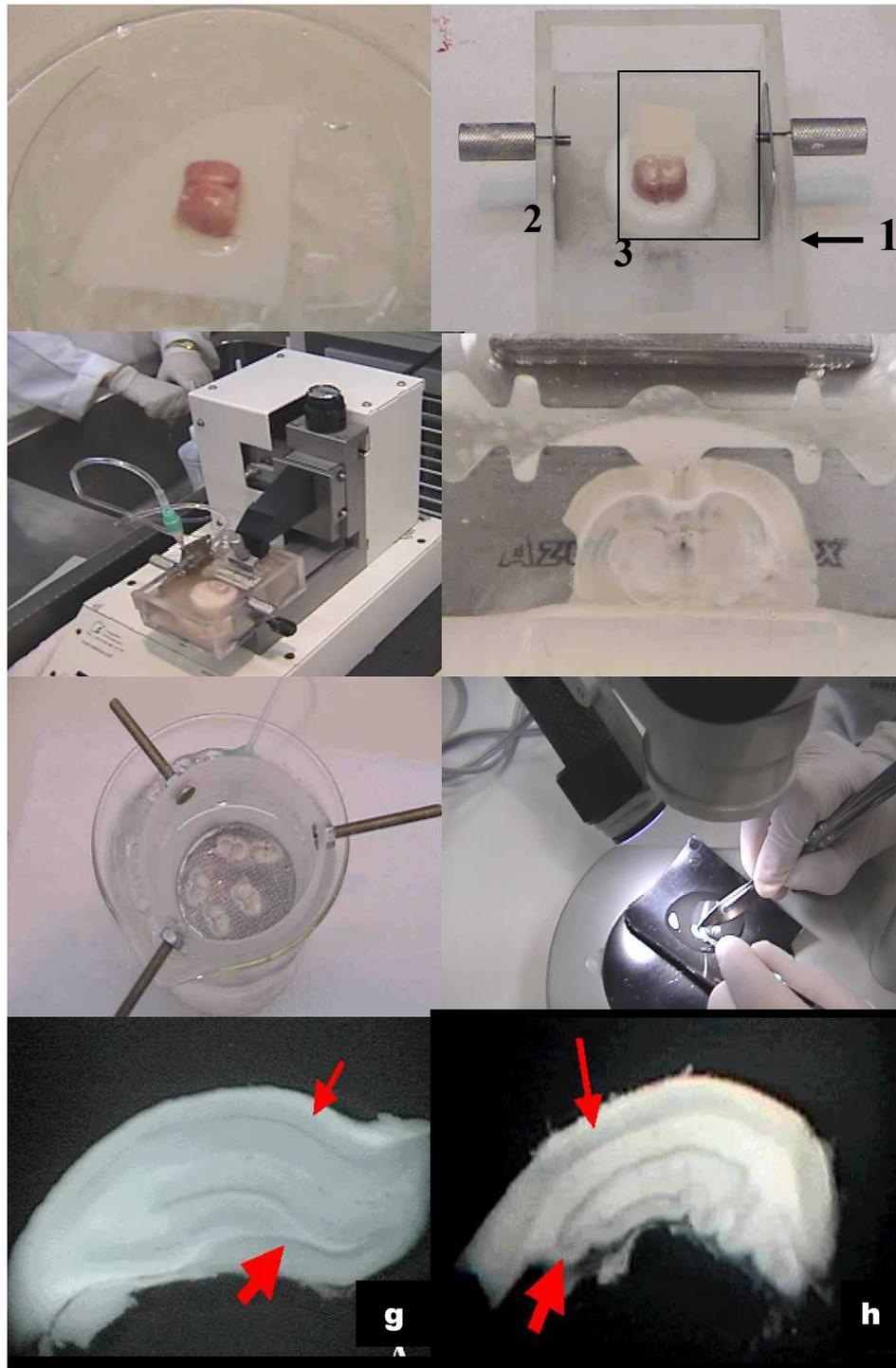


FIGURA 7. OBTENÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS DE RATOS. a) encéfalo recém removido, visto dorsalmente. b) Montagem da cuba de fatiamento: 1-cuba; 2-suporte 3) Bloco com o encéfalo c) Aspecto geral do vibrátomo já com a cuba posicionada. d) Detalhe do fatiamento e) Fatias incubadas com Ringer Normal. f) Isolamento dos hipocampus sob microscópio estereoscópico. g) e h) Fatia do hipocampo de rato controle e tratado com pilocarpina. As setas finas das figuras g e h representam à área de CA1, as setas grossas, o giro denteadado.

Obtenção do Tecido Hipocampal Humano:

Antes do recebimento do tecido foram registrados os dados clínicos dos pacientes. Estas informações foram digitadas em um banco de dados, incluem:

1. IDENTIFICAÇÃO (INICIAIS DO PACIENTE, NÚMERO DO PRONTUÁRIO MÉDICO, DATA DA CIRURGIA)
2. IDADE/SEXO
3. TIPO DE CIRURGIA
4. TEMPO DE ISQUEMIA: TEMPO QUE LEVA Á ABLAÇÃO DO TECIDO
5. TEMPO DE EPILEPSIA
6. TIPO E FREQUÊNCIA DAS CRISES EPILÉPTICAS
7. RESULTADOS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
8. FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS EM USO
9. HIPOCAMPO ESTUDADO:
10. NÚMERO DE CÉLULAS ESTUDADAS

Foram adotados dois procedimentos cirúrgicos para o tratamento da ELT: amigdaló-hipocampectomia seletiva (AH) e a lobectomia temporal anterior (LTA). A LTA foi realizada utilizando a técnica de Spencer. Para a AH foi utilizada a abordagem transcortical transventricular expondo o hipocampo e amígdala (figura 8a). Esta técnica foi empregada originalmente por Niemeyer (Niemeyer, 1959) e modificada para a obtenção de peças viáveis para estudo *in vitro*.

A amígdala e a cabeça do hipocampo foram aspirados e a retirada do hipocampo foi em bloco (sentido póstero–anterior) A vascularização do hipocampo foi preservada ao máximo com o intuito de viabilizar o estudo *in vitro*. Durante a retirada do bloco hipocampal foi importante o sulco hipocampal (Figura 8) e de uma pequena porção da eminência colateral foram

preservados, pois fornecem um referencial anatômico para a realização dos cortes coronais, sendo imprescindíveis para a identificação do campo CA1 (Dr. Ney Azambuja-neurocirurgião-, conv pessoal).

Imediatamente após a ablação, no próprio bloco cirúrgico, o hipocampo foi seccionado em sentido coronal para a obtenção de um fragmento para exame anátomo patológico. A peça principal (figuras 8b e 9a) foi inicialmente imersa em Ringer de dissecação continuamente oxigenado*.

Após a identificação do sulco e eminência colateral (figura 9 a) o hipocampo foi fixado, com metacrilato, num bloco para adaptação no vibrátomo (figura 9b-d), onde será seccionado em fatias coronais com 500 um de espessura (figura 9 d). As fatias assim obtidas serão imersas em solução de Ringer normal resfriado e oxigenado e imediatamente transportados ao laboratório com auxílio de um carrinho adaptado para os procedimentos (figura 9e).

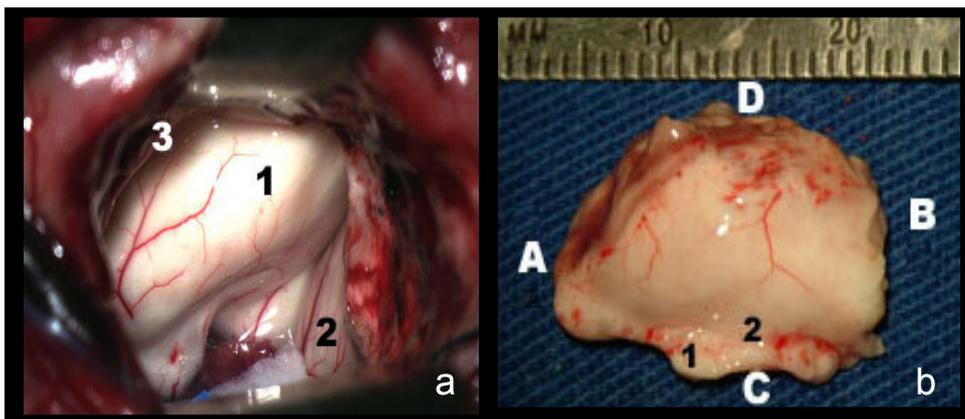


FIGURA 8 - HIPOCAMPO ESQUERDO ANTES (A) E DEPOIS (B) DA RESSECÇÃO CIRÚRGICA. **a)** visão cirúrgica do lobo temporal: hipocampo (1); amígdala ;(2) e sulco colateral (3). **b)** Bloco hipocampal esquerdo ,vista cranial : posterior (A); anterior (B), lateral (C), mesial (D), Eminência colateral (1) Sulco colateral (2)

Após período de incubação de aproximadamente 1 hora, as fatias foram levadas, uma a uma, para a câmara de registro. Nesta câmara as fatias perfundidas em solução de Ringer Normal continuamente oxigenado com controle de pH mantido em 7,4 e aquecidas a uma temperatura de 34°C. Examinadas com microscópio estereoscópico identificaremos o campo CA1 onde serão colocados os eletrodos para registro intracelular (figura 9 f).

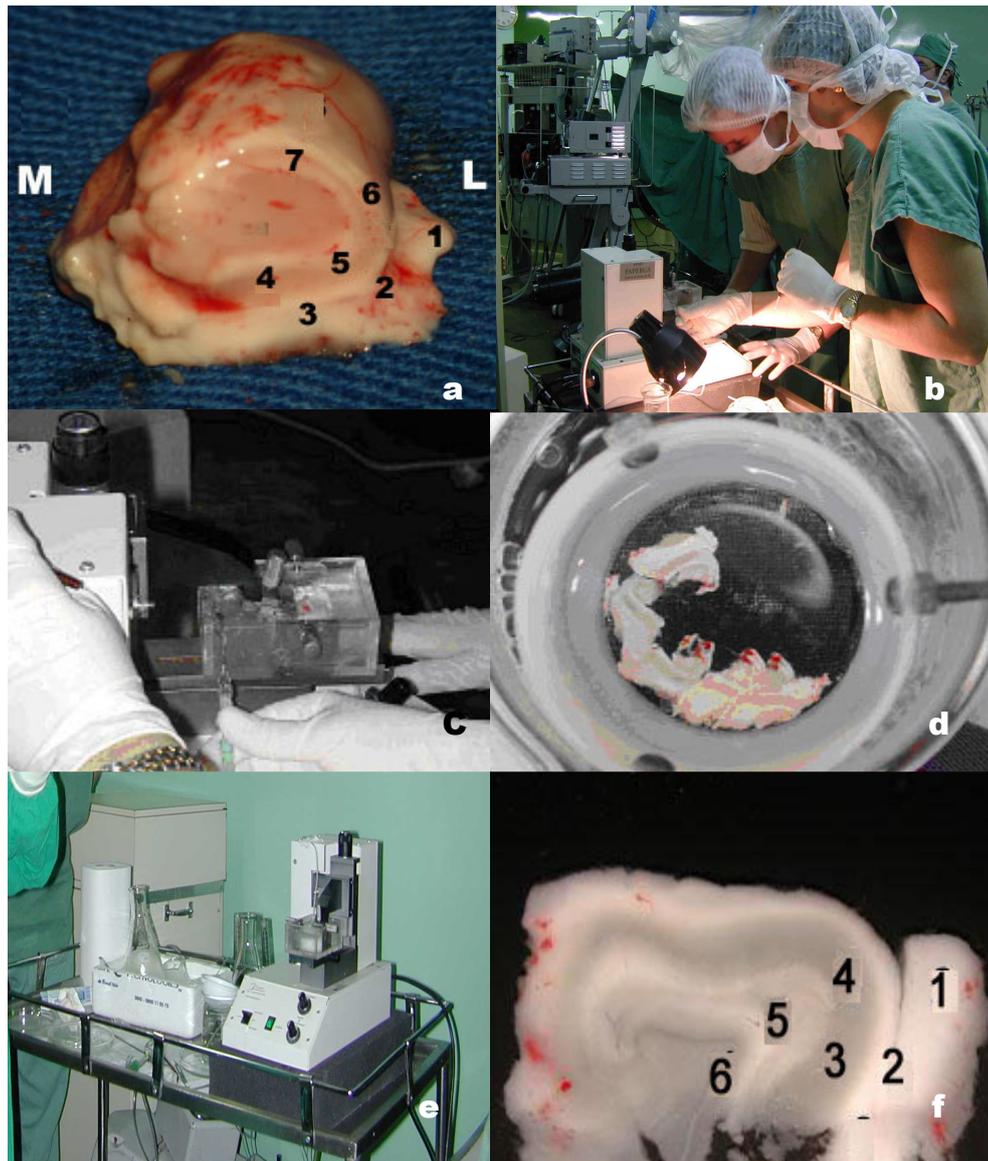


FIGURA 9- SEQÜÊNCIA DE PROCEDIMENTOS DA OBTENÇÃO DAS FATIAS ATÉ A IDENTIFICAÇÃO DA ÁREA DE CA1. **a)** Bloco hipocampal esquerdo, vista anterior, secção coronal, lateral (L), mesial (M), Eminência colateral (1); Sulco colateral (2), Alveus (3). Parahipocampo (4) Subículo (5), Área de CA1 (6) e Giro denteado (7) **b)** procedimento de fatiamento no bloco cirúrgico; **c)** fatiamento em detalhe; **d)** Incubação das fatias em Ringer Normal; **e)** Carrinho adaptado para o procedimento no bloco cirúrgico **F)** Fatia de hipocampo humano esquerdo - secção coronal vista anterior: Eminência colateral (1), sulco colateral (2), Subiculum (3). CA1 (4) Lâmina medular (5); Giro dentado (6)

MEIOS DE PESFUSÃO:

A solução salina de Ringer também é referida na literatura como líquido cefalorraquidiano artificial (Henderson, 1984). Duas espécies de Ringer foram utilizadas neste estudo: o Ringer normal, em temperatura ambiente, que era empregado para o descanso das fatias no momento pré-registro, e o de dissecação, a 4° C, utilizado no processo de obtenção das fatias.

- a) **Ringer para dissecação** (em mM): NaCl- 124; KCl- 2; KH₂PO₄ - 1.25; MgCl₂ -10; CaCl₂- 0.2; NaHCO₃- 26; D-Glicose- 10, em pH de 7.4
 - b) **Ringer normal** (em mM): NaCl- 124; KCl- 2; KH₂PO₄ - 1.25; 2 MgCl₂, 2 , CaCl₂ -2, NaHCO₃- 26; D-Glicose- 10, em pH de 7.4.
-

REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS

Equipamentos Utilizados (figura 10):

O equipamento de registro e estimulação é composto por: uma gaiola de Faraday, para isolar o equipamento na interferência no sinal; câmara de interface para perfusão e registro, um pré-amplificador diferencial headstage (Axon Instruments), um gerador de pulso programável Master 8 (A.M.P.I), um condicionador de sinais CyberAmp 320 e um fixador de corrente AxoClamp 2B (ambos da *Axon Instruments*), um microcomputador (PC) para monitoramento e armazenamento dos registros, onde se utilizou como software para registro e mensuração das propriedades eletrofisiológicas e padrões de descarga o AxoScope 1.1 (*Axon Instruments*) e para construção dos gráficos, o *Origin 5.0* e (*Microcal™ Software, Inc.*)

Os registros dos potenciais intracelulares foram realizados com microeletrodos de vidro (micropipetas) construídos de tubos capilares de vidro de boro silicato (*WPI Inc*) com diâmetro externo de 1,5 mm e interno de 0,86 mm. Estes foram distendidos com o auxílio de um estirador de pipetas (*pipette puller Sutter*) preenchido com acetato de potássio 3 M (Avoli, 1989), mantendo-se a resistência DC entre 70-180 M Ω (Tavares *et al*, 2002).

Protocolo de registro Intracelular por clampeamento de Corrente :

Durante o registro IC, a micropipeta foi posicionada verticalmente a fatia do hipocampo e com auxílio de um micromanipulador (*WPI INC*), buscou-se a

penetração de uma célula-alvo da área de CA1, utilizando um processo de descida da micropipeta de 4 em 4 μm . Foram passados pulsos retangulares de 200 ms de corrente (-0,2 nA) aplicados em intervalos de 1 segundo através da pipeta de registro. Com isto o sinal eletrofisiológico foi constantemente monitorado tanto com o osciloscópio quanto com o monitor do PC, via “software” Axo Scope 1.1.

Para introduzir o microeletrodo no interior da célula foram feitas pequenas vibrações no mesmo, a medida em que se descia com o micropipeta. Estas vibrações foram realizadas com auxílio de um circuito elétrico do amplificador Axoclamp 2 B –(Axon instrument, INC) acoplado a micropipeta, denominado “Buzz”. Ao penetrar na célula, observou-se uma descida brusca no potencial elétrico (V_m) a valores do potencial de membrana (PM) da célula em questão. A seguir passou-se um pulso hiperpolarizante, durante 5 min para que houvesse a aderência da célula à micropipeta, minimizando a eventual perda de líquidos/íons intracelulares. Durante os registros foram aplicados pulsos hiperpolarizantes e despolarizantes para avaliar os parâmetros eletrofisiológicos (ver página 45)

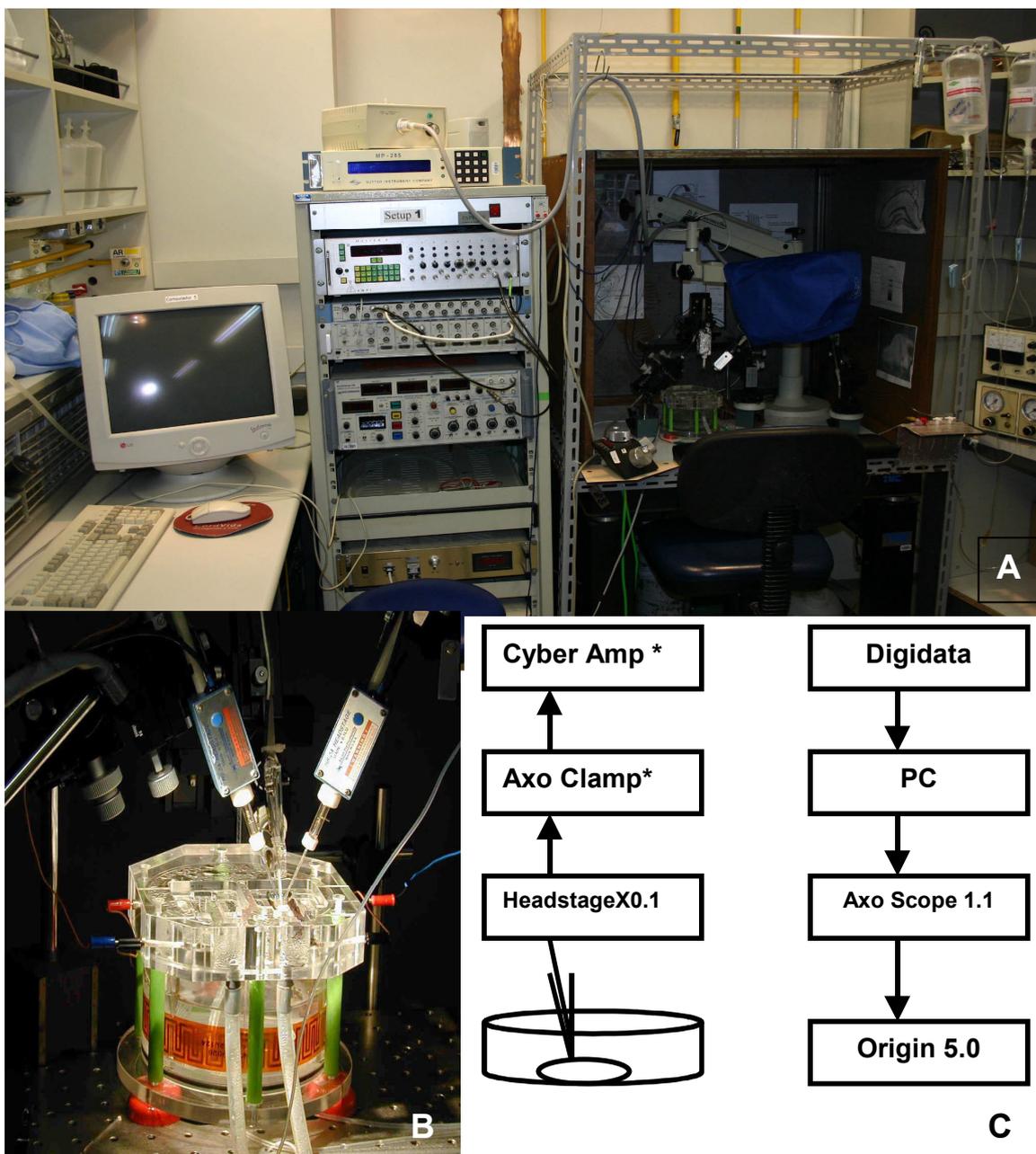


FIGURA 10- EQUIPAMENTO DE REGISTRO INTRACELULAR. **A)** aspecto geral do equipamento- microcomputador (1), equipamentos (de cima para baixo): master 8, Cyber Ump, Digidata e AxoClamp,(2); gaiola de Faraday (3) **B)** câmara de registro, no interior da gaiola de Faraday em detalhes,. a câmara de registro de interface (1); micropipeta (2); pré-amplificador (headstage 1x) (3) micromanipulador (4) **C)** **Esquema da obtenção do registro intracelular.** Uma micropipeta (→) foi posicionada na camada CA1 de hipocampo de ratos e tecido hipocampal humano. Ao “empalar” o neurônio, o sinal é captado, amplificado (*) e enviado a um microcomputador (PC) para serem registrados e também analisados com auxílio dos softwares AxoScope 1.1 e Origin 5.0.

PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS MENSURADOS:

1. Potencial de membrana (PM): Ele foi determinado 5 minutos após a penetração da célula; no presente estudo consideramos o valor observado 10 minutos após a penetração do neurônio
 2. Resistência de entrada (IR - inglês "*input resistance*"): Esse valor indica basicamente a resistência da membrana plasmática (MP). Aplicou-se ao neurônio pulsos de correntes hiperpolarizantes iniciadas em -0,7 até 0 nA e com 200 ms de duração (Figura 11).
 3. Constante de Tempo (TC- do inglês "*time constant*"): É a variação de como a variação do Pm é diminuída pela capacitância da MP. Após injetar um pulso retangular o tempo necessário para que seja atingido 63% da voltagem inicial é definida como a constante de tempo. Para este cálculo utilizamos a média de 3 medidas da τ_m (Figura 11)..
 4. Presença da corrente de hiperpolarização ativada por cátion (SAG): Aplicação de correntes hiperpolarizantes (-0,3→-0,7 nA) para a verificação de presença ou ausência (Figura 11). .
 5. Corrente injetada para o primeiro potencial de ação (ICAP):
 6. Limiar do primeiro potencial de ação (LIM) foi determinado no ponto a da (Figura 11)
 7. Amplitude primeiro potencial de ação (AMP) foi determinado no ponto (a-b) da (Figura 11).
 8. Presença e amplitude da hiperpolarização pós-potencial rápida (fAHP- do inglês "*fast after hiperpolarization potential*"): potencial de repolarização rápida (c) (Figura 11).
-

9. Presença de despolarização pós-potencial (DAP) (Figura 11).

10. Presença de hiperpolarização pós-potencial média (mAHP- do inglês “*mediun after hiperpolarization potential*”). (Figura 11).

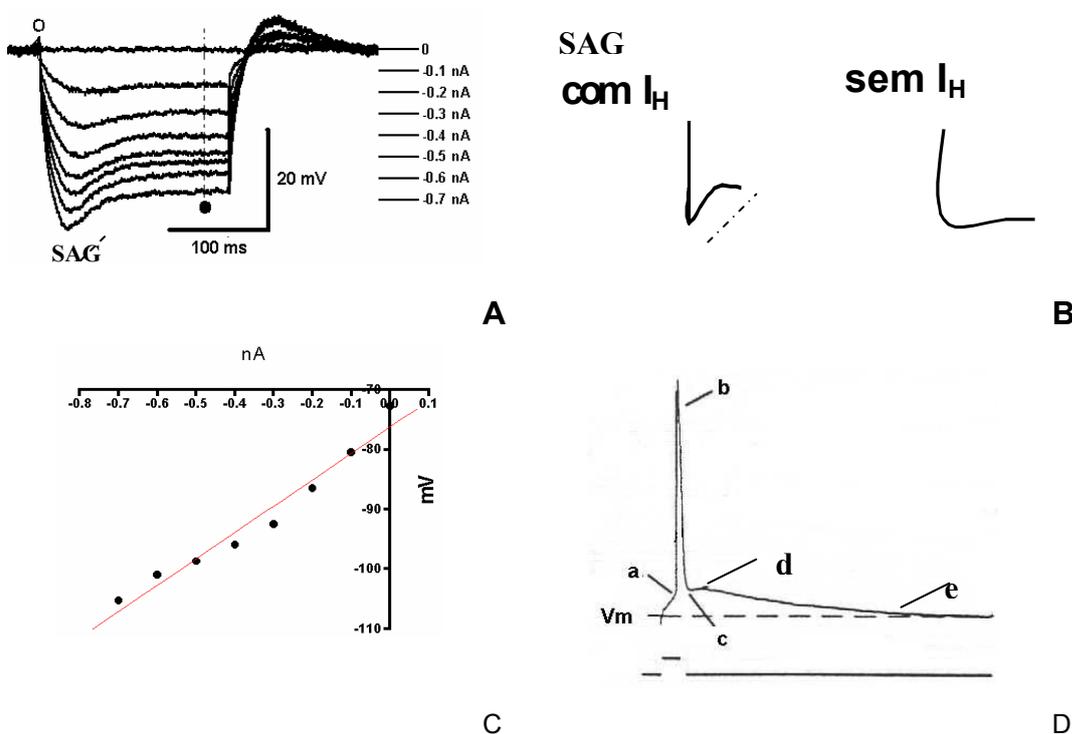


Figura 11: **Parâmetros eletrofisiológicos Mensurados:** A) Representa o tempo de registro utilizado para o cálculo da resistência de entrada (IR), em “(o) representa o artefato de estimulação e (•) representa o tempo de registro usado para o cálculo da IR. Esse ponto encontrou-se na parte final do registro, onde aparentemente não há correntes iônicas ativadas e geralmente localizou-se após 180 ms do início dos pulsos hiperpolarizantes. Nos ms iniciais podem aparecer uma pequena onda SAG (do inglês “*transient hiperpolarizing*” SAG), que é provocada pela ativação da I_H . Em B) presença ou ausência de I_H . Em C) os valores da voltagem da membrana medido no A-b, em cada um dos registros foram plotados contra o valor da corrente injetada. A função resultante foi submetida a análise de regressão linear para o cálculo da IR. Em D características medidas do primeiro potencial de ação (ver texto).

Análise dos Padrões de Disparo Neuronal:

Os padrões de disparo em tecido cortical cerebral foram bem explorados ao longo dos anos (tabela 3 da introdução) e ainda não há um consenso quanto a melhor classificação dos mesmos. Embora exista discrepância, os trabalhos de Connors et al (1985, 1990) ainda são os mais utilizados. Estes trabalhos ao lado de Silva et al (1991) e Yang et al. (1996) revelaram a existência de 4 padrões básicos: neurônios com potenciais de ação com intervalos regulares (RS- do inglês *regular spiking*); intervalos curtos (FS- do inglês *fast spiking*), descargas em salva isoladas (IB- do inglês *intrinsic bursting*) e atividade em salva oscilatória com (ROB- do inglês *repetitive oscillatory bursting*), já descrito detalhadamente na introdução e sumarizado na tabela abaixo

Sumario das características dos padrões de disparo neuronal corticais

Autor	Descrição
Connors et al, 1982; McCormick et al, 1985	RS: a maioria das células estudadas, trem de disparo simples e evidente acomodação dos disparos, alta frequência dos disparos
Silva et al (1991); Yang et al (1996)	FS: intervalos dos disparos com curta duração, sem acomodação dos disparos e estes com alta frequência. IB: “clusters” de potenciais de ação com 2-5 espículas, geravam atividade do tipo “tudo ou nada”, ROB: Similar a IB, descarga em salva seguido novamente por uma atividade em salva ou disparos simples

Critérios para a classificação dos Padrões de disparo:

Durante os registros, foram aplicados pulsos quadrados (200 ms) despolarizantes crescentes (mínimo 0,2 na) até que fossem obtidos o número máximo de potenciais de ação, sem prejuízo da amplitude dos mesmos (1,2 na). foi estabelecido que com 0.8nA, tínhamos um bom número de potenciais e uma amplitude satisfatória. Em nosso estudo, utilizamos a nomenclatura a partir dos trabalhos realizados em córtex de roedores por Connors *et al* (1982); Silva *et al* (1991) e Yang *et al* (1996). Adotamos os seguintes critérios para classificar os padrões de descarga neuronal:

1. Quanto a presença ou ausência de descargas em salva:

- a. Na presença de descargas em salva os neurônios foram agrupados como IB ou ROB.

Na presença de descargas em salva isoladas, os neurônios foram agrupados como IB.

Na presença de descargas em salva seguida por potenciais de ação isolados ou mesmo em salva estes neurônios foram agrupados como ROB.

- b. Na ausência da atividade em salva os neurônios foram agrupados como RS ou FS.

2. FREQUÊNCIA INSTANTÂNEA E ACOMODAÇÃO DOS DISPAROS:

A frequência é uma das estratégias utilizadas no estudo de codificar os dos potenciais de ação dentro do sistema neural, uma das suas variantes é a

freqüência instantânea (FI). Esta pode ser definida como $FI=1/\text{intervalo dos potenciais de ação}$ (Ianzky et al, 2004).

Neste estudo, a freqüência de acomodação (ou freqüência instantânea de equilíbrio) foi obtida a partir da média dos últimos 3 intervalos, onde a freqüência instantânea atinge valores mínimos. Além disso observamos o comportamento temporal que leva à acomodação e para isto a curva de freqüência instantânea (FI) em função do tempo (ms) foi necessária. Para avaliar este comportamento mensuramos o instante de tempo onde a freqüência atinge os valores mínimos, isto é a acomodação e a freqüência de acomodação. Para que um neurônio apresente acomodação dos potenciais a freqüência inicial foi > 80 Hz e o de acomodação < 50 Hz, conforme descrição abaixo.

A curva FI foi possível através da utilização do software ORIGIN 5.0 (Microcal INC) aplicando a seguinte fórmula:

$$FI = 1000 / \text{diff}(\text{col}(pkx)).$$

Onde, 1000= fator de conversão; $\text{diff}(\text{col}(pkx)) = \text{cálculo dos intervalos}$.

TÉCNICA DE MARCAÇÃO INTRACELULAR COM BIOCITINA

A biocitina é um composto de baixo peso molecular derivado da biotina (vitamina H), que permite a visualização morfológica de neurônios após a sua injeção intracelular (Horikawa e Armstrong, 1988). Esse tipo de informação morfológica complementa o registro eletrofisiológico intracelular com o mesmo eletrodo com a biocitina.

A biocitina (1%), foi adicionada a micropipeta de registro intracelular com acetato de potássio (1M). durante o registro, foram aplicados pulsos quadrados (200 ms) hiperpolarizantes e despolarizantes (-0,7 → 1na) durante 10 minutos. as fatias foram fixadas em paraformaldeído 4% , por 1 hora e pós-fixadas com o pós-fixador (tampão fosfato e sacarose 30%) por mais 8 horas.

No caso do material humano, foram realizados dois procedimentos para a obtenção de cortes de (200 μm) que posteriormente foram revelados:

1. Corte em criostato: as fatias hipocampais imersas em sacarose 30% foram congeladas, em isopentano líquido, e cortadas em criostato a uma temperatura de -20° C. As fatias de 200 μm eram então transferidas para uma placa de cultura de 6 poços contendo tampão fosfato (1M) para a realização do procedimento de revelação descrito posteriormente.
2. Corte em agarose: As fatias hipocampais, imersas em sacarose 30% foram colocadas em uma placa de petri contendo um gel de agarose (4%). Esperou-se a solidificação da mesma e a seguir foram cortados pequenos blocos de agarose + tecido. O material foi então cortado no vibroslice (Figura 7)

Neste procedimento com o corte em agarose, obtivemos melhores resultados. Os cortes obtidos foram colocados em tampão fosfato, durante 30 minutos, lavados com uma solução de tampão fosfato (1M) e Triton X100, durante 15 minutos. A seguir o material foi pré-incubado com uma solução contendo complexo avidina-biotina peroxidase (*ABC vector*), durante 2 horas e

30 minutos. Decorrido este período material foi lavado três vezes com tampão fosfato e incubado com o cromógeno 3-3' diaminobenzidina (DAB, 0,05%) durante 15 minutos. A reação só foi concluída após a adição de peróxido de hidrogênio (1%) em tampão fosfato (1M) durante 3 minutos. Foram realizadas novas lavagens com tampão fosfato. Os cortes foram colocados em lâminas histológicas, realizados os procedimentos de desidratação padrão em histologia. A localização do neurônio marcado foi realizada com microscopia óptica. A imagem dos neurônios foram capturadas com uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio Nikon (Eclipse E600). As imagens foram digitalizadas com o software *IMAGE PRO-PLUS 4.1*.

Além disso, utilizou-se uma câmara clara Nikon para desenhar os neurônios marcados.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

ANÁLISE QUANTITATIVA

Avaliação comparativa dos padrões de disparo tecido hipocampal humano isolado

O teste estatístico utilizado foi a análise de variância fatorial com um fator (ANOVA 1 via) para detectar as diferenças entre as propriedades elétricas dos padrões de disparo do grupo (tecido humano). Os parâmetros analisados foram: ICAP, IR, PM, TC, LIM, AMP, DUR. O fator em estudo foi Grupo com 1 nível (tecido humano) e Padrão com 8 níveis (1-IB; 2-FROB; 3-SROB; 4-WROB; 5-FRS e 6-SRS, 7-LRS e 8-FS).

Comparativa entre os grupos de estudo

A análise estatística usada para detectar diferenças entre as propriedades elétricas dos padrões de disparo entre os grupos (ratos e tecido humano) foi análise de variância com dois fatores (ANOVA 2 vias). Os parâmetros analisados foram: potencial de membrana (PM); resistência de entrada (IR), constante de tempo (TC); limiar do 1° potencial de ação (LIM); amplitude do 1° potencial de ação (AMP), duração do 1° potencial de ação (DUR). Os fatores em estudo são Grupo com 3 níveis (1-Rato Controle; 2-Rato Tratado e 3-Tecido Hipocampal Humano) e Padrão com 5 níveis (1-IB; 2-FROB; 3-SROB; 4-FRS e 5-SRS).

Ponderação entre as variáveis:

Em algumas variáveis houve heterogeneidade de variâncias, para resolver o problema, os dados foram transformados através do método de mínimos quadrados ponderados, cuja variância dos grupos de tratamentos entrou na composição da ponderação.

ANÁLISE QUALITATIVA:

Na análise das variáveis qualitativas foi aplicado teste de associação quanto a presença (ou ausência) de uma característica em relação ao padrão observados no tecido hipocampal humano. Os parâmetros avaliados foram: a presença da onda despolarizante ativada durante a aplicação de pulsos hiperpolarizantes (SAG), hiperpolarização pós-potencial rápida (F AHP), hiperpolarização pós-potencial média (M AHP) e despolarização pós-potencial

(DAP). O teste utilizado nesta análise foi o Qui-quadrado (χ^2) de Associação, especificamente o teste exato de Fisher unilateral com $P < 0.05$. A associação entre a presença (ou ausência) da propriedade com o padrão em questão foi determinada a partir de combinações.

Nas análises, quantitativas e qualitativas, o nível de significância para as análises quantitativas: $p < 0.05$ ($\alpha: 5\%$)

Softwares Estatísticos: SPSS, SAS e Prisma

RESULTADOS

Um estudo sistemático das propriedades elétricas foi necessário para identificar e caracterizar os diferentes padrões de disparo neuronal em CA1 dos diferentes grupos. Foram incluídos somente neurônios que apresentavam potenciais de membrana mais negativos do que -50mV potenciais de ação com amplitudes superiores a 50 mV .

Dessa forma, os resultados desse estudo foram divididos em 3 partes:

PARTE I *IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE DISPARO OBSERVADOS EM RATOS CONTROLES, RATOS TRATADOS E TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO: CARACTERÍSTICAS GERAIS E ACOMODAÇÃO NEURONAL*

PARTE II PROPRIEDADES ELÉTRICAS DOS PADRÕES DE DISPARO OBSERVADOS DO TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

PARTE III ESTUDO COMPARATIVO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS PASSIVAS ENTRE OS PADRÕES DE DISPARO COMUNS OBSERVADOS EM RATOS E TECIDO HUMANO.

PARTE I: PADRÕES DE DISPARO OBSERVADOS EM RATOS CONTROLES, RATOS TRATADOS COM PILOCARPINA E TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

Os padrões de disparo dos neurônios de CA1 foram classificados em 4 categorias baseados nos padrões de disparo observados nos neurônios corticais (Connors *et al.*, 1990, Silva *et al.* 1991, Yang *et al.*, 1996): potenciais de ação com intervalos regulares- RS (do inglês “*regular-spiking*”); intervalos curtos- FS (do inglês “*fast-spiking*”), potenciais de ação em salva sem potencial de ação isolado após esta atividade- IB (do inglês “*intrinsic bursting*”) e oscilação entre potenciais de ação em salva e simples- ROB (do inglês “*repetitive oscillatory bursting*”). A atividade em salva foi caracterizada pela presença de vários potenciais de ação que emergem de um platô despolarizante (Kandel e Spencer, 1961). As abreviaturas que utilizamos, no presente estudo, foram as mesmas da terminologia em inglês.

Neste estudo não buscamos caracterizar a natureza destas atividades e sim descrever as características de disparo neuronal numa situação mais próxima da fisiológica, onde a única manipulação com o neurônio foi a aplicação de correntes sub e supralimíares.

RATOS CONTROLES:

Em ratos controles foram registrados 93 neurônios, sendo identificados 3 padrões básicos de disparo: RS (n:65), IB(n: 7) e ROB (n:21) (Figura 12). As propriedades elétricas foram apresentadas na tabela 1 .

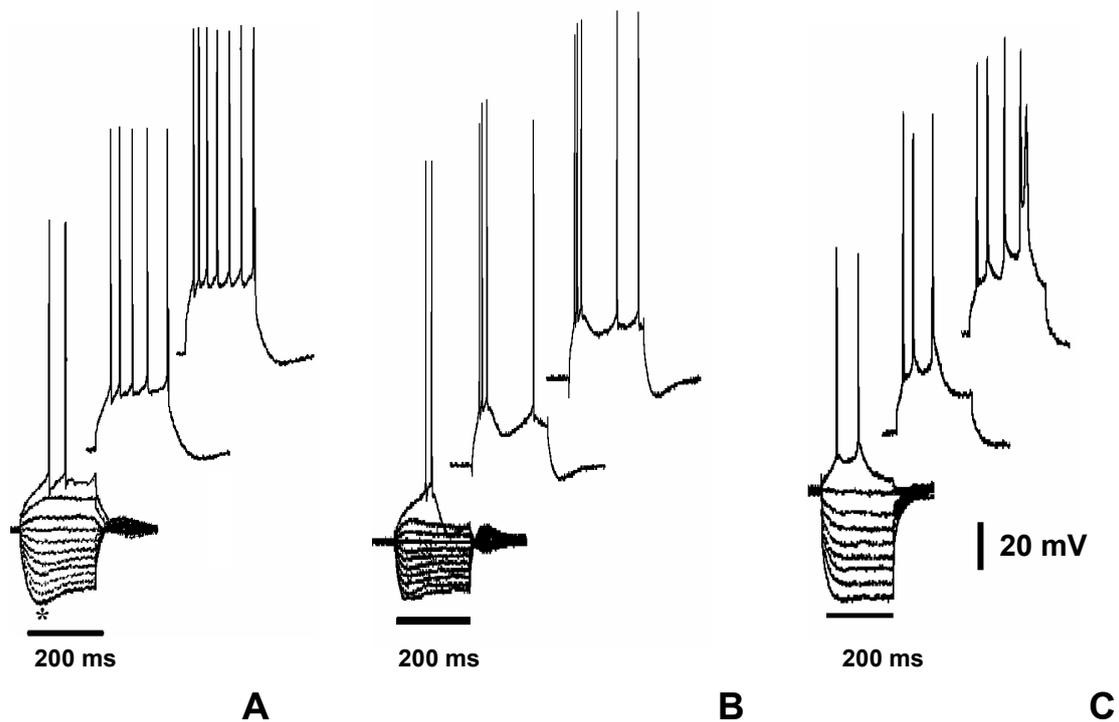


FIGURA 12. REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS DOS TRÊS PADRÕES BÁSICOS DE DISPARO ENCONTRADOS EM CA1 DE RATOS CONTROLES Em A-C mostra os potenciais de ação provocados por diferentes correntes (incremento de 0.1 nA) A) neurônio RS; B) neurônio ROB e C) neurônio IB.

Neurônios RS:

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Os neurônios RS representam 71% dos neurônios de CA1 registrados. Esses dados são compatíveis às descritas para as outras áreas do cérebro ou espécies (Masukawa *et al*, 1982; Jensen, 1996; Staff *et al*, 2000).

A figura 1 mostra um exemplo representativo de um neurônio RS de rato controle, onde pode ser observado uma curva despolarizante que durante a aplicação de pulsos negativos (-0.7 até -0.4). Esta curva despolarizante foi observada em 60% (n:39) dos neurônios RS onde a ativação ocorre quando a voltagem da membrana atinge a valores ≤ -80 mV sendo comumente denominada de onda, SAG (do inglês *transient hyperpolarizing sag*) que faz com que a célula fique com uma voltagem mais positiva.

Em nosso estudo os neurônios RS foram identificados, através da marcação com biocitina, como neurônios piramidais (figura 13A). Correntes supralimiares provocaram o aparecimento de atividade sustentada de potenciais de ação isolados com distinta acomodação dos disparos (figura 13B). Geralmente, após cada potencial de ação, foram observados uma hiperpolarização pós-potencial (AHP) em 57% (n:37). Estes, em alguns casos, eram multifásicos, isto é, apresentavam uma AHP rápida (r AHP) e uma média (m AHP) (figura 13B). Outra característica observada foi a despolarização pós-potencial de ação (DAP), de difícil detecção e em alguns casos era interposta entre o r AHP e o m AHP (Figura 13B). A DAP foi observada em 44%(n:29) apresentavam baixas amplitudes logo após o r AHP.

Em resposta à aplicação de pulsos hiperpolarizantes a voltagem da membrana medida após 180 ms de estímulo revelou uma variação média de -100 até -53 mV (13C)

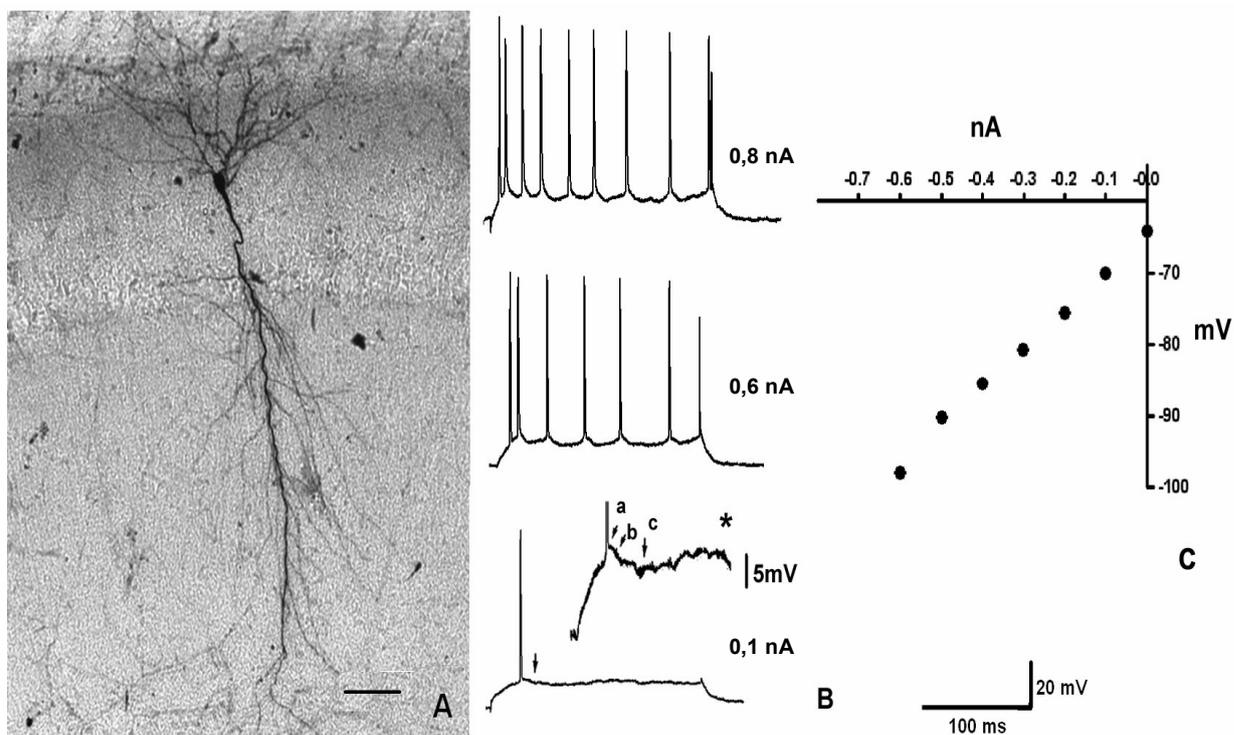


FIGURA 13. Exemplo de um neurônio com padrão RS de CA1 rato controle. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina. B-C). Características elétricas do mesmo neurônio. B) Correntes supralimiarres de crescentes provocam o aumento do numero de potenciais de ação. (*) Notar presença de: fAHP (a); DAP e (b)mAHP. C) Curva IV mostrando a variação da voltagem, deste neurônio, em resposta à aplicação de pulsos hiperpolarizantes.

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL EM CÉLULAS DE CA1: VARIANTES RS

O estudo da acomodação dos disparos foi obtida a partir das curvas das frequências instantâneas, em resposta à aplicação de 0.8 nA, onde foi verificado que o padrão RS não foi homogêneo.

Observamos que temporalmente a acomodação dos disparos apresentou distribuição bimodal, isto é a acomodação pode ocorrer de forma mais rápida ou lentamente. Este fator foi determinante para subclassificar os neurônios RS dentro de dois subgrupos: acomodação rápida – (f RS- do inglês *fast*-RS) e acomodação lenta (s RS- do inglês *slow*-RS). A tabela 1 mostra o sumário das propriedades elétricas e a análise estatística comparando estes valores serão apresentada posteriormente parte 3.

Os neurônios f RS (n:26) apresentam um intervalo inicial de alta frequência (140.14 Hz \pm 15.65) seguida por uma queda brusca, ocorrendo em média antes dos 50 ms (21.28 \pm 14.49) iniciais de registro (Figura 14). A acomodação desses disparos apresentou uma frequência média de 30Hz (30 \pm 6) Os neurônios f RS, quando despolarizados exibiram potenciais de ação iniciais simples ou atividade dupla. Esta atividade foi comum aos neurônios f RS, antes dos potenciais isolados subseqüentes, após aplicação de correntes despolarizantes (\geq 0.5 nA)(Figura 4).

Os neurônios s RS (n:39) apresentaram uma frequência inicial inferior a 100Hz (80 \pm 10), durante a aplicação dos mesmos 0.8 nA . A acomodação dos disparos ocorreu gradualmente após os 50 ms (55.71 \pm 11.72), acomodação foi similar ao f RS (31 \pm 7).

A freqüência de SAG foi ligeiramente superior nos f RS em relação ao s RS durante a aplicação de correntes hiperpolarizantes, 61%(n:24) contra 57% (n:15). Potenciais de ação com atividade dupla foram comuns aos neurônios f RS em resposta a pulsos despolarizantes elevados. Já os neurônios s RS exibiram potenciais de ação isolados após a aplicação de correntes supralimíares. A DAP era mais freqüente nos neurônios f RS (n: 21) do que nos s RS (n:8).

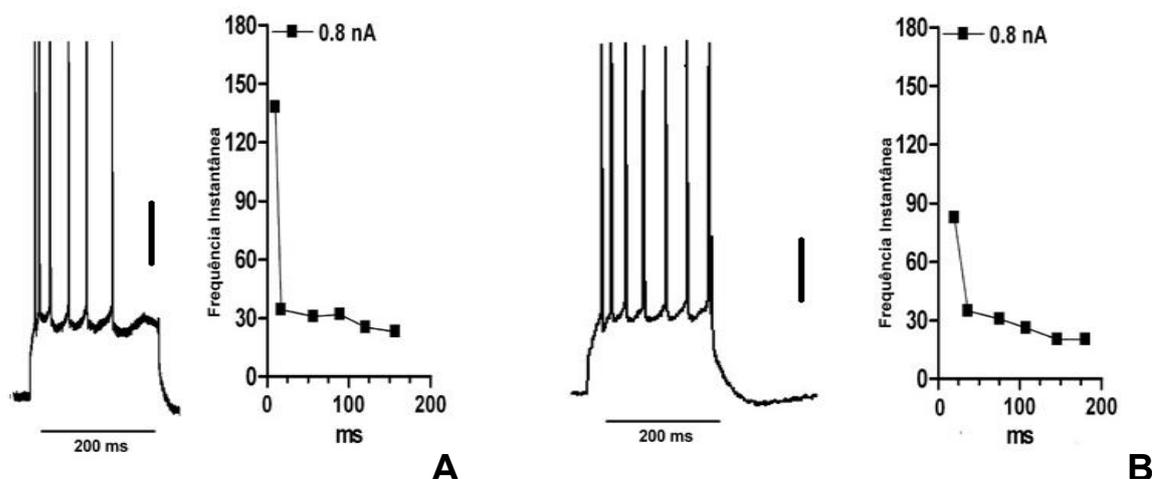


FIGURA 14: REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS REPRESENTATIVOS DAS SUBCLASSES DO PADRÃO RS E SUAS RESPECTIVAS CURVAS DE ACOMODAÇÃO MEDIANTE A APLICAÇÃO DE 0,8 NA. A) A curva do padrão f RS, caracteriza-se por apresentar potenciais com alta freqüência seguido por uma queda abrupta seguida pela acomodação dos disparos antes dos 50 ms iniciais. B) No padrão s RS a freqüência do primeiro intervalo é inferior ao f RS, e a acomodação é alcançada gradualmente.

Neurônios IB:

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Os neurônios IB representam a classe menos numerosa dos neurônios de ratos controles estudados, cerca de 7% do total. A tabela 1 apresenta as propriedades elétricas deste padrão. A figura 12 mostra um exemplo representativo de um neurônio IB de rato controle, onde **não foi** observado a **onda** SAG durante a aplicação de pulsos negativos. A ausência de SAG se repetiu em todos os neurônios IB.

Em nosso estudo os neurônios IB foram marcados com biocitina e identificados como neurônios piramidais (figura 15A). O número mínimo de potenciais de ação foi a atividade dupla semelhante aos neurônios RS e o máximo observado para a atividade inicial foi a tripla. Nos demais pulsos aplicados houve adaptação dos disparos com no número máximo de 5 espículas observadas na atividade em salva (figura 15B)

O AHP estava presente nos neurônios IB após a atividade em doublet, contudo não foi possível identificar o seu componente f AHP. A atividade **dupla** é o somatório dos potenciais de ação acrescido das suas DAPs (Kandel e Spencer, 1961, Yang et al, 1996). Em nosso estudo, a DAP **não mensuramos a DAP após a atividade dupla.**

A tabela 1 mostra o sumário das propriedades elétricas medidas e posteriormente na parte 3 dos resultados estes parâmetros foram comparados.

Em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes, a voltagem variou em média de -90 até 60 mV durante a aplicação de correntes hiperpolarizantes (figura 15C).

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL NOS NEURÔNIOS IB DE CA1

Assim como nos neurônios RS, os neurônios IB apresentaram uma acomodação dos disparos. Cada neurônio IB apresentou uma frequência inicial de $85 (\pm 13)$ de acomodação de $40\text{Hz}(\pm 15)$ ocorrendo em torno dos 70ms (70 ± 13) (figura 15D). O comportamento da curva da frequência instantânea em função do tempo foi semelhante à descrita para os neurônios sRS, entretanto os valores da frequência de acomodação foram mais elevados.

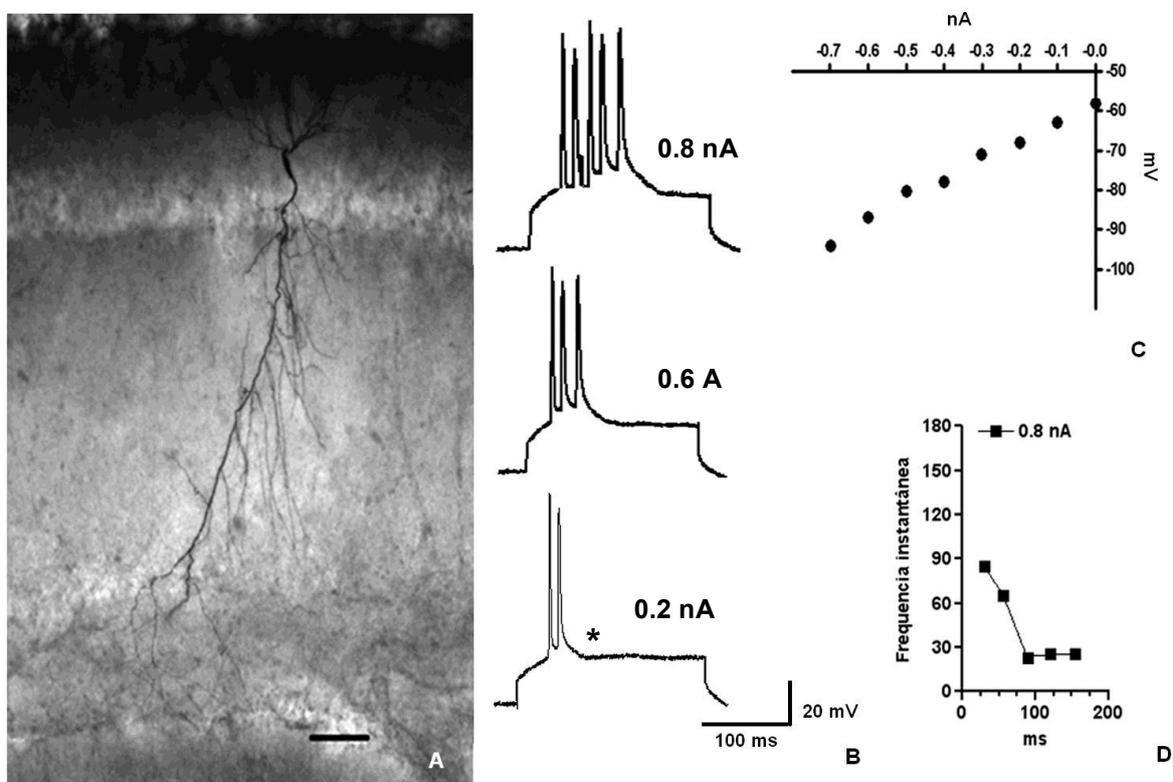


FIGURA 15 Exemplo de um neurônio típico padrão IB de CA1 rato controle. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina. B-D) Características elétricas do mesmo neurônio. B) A aplicação de correntes supralimíares de crescentes provocam o aumento do número de potenciais de ação. (*) Notar a presença do AHP. C) Curva IV mostrando a variação da voltagem em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes. D) A acomodação é alcançada gradualmente em torno dos 100 ms

Neurônios ROB:

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Os neurônios ROB foram caracterizados por apresentarem uma atividade em salva seguida pela oscilação entre potenciais isolados ou nova atividade em salva. Este padrão representa 22% do total. A figura 12 mostra um exemplo representativo de um neurônio ROB de rato controle, onde pode ser observado a presença de SAG, **esta característica esteve presente** em 71% (n:15) sendo uma característica marcante nos neurônios ROB.

A figura 16 mostra um neurônio piramidal do padrão ROB marcado pela biocitina e algumas das suas características elétricas. Durante a aplicação de pulsos supralimiaries os potenciais de ação são mostrados a adaptação dos potenciais de ação, com uma atividade dupla inicial e seus componentes (figura 16B). Este tipo de atividade esteve presente em 60% dos neurônios ROB. O f AHP (n:17) e uma DAP(n:11) foram freqüentes nos neurônios ROB representando respectivamente 85 e 52%. Nos neurônios ROB foram observados ainda um m AHP de longa duração e elevada amplitude (parâmetro não mensurado). A tabela 1 mostra o sumário das propriedades elétricas medidas e **a comparação destes parâmetros será abortado** posteriormente na parte 3.

A voltagem da membrana variou, em média, entre -100 até -60 mV durante a aplicação de pulsos hiperpolarizantes (Figura 16). No gráfico da relação entre voltagem da figura 16C de dois neurônios ROB, um com a SAG presente (ativa) e o outro com a SAG ausente (inativa). Este comportamento também pode ser observado nos neurônios RS.

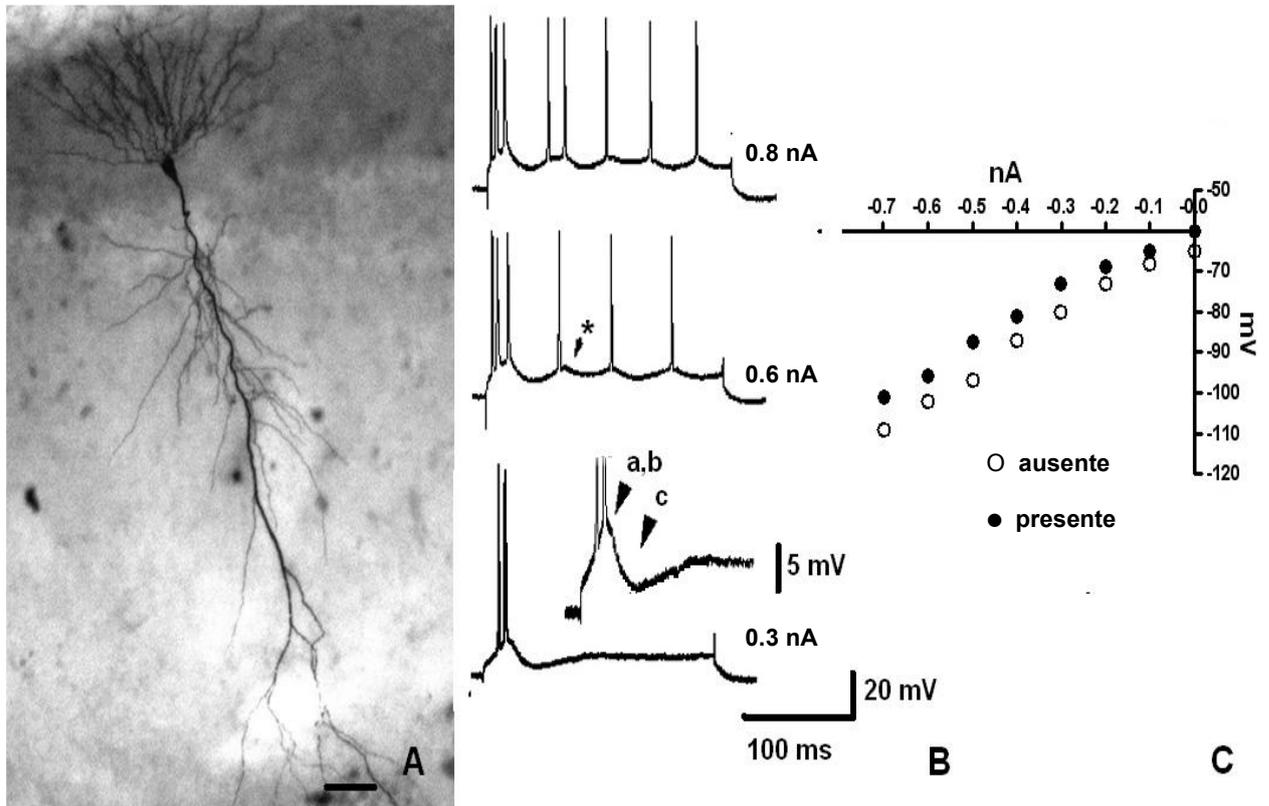


FIGURA 16. NEURÔNIO ROB DE CA1 RATO CONTROLE. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina. B-C). Características elétricas do mesmo neurônio. B) A aplicação de correntes supralimiárias de crescentes provocam o aumento do número de potenciais de ação, inicialmente com uma atividade dupla com a presença de f AHP (a); DAP e (b) M AHP, que podem persistir durante a estimulação (*). C) Curva IV mostrando a variação da voltagem em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes de dois neurônios SAG inativa (ou ausente) (o) e SAG ativada (ou presente) (●).

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL EM CÉLULAS DE CA1: VARIANTES ROB

O comportamento de acomodação dos potenciais de ação dos neurônios ROB também apresentou heterogeneidade e conseqüentemente também foi categorizado em: ROB de acomodação rápida (f ROB- *fast* ROB), acomodação

lenta (s ROB- *slow* ROB) e sem acomodação (w ROB-*without accommodation*). As propriedades elétricas desses neurônios foram sumarizadas na tabela 1.

Os neurônios f ROB apresentaram uma frequência inicial mais elevada que os neurônios f RS deste grupo de animais. Os valores medidos foram em média $230 \text{ Hz} \pm 25.39$. Imediatamente houve uma queda drástica da frequência em $50 \text{ ms} (50 \pm 5)$ estabelecendo a acomodação dos disparos em $36 \text{ Hz} \pm 3$ (Figura 17).

A frequência inicial dos neurônios s ROB também foi elevada ($157 \text{ Hz} \pm 6.41$), contudo inferior ao f ROB. O comportamento de acomodação foi gradual, como nos neurônios s RS, ocorrendo em torno dos 60 ms (Figura 17). A frequência de acomodação dos neurônios s ROB foi também similar ao neurônio f ROB ($\sim 38 \text{ Hz}$). Os neurônios f ROB diferem ainda das s ROB por apresentar potenciais isolados ou em dupla, após a atividade em salva. Nas células s ROB a atividade em salva é seguida somente por descargas isoladas.

Encontramos apenas um exemplar onde não houve a acomodação dos disparos neuronais, no qual designamos como w ROB. A frequência instantânea foi mantida em torno dos 90 Hz (Figura 17). Correntes supralimíares elevadas provocam o aparecimento de uma nova atividade em salva nos w ROB. Estes fatores foram determinantes na diferenciação deste padrão aos demais subtipos.

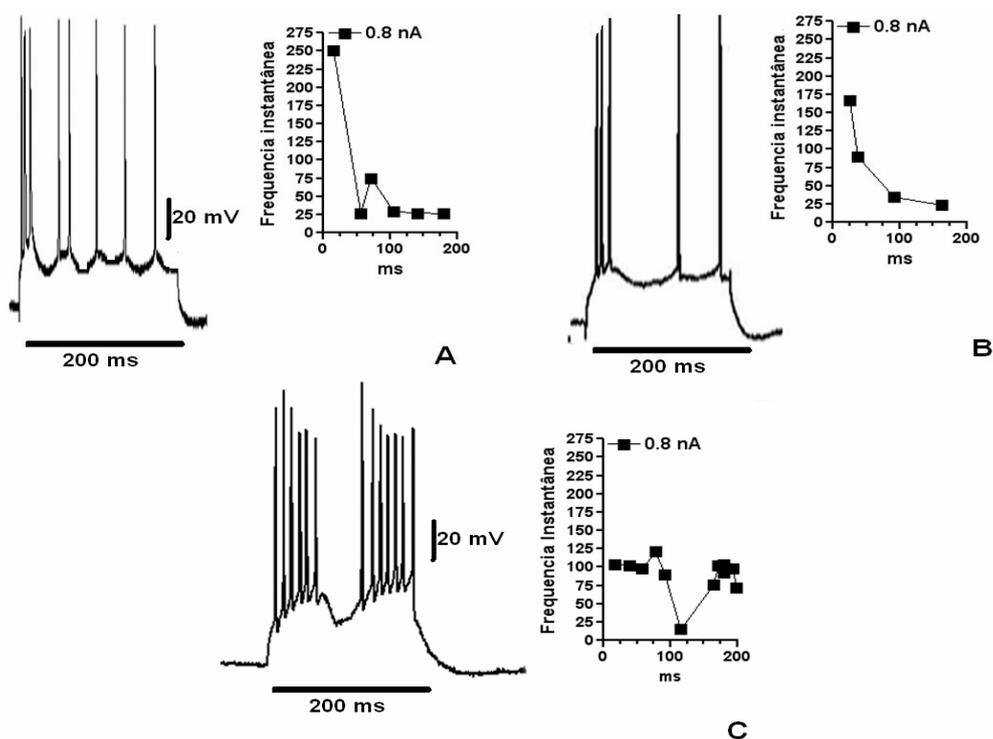


FIGURA 17. Registros eletrofisiológicos dos subtipos do padrão ROB e comportamento de acomodação mediante a aplicação de 0,8 nA. A) A curva do padrão r -ROB, caracteriza-se por apresentar potenciais com alta frequência seguida por uma queda abrupta e acomodação em torno dos 50 ms iniciais. B) No padrão s -ROB a frequência do primeiro intervalo é de alta frequência seguida pela acomodação gradual ocorrendo após os 60 ms. C) A curva do padrão w -ROB, caracteriza-se pela inability de acomodação dos disparos

TABELA 1. Resumo das propriedades elétricas neuronais de CA1 de ratos controles.

PROPRIEDADES	fRS	sRS	IB	fROB	sROB	wROB
PM (mV)	-64.73±9.04(n:39)	-73.63±4.48(n:26)	-66 ±5.64(n:7)	-65.15±8.16 (n:7)	-69.46(±3.08)(n:13)	-70.04
IR (mΩ)	38.47 ±6.27(n:39)	41.68±5.56(26)	31.5±7.33(n:7)	43.51 ±7.55 (n:7)	44.09 ±5.60 (n:13)	48
TC (ms)	10.30±3.72(n:39)	13.02±0.85(n:39)	11.43±3.8(n:7)	11.3±1.34 (n:7)	9.49±13.57(n:13)	10.35
ICAP (nA)	0.26 ±0.19(n:39)	0.26±0.10(n:26)	0.2±0.1(n:7)	0.17±0.09(n:7)	0.24±0.16(n:13)	0.1
LIM(mV)	-62.53 ±5.60 (n:39)	-61.6 ±6.2(n:26)	-55.9±1.39(n:7)	53.81±9.75(n:7)	-55.36±12.85(n:13)	-66
AMP (mV)	86.5 ±6.80(n:39)	83.3 ±9.06(n:26)	82.1±3.46(n:7)	85.5±4.18(n:7)	82.23±7.17 (n:13)	78
DUR (ms)	3.4 ±0.95(n:20)	3.7±2.25(n:13)	2.14 ± 0.69 (n:7)	1.28±1.11(n:7)	1.25±1.21(n:13)	2

Os valores representam as médias e desvios padrões medidos para as propriedades. Abreviaturas: -potencial de membrana (PM); resistência de entrada (IR), constante de tempo (TC); limiar do 1° potencial de ação (LIM); amplitude do 1° potencial de ação (AMP), duração do do 1° potencial de ação (DUR)

RATOS TRATADOS COM PILOCAPINA:

Dos 50 ratos injetados com a pilocarpina apenas 3 evoluíram ao óbito no decorrer do experimento. Os animais que não desenvolveram o SE foram excluídos (n:4), cerca de 80% dos sobreviventes manifestaram o CER ao longo dos 2 meses subseqüentes. Foram obtidos registros eletrofisiológicos de 33 animais (n:42). A partir deste estudo descritivo dos padrões de disparo, em animais tratados chamaremos a atenção para os pontos em comum e diferenças observadas com o grupo anterior.

Assim como nos neurônios de ratos controles, os neurônios registrados, deste grupo, foram agrupados em três classes: RS (n:23); IB (n:10) e ROB (n:12). Na figura 18, são mostrados registros eletrofisiológicos representativos das três classes. As propriedades elétricas estão sumarizadas na tabela 2.

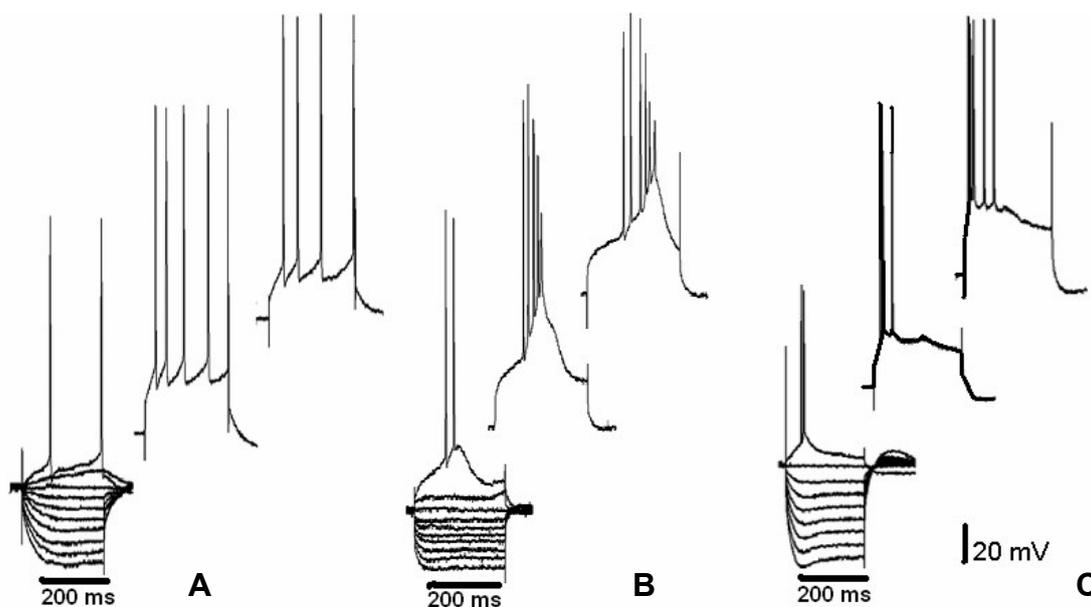


FIGURA 18. Registros dos 3 padrões básicos encontrados em CA1 de ratos tratados com pilocarpina. Em A-C mostra os potenciais de ação provocados por diferentes correntes (incremento de 0.1 nA). A) neurônio RS; B) neurônio IB e C) neurônio ROB.

Neurônios RS

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS NEURÔNIOS RS

Os neurônios RS representaram a maioria dos neurônios registrados em CA1 de ratos tratados com pilocarpina. Entretanto, quando compararmos com os animais controles a população RS encontra-se reduzida 72% contra 52%.

Assim como nos neurônios RS hipocâmpais de animais controles nos animais tratados com pilocarpina não dispararam nenhuma atividade em salva e mantiveram um intervalo regular entre um potencial de ação bem como acomodação dos potenciais de ação. A figura 18A representa um neurônio RS de um animal tratado com pilocarpina onde pode se observar a ausência de SAG. Embora a SAG não seja observada na totalidade dos neurônios RS controles (60%), a porcentagem de SAG nos neurônios RS de animais tratados encontra-se reduzida, 47% (n:11).

Na figura 19, é mostrado um exemplo de um neurônio piramidal RS típico de um animal tratado com pilocarpina e algumas características elétricas. A aplicação de pulsos despolarizantes provocou o aparecimento de potenciais de ação isolados com distinta adaptação dos disparos. Ao contrário dos neurônios RS de animais controles, pequenas pontas despolarizantes entre os potenciais de ação foram freqüentes nos neurônios RS dos animais tratados, indicando hiperexcitabilidade (Figura 8B). O AHP, dos animais tratados, representou 78% (n:18) dos neurônios RS contra 57% dos animais controles..

A DAP, quando presentes, eram geralmente de fácil detecção, ao contrário das células RS de animais controles. Houve um ligeiro aumento do número de observações da DAP nos neurônios RS de animais tratados em relação aos controles, 48% (n:11) contra 44%.

A voltagem da membrana oscilou em média entre -100 até -58 em resposta a estímulos hiperpolarizantes. Este comportamento foi similar aos observados nos neurônios RS do grupo controle.

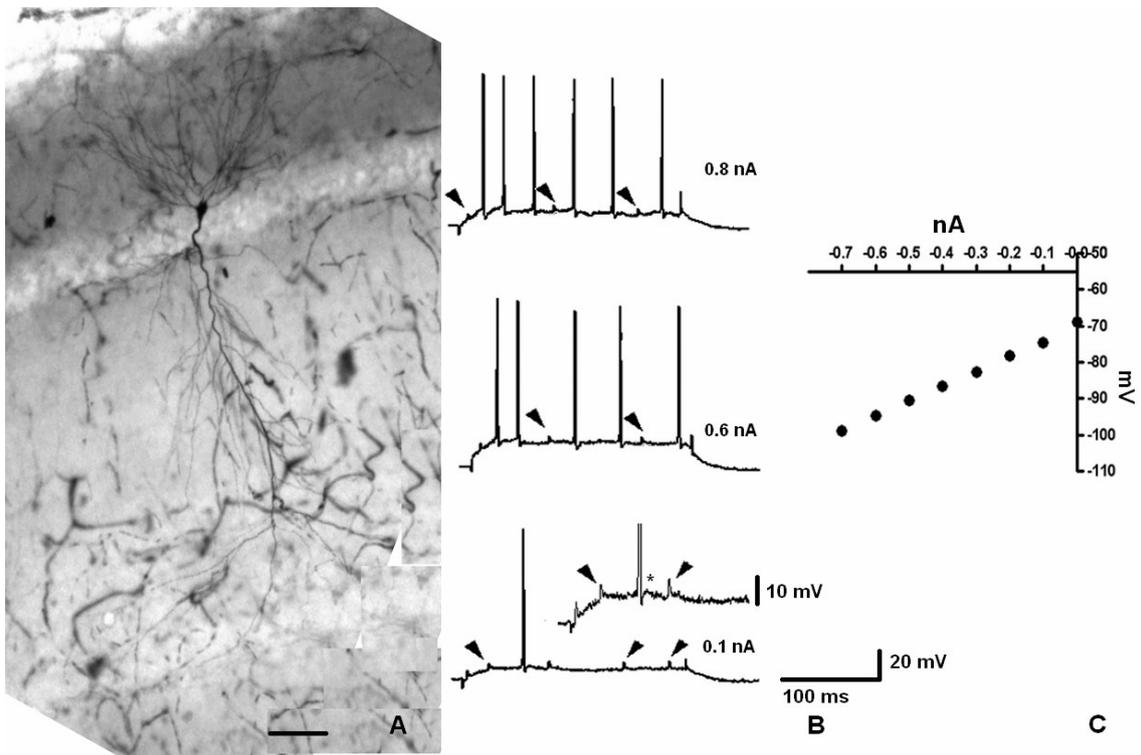


FIGURA 19. Neurônio com padrão RS de CA1 rato tratado com pilocarpina. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina. B-C) Características elétricas do mesmo neurônio. B) Correntes supralimiáres de crescentes provocam o aumento do número de potenciais de ação. (*) Notar presença de: τ AHP; DAP, as pontas de setas indicam as espículas despolarizantes. C) Curva IV mostrando a variação da voltagem em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes.

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL NOS NEURÔNIOS EM CA1: VARIANTES RS

Assim como nos neurônios RS controles, de uma forma geral os neurônios RS dos animais tratados apresentaram acomodação dos disparos, contudo a frequência de acomodação estava aumentada (~45 Hz). Os neurônios RS tratados apresentaram um comportamento temporal de acomodação similar ao observado no grupo controle, o que nos permitiu adotar os mesmos critérios para propor uma subclassificação: acomodação lenta

(_sRS) (n:16) e acomodação rápida (_FRS) (n: 7).

Os neurônios _FRS apresentaram uma frequência inicial de $120 \pm 21,4$ que cai abruptamente ocorrendo nos primeiros 40 ms de estimulação do disparo. A frequência de acomodação mensurada foi de $37(\pm 8)$. A frequência inicial nos neurônios _sRS é inferior aos _FRS, $89\text{Hz} \pm 10.72$) após aplicação de 0.8 nA e a acomodação ocorre lentamente após 60 ms de estimulação do disparo. A frequência de acomodação mensurada foi superior ao observado no subtipo _FRS, de $45(\pm 6)$. (Figura 20).

A SAG esteve presente em 50%(n:8) no padrão _sRS enquanto que nos neurônios _FRS foi observado um percentual de 43% (n:3) durante a aplicação de correntes hiperpolarizantes. Ao compararmos com grupo anterior observamos uma inversão na relação de frequência da propriedade com o padrão isto é, o padrão _FRS apresenta-se mais elevado do que no padrão _sRS, 61% contra 57%. Além disso, observamos uma redução no percentual dos subgrupos dos animais tratados em relação aos mesmos padrões dos animais controles. A atividade dupla também foi freqüente nos _FRS assim como já havia sido observada no grupo sem epilepsia.

A presença do _FAHP nos neurônios _sRS de animais tratados com pilocarpina foi mais freqüente do que nos neurônios _FRS, 81%(n:13) contra 72% (n:5). Além disso, em relação a presença desta propriedade, observamos também uma inversão na relação de frequência da propriedade com o padrão comparando com o padrão de disparo neuronal RS dos animais controles.

Em 57% dos neurônios _FRS apresentaram a DAP, nos neurônios _sRS, 43%. Ao compararmos estes percentuais com os padrões equivalentes encontrados no grupo controle, observamos que a relação _FRS > _sRS se

manteve, contudo houve um aumento de DAP nas subpopulações de células RS do grupo epiléptico.

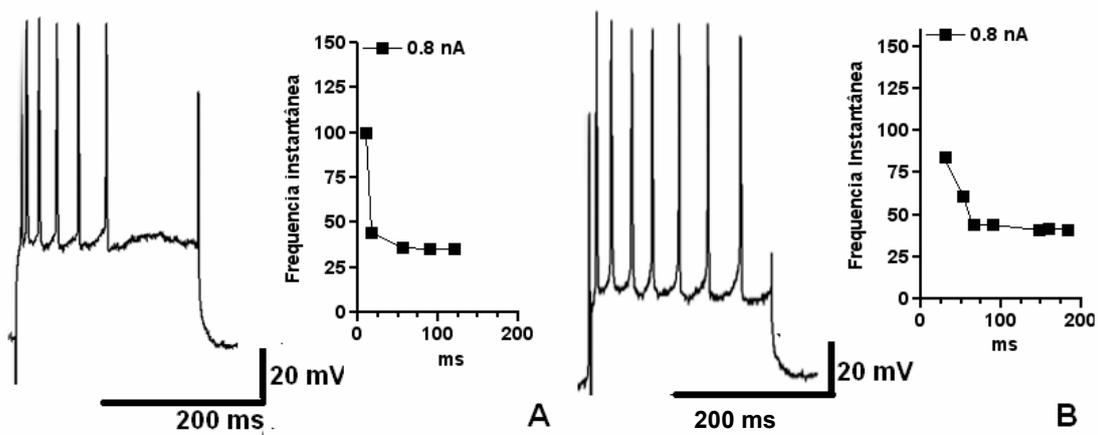


FIGURA 20: Registros eletrofisiológicos representativos das subclasses RS e suas respectivas curvas de freqüências instantâneas mediante a aplicação de 0,8 nA. A) A curva do padrão fRS , caracteriza-se por apresentar potenciais com alta freqüência seguido por uma queda abrupta e acomodação dos disparos antes dos 50 ms iniciais. B) No padrão sRS a freqüência do primeiro intervalo é inferior ao fRS , e a acomodação é alcançada gradualmente.

Neurônios IB

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Os neurônios IB representam a classe menos numerosa dos neurônios hipocámpais de ratos tratados com pilocarpina (22%), assim como já havia sido previamente observado no grupo controle e em outros animais sem epilepsia⁷³ (Jensen et al, 1994). Contudo a porcentagem destas células encontrou-se elevada.

A figura 21 mostra um neurônio piramidal marcado com biocitina e algumas propriedades elétricas do mesmo. A aplicação de pulsos supralimiares provocaram o aparecimento de um potencial de ação isolado, onde pode se observar um fAHP e DAP evidente. O potencial de ação isolado foi observado apenas em dois neurônios IB, nos demais neurônios IB, a atividade em dupla foi a mais comum. Em ratos controles não observamos potenciais de ação isolados. Na relação corrente e voltagem pode se observar uma variação de -90 e -60 mV. Durante a aplicação dos pulsos hiperpolarizantes a SAG não foi observada, assim como já havia sido relatado para o grupo de ratos controles.

Em nenhum momento durante a estimulação foram identificados potenciais de ação isolados ou mesmo uma repetição da atividade em salva após a atividade inicial. A tabela 2 mostra o sumário das propriedades elétricas mensuradas, o estudo comparativo destas propriedades será abordado na parte 3.

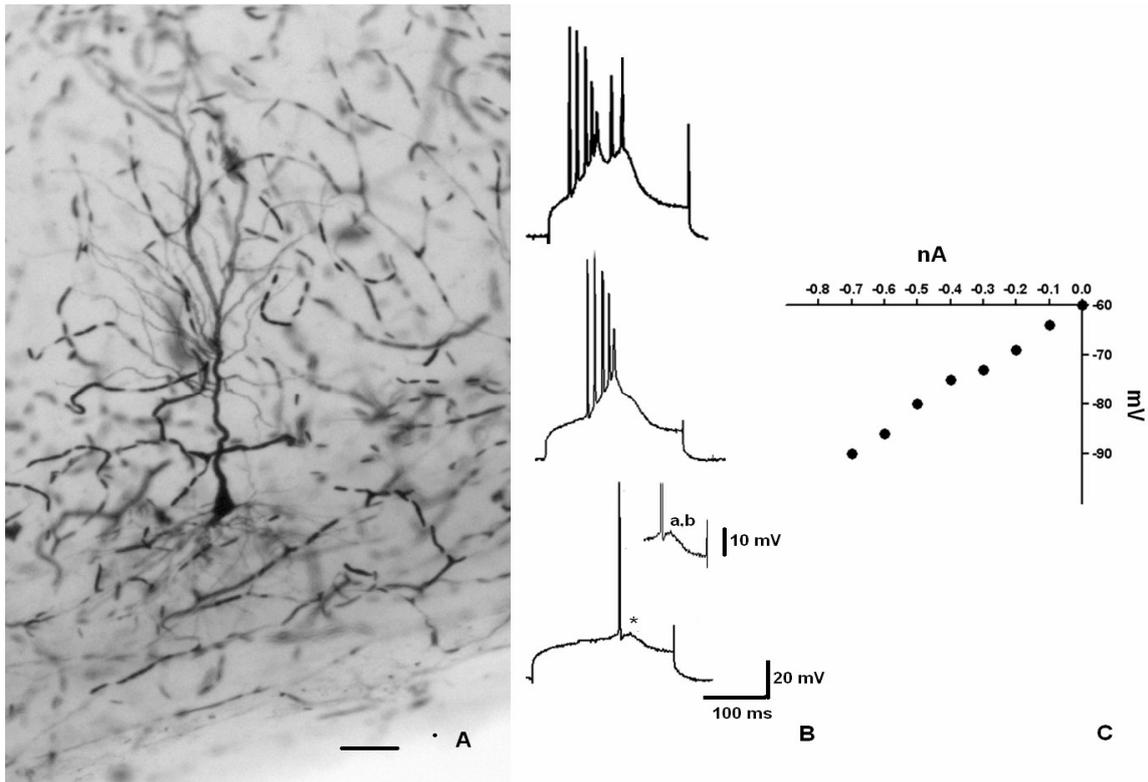


FIGURA 21 Neurônio IB de CA1 rato tratado com pilocarpina. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina. B-C). Características elétricas do mesmo neurônio. B) Correntes supralimiarres de crescentes provocam o aumento do numero de potenciais de ação. (*) Notar presença de f AHP (a) e DAP(b). C) Curva IV mostrando a variação da voltagem em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes.

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL NOS NEURÔNIOS IB CA1

Ao contrário dos neurônios IB de animais controles, identificamos diferenças no comportamento de acomodação dos potenciais através da frequência instantânea. Encontramos neurônios IB que apresentaram acomodação e os que não apresentaram acomodação, sendo por isso identificados como: IB com acomodação presente ($_A$ IB) (do inglês *accommodation*) e ausente ($_W$ IB) (do inglês *without accommodation*) (Figura 22).

O subtipo $_A$ IB representou 70% (n:7) dos neurônios IB observados. A frequência de acomodação foi de 37 (± 14) Hz ocorrendo após os 80 ms de registro. A frequência inicial foi calculada em valores inferiores à 100Hz (90 Hz ± 6.93) após a aplicação de 0.8nA (Figura.22), este comportamento foi similar aos padrões sRS (grupos controles e tratados) e IB do grupo controle.

O segundo subtipo, $_W$ IB (n:3), caracterizou-se pela ausência de acomodação e pela presença de potencial de ação isolado identificado no ICAP. Nestes potenciais isolados verificou-se a presença de AHP multifásico, Pulsos supralimíares elevados provocaram o aparecimento da atividade em salva seguido pela repolarização da membrana, a valores próximos do repouso. A interrupção da atividade em salva ocorreu antes dos 170 ms e a frequência instantânea não revelou acomodação dos mesmos, sendo mantida a valores superiores a 100 Hz.

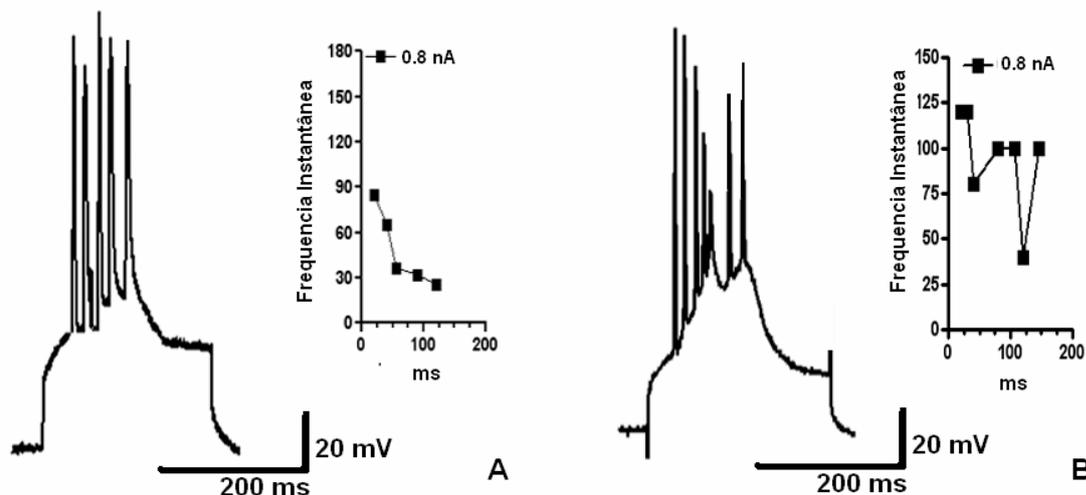


FIGURA 22 Registros eletrofisiológicos representativos e comportamento de acomodação dos potenciais de ação das subclasses do padrão IB mediante a aplicação de 0,8 nA. A) A curva do padrão $_A$ IB, caracteriza-se por apresentar acomodação B) No padrão $_w$ IB caracteriza-se pela ausência de acomodação.

Neurônios ROB

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Esta classe representa 27% (n:12) dos neurônios hipocâmpais de CA1 de ratos tratados com pilocarpina. Houve um aumento do número de neurônios com disparo ROB registrados, quando comparados com o grupo controle.

A figura 23 mostra um neurônio piramidal ROB marcado com biocitina, os neurônios com este padrão diferiram dos demais por apresentarem uma bifurcação axônica. A aplicação de pulsos supralimíares provocou uma **atividade dupla** inicial. Correntes elevadas provocaram o aparecimento da atividade em salva acompanhada pelos componentes $_F$ AHP, DAP e $_M$ AHP

(Figura 23). O: fAHP e o DAP foram observados respectivamente em 12 e 11 neurônios .

77

A relação entre corrente aplicada e potencial de membrana medido evidencio uma variação da voltagem entre -90 e -60 quando aplico pulsos hiperpolarizantes (Figura 23). Nas células ROB, diferentemente dos neurônios RS, as correntes sublimiaries provocaram o aparecimento de uma despolarização transitória, semelhante a SAG só que em sentido oposto (n:12). Assim como nas células RS e ao contrário das células IB, a SAG estava presente na maioria das células (n:10).

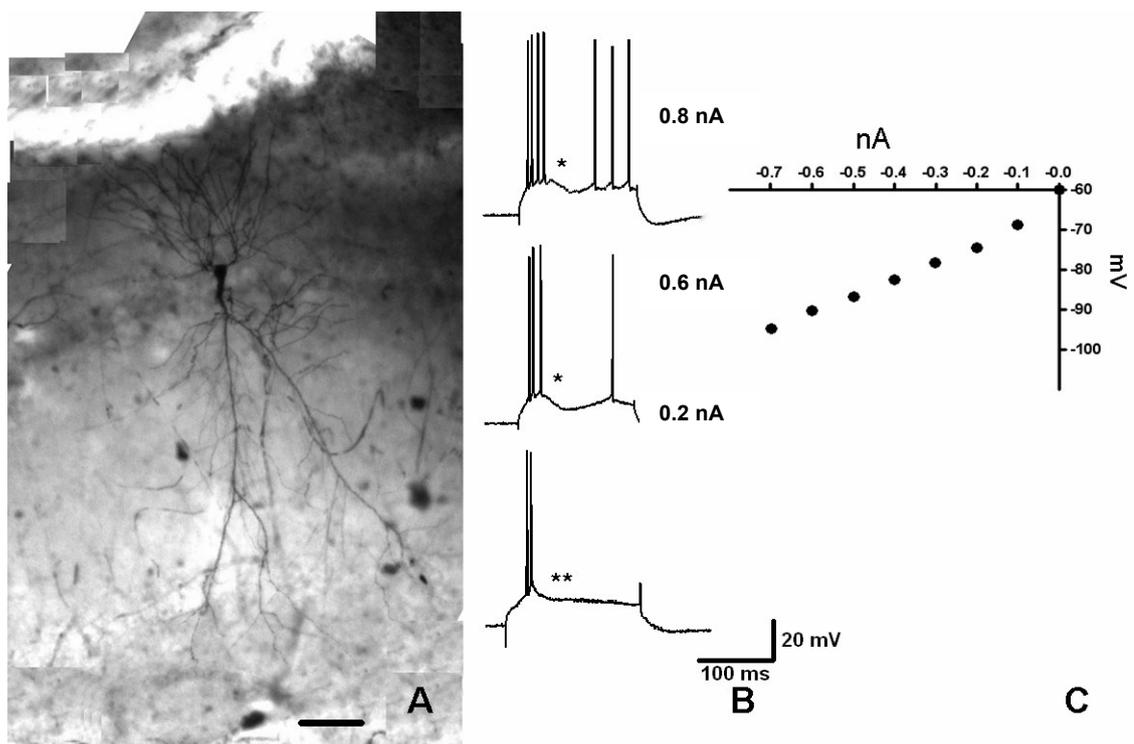


FIGURA 23. Neurônio ROB de CA1 rato tratado com pilocarpina. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina. B-C).Características elétricas do mesmo neurônio. B) A aplicação de correntes supralimiaries de crescentes provocam o aumento do numero de potenciais de ação, inicialmente com uma atividade dupla. Notar: presença (*) de fAHP; DAP e mAHP.que podem persistir durante a estimulação (*). C) Curva IV mostrando a variação da voltagem em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes .

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL EM CA1: VARIANTES ROB

Os padrões ROB de ratos tratados com pilocarpina foram agrupados de acordo com o tempo que leva até a acomodação, podendo ocorrer rapidamente ($_F$ ROB) (n: 5). ou lentamente ($_S$ ROB) (n:7).

Os neurônios $_F$ ROB apresentam uma frequência instantânea elevada ($230 \text{ Hz} \pm 25.39$) e uma acomodação ocorrendo em torno dos 50 ms. Os neurônios ROB apresentam uma frequência de acomodação $\approx 40 \text{ Hz}$. No padrão $_S$ ROB apresentaram uma frequência instantânea inicial inferior ao $_F$ ROB ($140 \text{ Hz} \pm 27,12$) com a mesma intensidade de corrente (0.8 nA). A acomodação ($\approx 38 \text{ Hz}$) ocorreu em torno dos 65 ms iniciais após estimulação supralimiar (0.8nA) (Figura 24). Estes valores foram similares aos observados nos animais controles.

Além do comportamento de acomodação diferirem entre $_F$ ROB e $_S$ ROB foi verificada diferenças quanto as presenças de SAG, $_F$ AHP e DAP. A SAG esteve presente em 100% (n:7) no padrão $_S$ ROB enquanto que nos $_F$ ROB foi observado um percentual de 60% (n:3) durante a aplicação de correntes hiperpolarizantes. A presença do $_F$ AHP nos neurônios $_F$ ROB de animais tratados com pilocarpina foi mais freqüente do que nos neurônios $_S$ ROB, 85%(n:6) contra 66% (n:5). Nos neurônios $_F$ ROB controles, a presença de $_F$ AHP foi mais freqüente. A DAP foi observada em 60% dos neurônios $_F$ ROB e 71% dos $_S$ ROB. Ao compararmos com o ROB do grupo controle observamos as relações de frequência da propriedade com o padrão foram as mesmas.

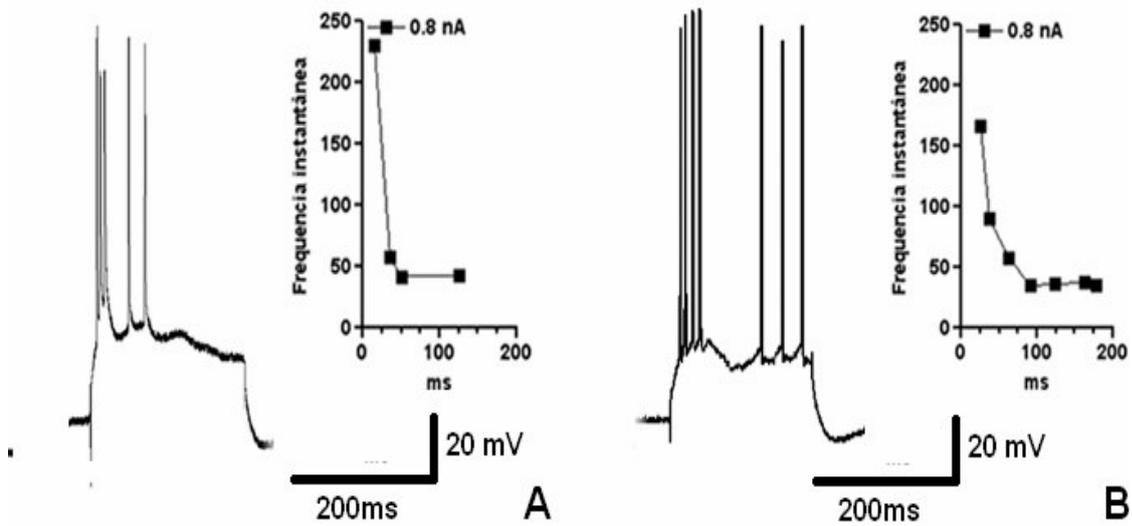


FIGURA 24. Registros eletrofisiológicos representativos e comportamento de acomodação dos potenciais de ação das subclasses do padrão ROB mediante a aplicação de 0,8 nA. A) A curva do padrão r -ROB, caracteriza-se por apresentar potenciais com alta frequência seguido por uma queda **abrupta e** acomodação dos disparos em torno dos 50 ms iniciais. B) No padrão s -ROB a frequência do primeiro intervalo é de alta frequência e a acomodação ocorre após os 60 ms.

TABELA 2. Sumário das propriedades elétricas medidas nos neurônios de CA1 de ratos tratados com pilocarpina

Propriedades	fRS	sRS	IB	fROB	sROB
PM (mV)	-70.3 ± 0.7 (n:7)	-69.9 ± 4.6 (n:16)	-67.6 ± 4.5 (n:10)	-66.0 ± 4.63 (n:5)	-69.41 ± 3.98 (n:5)
IR (mΩ)	35.5 ± 9.34 (n:7)	43.18 ± 15.7 (n:16)	38.5 ± 5.3 (n:10)	49.41 ± 10.50 (n:5)	35.97 ± 7.92 (n:7)
TC (ms)	12.4 ± 1.2 (n:7)	11.3 ± 0.9 (n:16)	10.2 ± 2.7 (n:10)	12.61 ± 1.50 (n:5)	11.69 ± 1.4 (n:7)
ICAP (nA)	0.4 ± 0.26 (n:7)	0,03 ± 0.4 (n:16)	0.11 ± 0.18 (n:10)	0.20 ± 0.11 (n:5)	0.27 ± 0.21 (n:7)
LIM (mV)	-56 ± 7.6 (n:7)	-58.4 ± 8.05 (n:16)	-55.66 ± 9.03 (n:10)	-49.8 ± 5.16 (n:5)	-51.47 ± 9.13 (n:7)
AMP (mV)	89.8 ± 4.5 (n:7)	88.6 ± 4.8 (n:16)	84.5 ± 3.06 (n:10)	89.0 ± 1 (n:5)	86.0 ± 0.98 (n:7)
DUR (ms)	2,28 ± 1.9 (n:7)	3.5 ± 1.90 (n:16)	2.14 ± 0.69 (n:10)	1.6 ± 1.14 (n:5)	1.5 ± 1.39 (n:7)

Os valores representam as médias e desvios padrões medidos para as propriedades. Abreviaturas: potencial de membrana (PM); resistência de entrada (IR), constante de tempo (TC); limiar do 1° potencial de ação (LIM); amplitude do 1° potencial de ação (AMP), duração do 1° potencial de ação (DU)

TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

No tecido humano, foram estudados 265 neurônios hipocampais de CA1 de 52 pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso. Os dados clínicos desses pacientes estão sumarizados na tabela 3. O estudo *in vitro* destes hipocampos foram realizados no período de 1 até 48 horas após a ablação do tecido no bloco cirúrgico.

O protocolo usado para identificar os padrões de disparo foi o mesmo aplicado nos grupos anteriores, isto é, estimulação dos neurônios de CA1 com correntes supralimíares.

A figura 25 mostra os registros eletrofisiológicos das quatro principais classes de disparo observadas nos neurônios hipocampais humanos. RS (do inglês: *regular-spiking*) (n:219) , FS do (inglês: *fast-spiking*) (n:4); IB (do inglês: *intrinsic-bursting*) (n: 13)e ROB (*repetitive-oscillatory-bursting*) (n:29).

Na PARTE II, dos resultados serão mostrados a análise quantitativa e qualitativa dos parâmetros elétricos mensurados no tecido humano. E na PARTE III serão apresentados os resultados da comparação dos parâmetros elétricos com os ratos.

TABELA 7: Principais Dados Clínicos dos Hipocampos com registro

PAC	I/ S	INICIO	FREQ	TC EEG _{u/c}	LOCAL	RMF	CIRURGIA	FAE CéI		
	34 f	11a/23a	var/ 1xm	cpc	TD	DIR	AH	Amig-hipo	CBZ,CLB	3 _s RS
MS	25 f	10a	1xm	cpc	TD	DIR	EH	Amig-hipo	CBZ,CLB	3 _s RS, 1 _s ROB
MLF	46 f	46	SI	cpc	TD	DIR	EH	Amig-hipo	VPA	3 _s RS, 1 _F RS, 1IB
JON	43 m	18/25a	2-3xm	cpc	TE	ESQ	AH	Amig-hipoc	PB, CBZ, VPA, LMG,CLB	1 _s RS, 1 _F ROB
IMF	46 F	6a/40 a	1-3xm	cpcr	TD	DIR	AH	Amig-hipo	CBZ,CLB	1 _s RS
JOS	26 m	9m	10xm	cpc	TD	DIR	EH	spencerc	PB, VPA	2 _s RS, 1 _F RS, 1FS
SRG	34 f	1a/33a	4xd	cpc	BT	DIR	EH	spencer	TB	1 IB
EFB	25 f	3a	8xd	cpc	TE	ESQ	AL	Amig-hipo	PB,TOPI	1 _s RS, 1 _F RS, 1 _F ROB
GCSF	23 F	SI	SI	SI	SI	DIR	SI	spencer	SI	2 _s RS, 1 _F RS
CAJ	30 f	3a	4xm	cpc	TD	DIR	AH	Amig-hipo	CBZ, DFH,FB	1 _s RS
HPN	11	3	3xm	cpc	TD	DIR	AH	Amig-hipo	CBZ,DFM,DFH	2 _s RS, 1 _F RS, 2 _s ROB, 1 _F ROB
JFL	25 m	12	10xm	cctcg	TE	ESQ	SI	Amig-hipo	PB, OCBZ	1 _s RS, 1 _F RS, 1 IB
ALG	29 m	3a	SI	cpc e csg	TE	DIR	AH	Spencer	PB,CBZ,CLB	5 _s RS, 1 _F RS, 1 _s ROB, 1IB
RG	49 m	SI	SI	SI	SI	ESQ	SI	Amig-hipo	SI	1 _s RS
DAM	24 m	12	SI	cpc	TD	DIR	SI	Amig-hipo	PHT, PB,CLB	2 _s RS
DDF	18 f	3 a	SI	SI	TE	ESQ	AH	Amig-hipo	SI	3 _s RS, 1 _F RS
LRJ	36 f	1a	incont	cps, cpc	TE	DIR	AH	Spencer	CBZ,CLB	3 _s RS 2 _F RS
SON	30 f	2a	2-4xd,1xs	SI	TD	DIR	AH	Amig-hipo	CBZ, VPA,CLB	4 _s RS
GFH	34 f	12	4-5 x sem	cps, cpc,cpsg	TE	ESQ	AH	Amig-hipo	CZP, PHT, PB, CLB, TRIE	1 _s RS, 1 FS
MJC	21 f	8a	SI	cps	TE	ESQ	EH	Amig-hipo	CBZ, FNB,DFH	5 _s RS, 4 _F RS, 1 _s ROB
CPS	24 m	12	estresse	cps e cpc	TE	ESQ	AH	Amig-hipo	PB, CBZ,, VPA, CLB, TOP	3 _s R, 1 _F ROB
ODP	43 m	1m	1xs	cpc c/ gen	TD	DIR	AH	Amig-hipo	CBZ, PHT, VPA	2 _s RS, 1 _F RS
CHV	37 f	7a	2xsem	cps, cpc	TE	ESQ	AH	Amig-hipo	FNB, PHT, VPA,CB	2 _s RS, 1 _F RS
TLS	2 m	1d	6-7xd	CPG	TE	ESQ	DISP	HEMISF	VPA	3 _s RS, 6 _F RS, 3 _L RS, 1 _s ROB

MHS	40	f	2a	SI	CPC	TD	DIR	AH	Amig-hipo	VPA CBZ CLB	2 _s RS,1 _F RS, IB
JFF	36	m	1a11m	3-4xm	CPC	TE	esq	AH	Amig-hipo	CBZ, PB, VPA	1 _s RS, 1 _F RS
LRS	32	m	12a	3-4xm	cpc	TD	DIR	AH	Amig-hipo	CBZ, CLZ, VPA	3 _s RS, 1 _s RS, 1 FS
VLQA	31	f	SI	SI	CPC	TD	DIR	SI	Amig-hipo		4 _s RS, 1 _L RS
EDS	42	f	14a	2xd	CPC	TE	ESQ	SI	Amig-hipo	PB, CBZ, AMT	3 _s RS, 1 _F RS, IB
MMT	43	f	SI	SI	SI	SI	ESQ	SI	Amig-hipo		2 _F RS, 2 _F ROB, 1 _s ROB, 2 _w ROB, 5IB
CVU	37	m	SI	SI	CPC	SI	ESQ	SI	Amig-hipo	CBZ	10 _s RS, 1 _F RS, 1 _L RS 1 _F ROB 2IB
LOL	39	f	7a		CPC	TD	DIR	SI	Amig-hipo	PB, VPA, DVPA	2 _s RS, 1 _F RS
JVS	4	m	SI	SI	CPG		DIR	SI	HEMIS		2_FRS, 4_FRS,2_LRS
GVN	23	m	10a	1xm	CPC	TE	ESQ	SI	Amig-hipo	MALIAZIN, OCBZ	3 _s RS, 1 _F RS, 1 _s ROB, 1 _F ROB
AMB	38	f	SI	SI	SI	SI	ESQ	SI	Amig-hipo		8 _s RS, 1 _F RS
CAS	36	m	inf	2xm	CPS e CPC	TE	ESQ	ahe	Amig-hipoc	CLB	1 _s RS
MID	32	m	SI	SI	SI	SI	ESQ	SI	Amig-hipoc		3 _s RS, 1 _L RS,1FS
AGS	18	m	SI	SI	SI	SI	ESQ	SI	Amig-hipoc		1 _s RS
MDP	14	m	3m	sem	CPC	TD	DIR		spencer	OCBZ, PB; CBZ	6 _s RS, 2 _F RS, 1 _F ROB
GIP	28	m	inf	2xsem	SI	TE	ESQ	AH	Amig-hipoc	OXC, VPA	1 _F RS, 1 _s ROB
MILA	31	m	1a	2xm(parç),	SI	TE	ESQ	AH	Amig-hipoc	CLB, CBZ	3 _s RS, 1 _F RS
RLC	30	m	1a4m	2-3xd (4xa)	CPC	TE	ESQ	SI	Amig-hipc	CBZ, PHT	1 _s RS, 1 _F RS
RSR	38	m	cf3m; 9a	2-3xsem	SI	SI	ESQ	SI	Amig-hipoc	VPA, PB,CLB	5 _s RS,3 _F RS, 1 _s ROB, _w ROB
POL	8m	f	15d		CPG	SI	DIR	AH	HEMISF	GAR, VPA, CLB, TOPI	4_sRS, 7_FRS, 7_LRS
EDN	34	m	2a	3xs	CAT	TD	DIR	SI	Amig-hipoc		2 _s RS, 1 _L RS, _w ROB
LCA	38	m					ESQ	SI	Amig-hipoc		1 _s RS, 1 _F RS,2 _s ROB
RAO	30	m	inf		CPC	TE	ESQ	AH e	Amig-hipoc	CBZ, PB	1 _s RS
VAM	39	m	11m cf e 16a		CPC	TE	ESQ		Amig-hipoc	CBZ, VPA, LMT	3 _s RS
CWR	27	f	c/ 1a	1xm		TE	ESQ	BILAT	Amig-hipoc	VPA, ZG,CBZ, FNB	5 _s RS
SSP	34	f	muito jovem	6xm	CPC	TD	DIR	AH	Amig-hipoc	PB, CBZ, VPA	8 _s RS, 1 _F RS
CASL	43	m				TE	ESQ		Amig-hipoc		10 _s RS, 1 _F RS
BNS	15	f	1 ^a 8m				ESQ	AH		OXC, DIV	1 _s RS, 1 _F RS

ABREVIATURAS:

Identificação: Paciente (PAC) ;Idade/Sexo (I/S) Início:início das crises (INICIO);

Tipo de epilepsia (TC): crises parciais complexas (CPC), generalizadas(CPG) atônicas (CAT).

Tempo de epilepsia: (TE);

Registro de campo: EEG interictal/ictal (EEGI/IC): temporal direita (TD); Temporal esquerda (TE), bitemporal (BT)

Localização: Hemisfério Direito (DIR), esquerdo (ESQ)

Cirurgia: amigdaló-hipocampectomia (Amig-hipoc); hemisferectomia (HEMISF)

Fármacos antiepilépticas (FAE): amitriptilina, (amt)fenobarbital (PB); carbamazepina (CBZ), Clobazam (CLB), topiramato (TOP), fenitoína (PHT) valproato sódico (VPA), Trinuride (TRIE) divalproato sódico (DVPA), gardenal (GAL), oxcarbamazepina (OCBZ),

Frequência das crises (FREQ)

Ressonância Magnética (RMF) atrofia hipocampal (AH), esclerose hipocampal (EH)

Drogas antiepilépticas (DAE):

Número e padrões de disparo estudado (Cel)

Sem informação (SI)

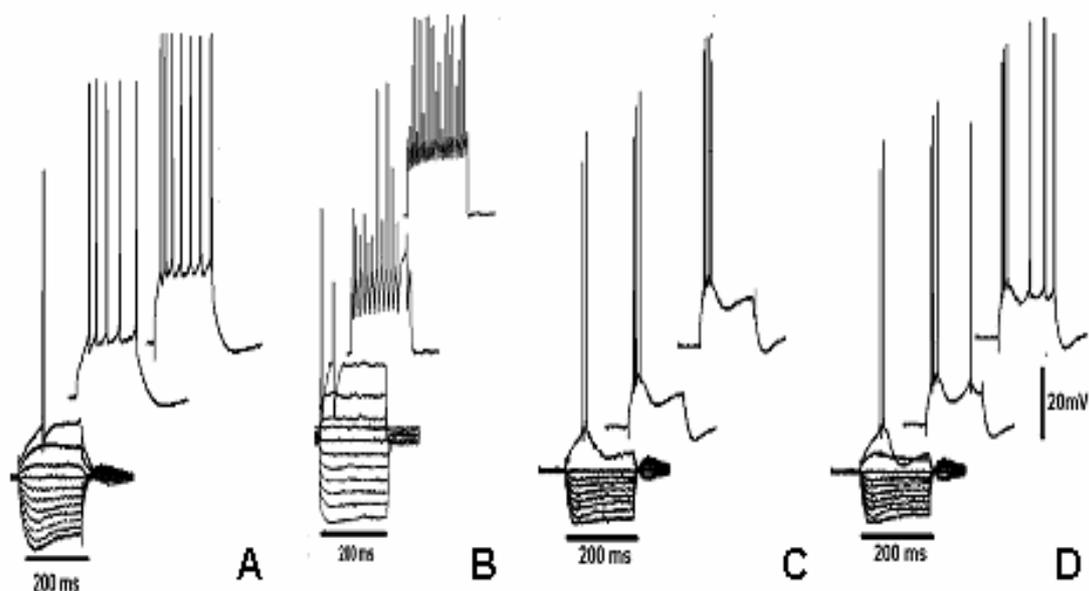


FIGURA 25. Registros Eletrofisiológicos dos 4 padrões básicos encontrados em CA1 do tecido hipocampal humano. Em A-D mostra os potenciais de ação provocados por diferentes correntes (incremento de 0.1 nA) A) neurônio RS; B) neurônio FS; C) neurônio IB e D) neurônio ROB.

NEURÔNIOS RS:

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Assim como nos outros grupos, os neurônios RS do tecido hipocampal humano em nenhum momento despolarizaram em salva. A figura 26 representa um exemplo de um neurônio RS, com morfologia piramidal. Em resposta a aplicação de pulsos supralimiáres crescentes são observadas a adaptação dos disparos. A f AHP foi freqüente em 95% (n:205) dos neurônios RS. A DAP foi observada em 43% (n:93).

Pulsos hiperpolarizantes provocaram uma variação de voltagem da membrana plasmática de -100 até -53 mV (figura 15). Quando o potencial de membrana era inferior à -80 mV, a SAG esteve presente em 47% (n:103), dos neurônios RS registrados. Houve redução do número de neurônios RS que

exibiam uma SAG evidente, quando comparados com os animais sem epilepsia e similares aos animais tratados com pilocarpina. **Ao observarmos a onda SAG observamos que a inclinação ocorria de forma gradual** (n:82), chegando a estabilização final em torno dos 180 ms ou abrupta onde a **estabilização ocorria** antes dos 120 ms (Figura 26).

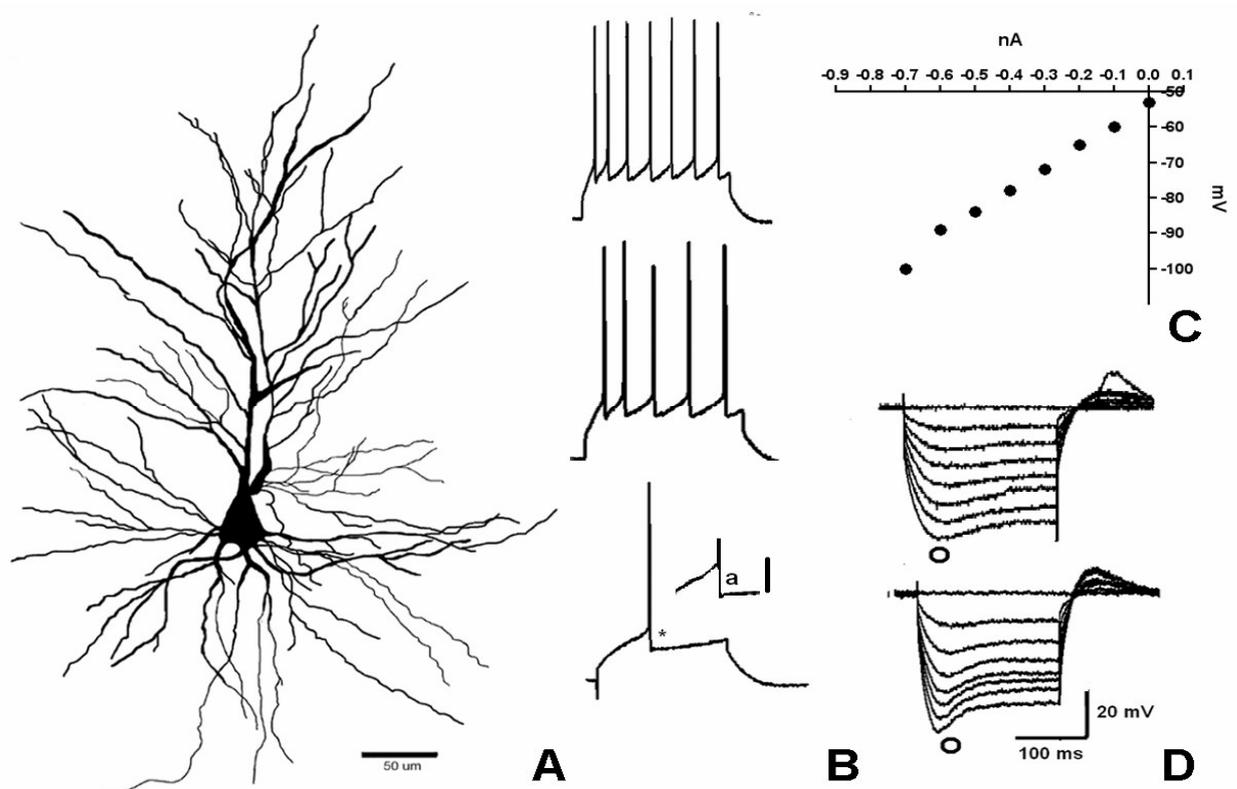


FIGURA 26 Exemplo de um neurônio RS humano. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina, desenho em câmara clara, A:200X. B-C).Características elétricas do mesmo neurônio. B) A aplicação de correntes supralimíares de crescentes provocam o aumento do número de potenciais de ação. (*) Notar presença de F AHP (a) e ausência de DAP e M AHP. C) Curva IV mostrando a variação da voltagem em resposta à aplicação de pulsos hiperpolarizantes. D) Pulsos hiperpolarizantes podem promover a ativação da corrente IH (o) duas formas: gradual (superior) ou abrupta (abaixo). OBS:A-D (superior) representam os dados do mesmo neurônio.

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL NOS NEURÔNIOS RS EM CA1 HUMANO

A diversidade do comportamento de acomodação dos neurônios RS foi maior do que nos grupos anteriores. Além da divergência temporal de acomodação, observamos que nos neurônios humanos uma pequena população de neurônios apresentou um período de latência para dispararem seus potenciais de ação. Dessa forma, o padrão RS foi subcategorizado como: RS acomodação rápida ($_F$ RS) (n: 58), acomodação lenta ($_S$ RS) (n:144) e RS de acomodação lenta porém com latência para os disparos ($_L$ RS) (n: 17). (Figura 27). A tabela 10 mostra as propriedades elétricas dos subtipos de padrões RS humanos. Na parte 2 dos resultados serão apresentados o resultado do estudo comparativo das propriedades.

Os neurônios $_F$ RS apresentaram uma frequência inicial superior aos demais subtipos de neurônios RS ($116 \text{ Hz} \pm 13$). Esta cai abruptamente estabelecendo a acomodação dos disparos ($\cong 38 \text{ Hz}$) que ocorre nos primeiros 40 ms de estimulação.

No padrão $_S$ RS, a frequência inicial dos potenciais de ação ($\leq 90 \text{ Hz}$) foi ligeiramente inferior a observada no $_F$ RS na maioria dos neurônios $_S$ RS (n:140). Em 4 neurônios entretanto, a frequência instantânea inicial atingiu a 100 Hz após aplicação de 0.8 nA. A acomodação dos disparos ocorria de forma gradual em um tempo posterior a 60 ms. As frequências de acomodação foram similares ao $_F$ RS (40 ± 8)Hz. Entre os potenciais de ação observou-se pequenas espículas despolarizantes, similares as encontradas no padrão RS dos ratos tratados com pilocarpina.

No subtipo $_L$ RS, a frequência instantânea inicial (84Hz) e o comportamento temporal de acomodação dos potenciais de ação foram similares ao grupo $_S$ RS, Contudo a frequência de acomodação (37 Hz) foi inferior ao $_S$ RS, além

disso verificamos a existência de latência para a geração do primeiro potencial de ação. Correntes supralimiáres ($\cong 0.3\text{nA}$) provocaram o aparecimento de 1-3 potenciais de ação isolados após 50 ms (50-100 ms), esta latência é mantida durante os pulsos subsequentes.

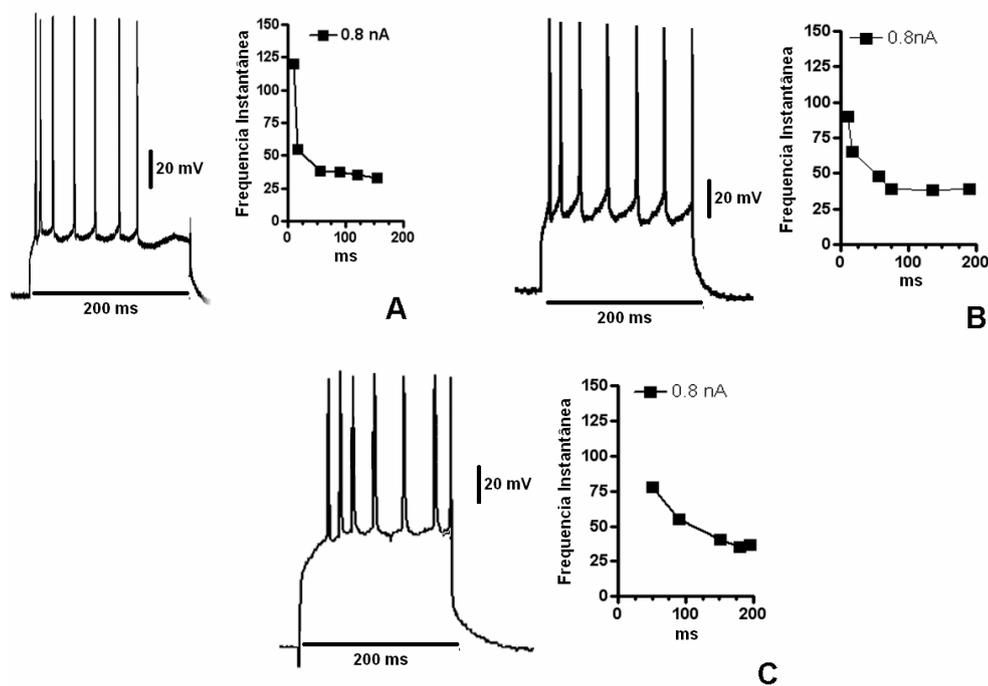


FIGURA 27: Registros eletrofisiológicos representativos das subclasses do padrão RS e suas respectivas curvas de acomodação mediante a aplicação de 0,8 nA. A) A curva do padrão fRS , caracteriza-se por apresentar potenciais com alta frequência seguido por uma queda abrupta e acomodação dos disparos antes dos 50 ms iniciais. B) No padrão sRS a frequência do primeiro intervalo é inferior ao fRS , e a acomodação é alcançada gradualmente B) No padrão lRS , existe uma latência para a geração do primeiro potencial de ação, o comportamento de acomodação é similar ao sRS .

VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS IDENTIFICADAS PELA MARCAÇÃO COM BIOCITINA:

A figura 28 mostram exemplos ilustrativos de dois neurônios piramidais RS registrados de CA1 Humano. Observe que em A, o neurônio RS apresenta-se com rica arborização dendrítica. O registro deste neurônio foi obtido de um paciente POL (Tabela 3) que não apresentava atrofia hipocampal e foi submetido a hemisferectomia. Em B) neurônio RS com pouca arborização dendrítica Os registros deste neurônio foi obtido do paciente RSR (Tabela 3) que apresentou atrofia hipocampal submetido a amigdaló-hipocampectomia.

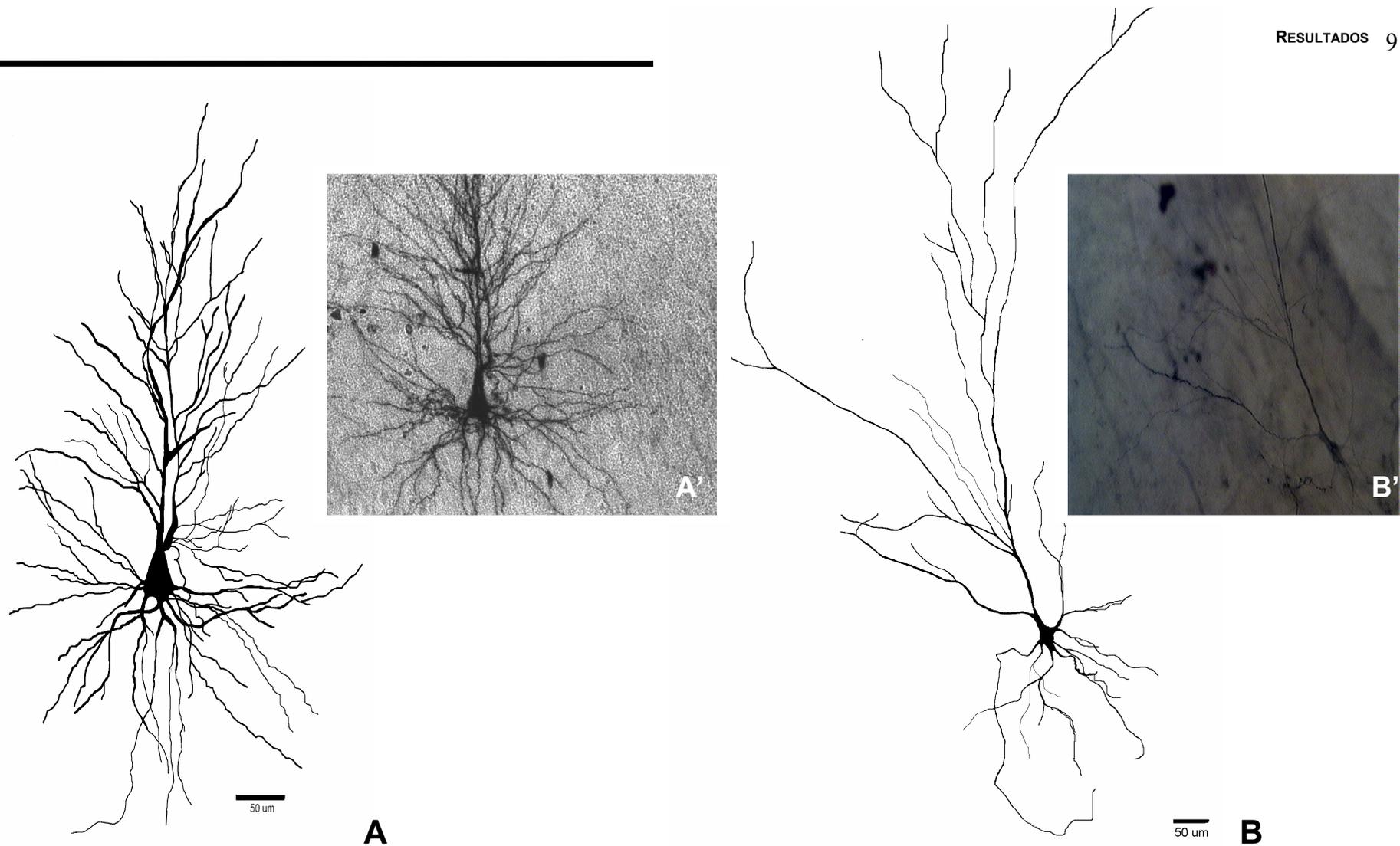


FIGURA 28: Neurônios RS marcados com biocitina. A) Desenho em câmara clara de um neurônio RS de um hipocampo sem atrofia hipocampal (20X), em A' fotomicrografia do mesmo neurônio A:200X. B) Desenho em câmara clara de um neurônio RS de um hipocampo com atrofia hipocampal (20X), em B' fotomicrografia do mesmo neurônio A:100X.

Neurônios FS:

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

O padrão FS representou uma pequena parcela das células registradas cerca de 2% (n:4). Em nosso estudo não obtivemos registros estáveis por mais de 5 minutos, o que impossibilitou a marcação intracelular desses neurônios com biocitina. Pulsos hiperpolarizantes provocaram uma variação de voltagem da membrana plasmática de -120 até -75 mV, valores mais negativos do que os demais padrões. A SAG não foi observada em nenhum dos neurônios FS.

Os potenciais de ação foram caracterizados pelos intervalos curtos (McCornick, 1985). As amplitudes dos potenciais de ação foram irregulares. Apresentaram um F AHP proeminente e M AHP ausente. A DAP, também não foi observada (Figuras 25 e 29).

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL

A característica marcante revelada pela frequência instantânea foi a ausência de acomodação dos disparos sendo mantida acima dos 100Hz (Figura 29)

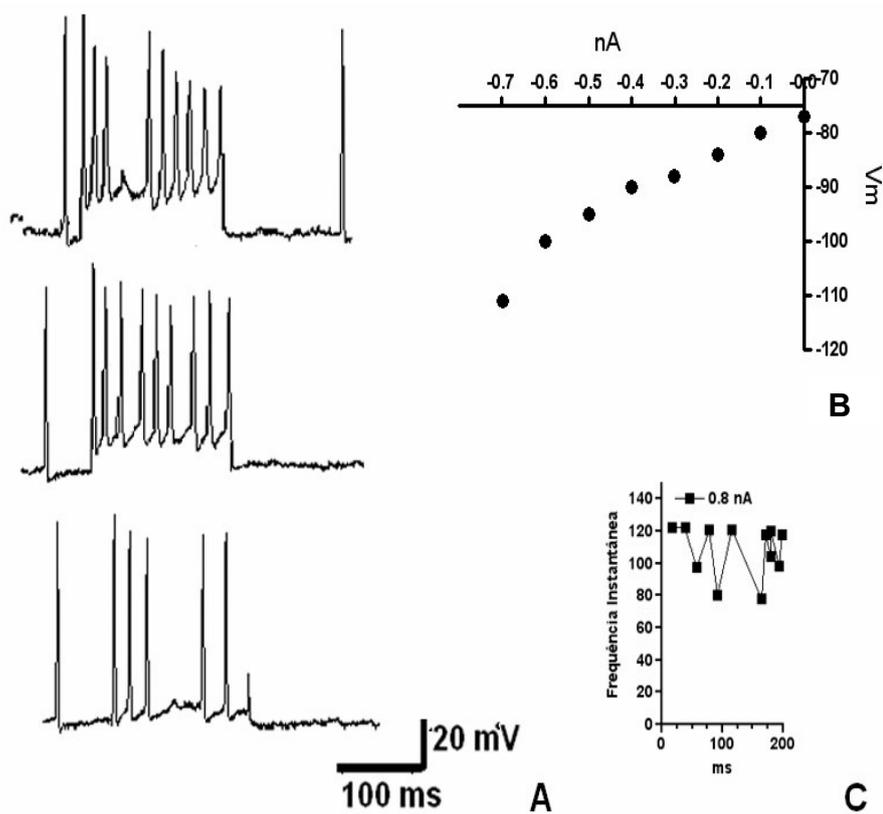


FIGURA 29 Características elétricas do padrão FS humano. A) A aplicação de correntes supralimiaries crescentes provoca o aumento do numero de potenciais de ação. (*) Notar a irregularidade das amplitudes dos potenciais B) Curva IV mostrando a variação da voltagem em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes, C) A curva de freqüência instantânea mostra a inability de acomodação dos disparos

NEURÔNIOS IB:

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Os neurônios IB representam 5% (n:13) dos neurônios de CA1 estudados. As propriedades elétricas foram sumarizadas respectivamente na tabela 8.

Nas figuras 25 e 30, mostram exemplos de um neurônio IB registrado no tecido humano, onde podem ser observado que a aplicação de pulsos supralimíares crescentes provocou uma atividade inicial dupla. Esta atividade foi observada na maioria dos neurônios IB (n:10), Em 3 neurônios IB a corrente aplicada geradora do primeiro potencial de ação provocou o aparecimento de um potencial de ação isolado. O f AHP e DAP estavam presentes após a atividade isolada.

As correntes hiperpolarizantes evidenciaram variação da voltagem da membrana -95 à -56 (Figura 30). Da mesma forma em que havíamos visto nos grupos anteriores não observamos a presença da SAG. O estudo de associação entre as frequências de SAG, f AHP e DAP do padrão IB com os demais padrões do tecido humano serão relatadas no capítulo 2.

Nas demais correntes despolarizantes não foram identificados potenciais de ação isolados após a atividade em salva

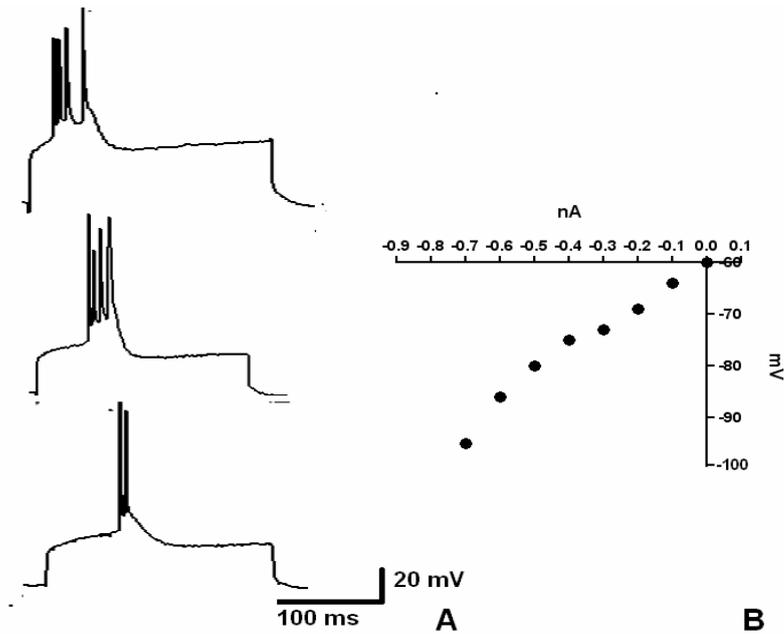


FIGURA 30 Características elétricas do padrão IB humano. A) A aplicação de correntes supralimiares crescentes provoca o aumento do número de potenciais de ação. B) Curva IV mostrando a variação da voltagem em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL VARIANTES DOS NEURÔNIOS IB EM CA1 HUMANO

Em 61% dos neurônios IB (n: 8) apresentaram acomodação dos potenciais de ação $43 (\pm 15)$ Hz ocorrendo após os 80 ms de registro, estes neurônios foram classificados como "IB" com acomodação presente ($_A$ IB) (Figura 31). A frequência instantânea inicial ($90 \text{ Hz} \pm 10$) foi similar aos $_S$ RS humano e $_S$ RS e IB de ratos após a aplicação de 0.8 nA

Assim como nos ratos tratados com pilocarpina, registramos um segundo tipo de neurônios IB, onde não foi observada acomodação dos potenciais – $_W$ IB em 39% (n:5). A frequência foi mantida a valores superiores a

100 Hz antes da interrupção brusca. Dentro do padrão wIB foi identificado primeiro potencial de ação isolado. Além disso, a atividade em salva era interrompida antes dos 150ms (Figura.31)

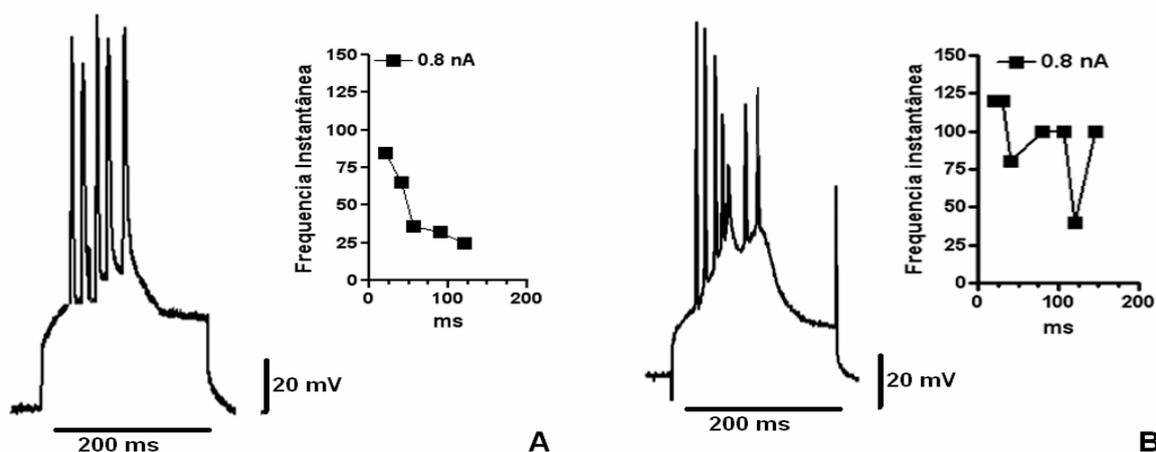


FIGURA31: Registros eletrofisiológicos representativos e comportamento de acomodação dos potenciais de ação das subclasses do padrão IB mediante a aplicação de 0,8 nA. A) A curva do padrão AIB , caracteriza-se por apresentar acomodação B) No padrão wIB caracteriza-se

Neurônios ROB:

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

Esta classe representa 11% (n:29) dos neurônios hipocâmpais humanos. A figura 32 mostra o aspecto morfológico de um neurônio ROB e algumas características eletrofisiológicas do disparo. A aplicação de correntes supralimbiares provocaram o aparecimento de atividade dupla em 69% (n:20). Em média, a variação de voltagem da membrana foi de -100 até -58 mV

A SAG estava presente em 69% das células registradas (n:20). Além disso, assim como nos neurônios RS, verificamos que a inclinação da SAG podia ser gradual (fig:33AC) (n:14), chegando a estabilização final em torno dos 180 ms ou abrupta onde a estabilização ocorria antes dos 120 ms (fig:33BD) (n:6)

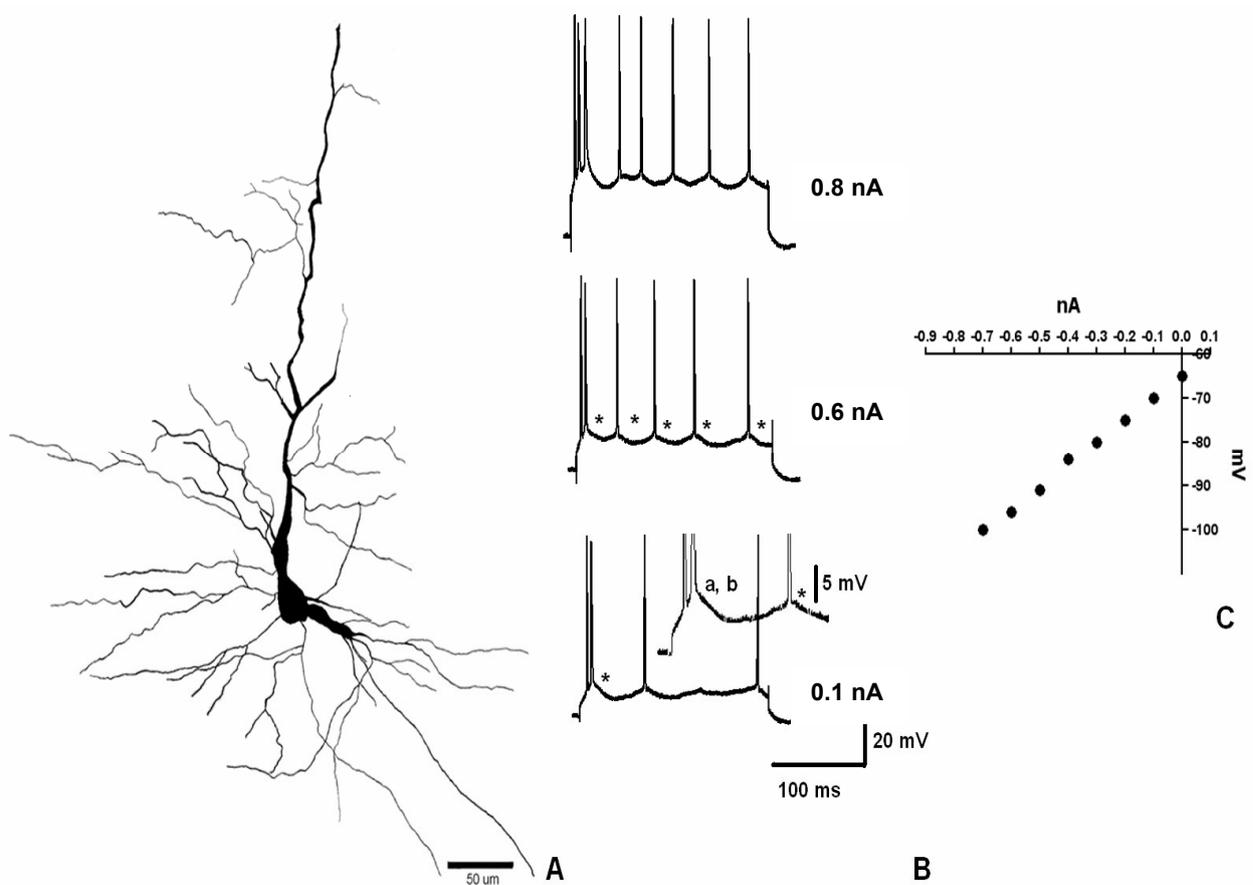


FIGURA 32. Neurônio ROB de CA1 humano. A) Identificação morfológica do neurônio piramidal marcado pela biocitina - desenho em câmara clara, A:200X. B-C).Características elétricas do mesmo neurônio. B) A aplicação de correntes supralimíares crescentes provoca o aumento do número de potenciais de ação, inicialmente com uma atividade em doublet com a presença de f AHP (a); DAP e (b) M AHP.(c) que podem persistir durante a estimulação (*). C) Curva IV mostrando variação da voltagem em resposta a aplicação de pulsos hiperpolarizantes.

ESTUDO DA ACOMODAÇÃO NEURONAL VARIANTES DOS NEURÔNIOS ROB EM CA1 HUMANO

Para a subcategorização deste padrão, foram aplicados os mesmos critérios usados para o grupo de ratos, onde a presença de acomodação e o seu comportamento temporal foram determinantes. Dessa forma foram identificados: ROB com acomodação rápida (F_{ROB}); acomodação lenta (S_{ROB}) ou ainda acomodação ausente (W_{ROB}) (figura 33)

Os neurônios F_{ROB} representam 42% dos neurônios ROB. Apresentam atividade dupla no ICAP. A SAG invertida também estava presente na maioria dos neurônios registrados com este padrão (Figura33_{A1}). A atividade em salva composta por no máximo 3 espículas, sem DAP após a atividade em salva durante a aplicação de pulsos elevados supralimíares elevados (Figura 33_{A1-3}). A frequência inicial era superior à 200 Hz (220 ± 20) seguida por uma queda abrupta chegando à acomodação dos disparos ($\approx 40\text{Hz}$) ocorrendo em torno dos 50 ms (50 ± 13) (Figura33_{A4}).

Os neurônios S_{ROB} representam 45% do padrão ROB. Eles foram caracterizados pela presença de potenciais de ação isolados em resposta ao ICAP. Assim como no grupo F_{ROB} , a SAG e a SAG invertida também estavam presentes nos neurônios S_{ROB} registrados (Figura26_{B1}). A atividade em salva era composta por no máximo 3 espículas seguida pelas F_{AHP} , DAP e o M_{AHP} independente da corrente aplicada. (Figura33_{B1-3}). A frequência de disparo inicial era elevada porém inferior ao F_{ROB} ($<170\text{Hz}$) seguida por queda gradual chegando à acomodação dos disparos ($\approx 40\text{Hz}$) ocorrendo após 80 ms (Figura33_{B4}).

Um pequeno grupo de neurônios ROB difere dos demais pela inability de acomodação dos disparos, os w ROB representam 13% do padrão ROB. A primeira atividade provocada pelo ICAP é composta por uma atividade em salva com no mínimo 3 disparos, sendo que entre eles e após a salva o f AHP encontra-se com amplitudes elevadas. Após a atividade em salva, o DAP e o m AHP também foram observados independente da corrente aplicada. (Figura 33_{CD1-3}). A atividade em salva pode ser seguida ou por potenciais de ação isolados, com características distintas dos demais ROB, ou por nova atividade em salva (n:4). A análise da frequência instantânea, não evidenciou acomodação dos disparos, pois a frequência foi mantida acima dos 90Hz (Figura33_{CD4}). Embora tenha se verificado a presença de um exemplar w ROB em ratos controles.

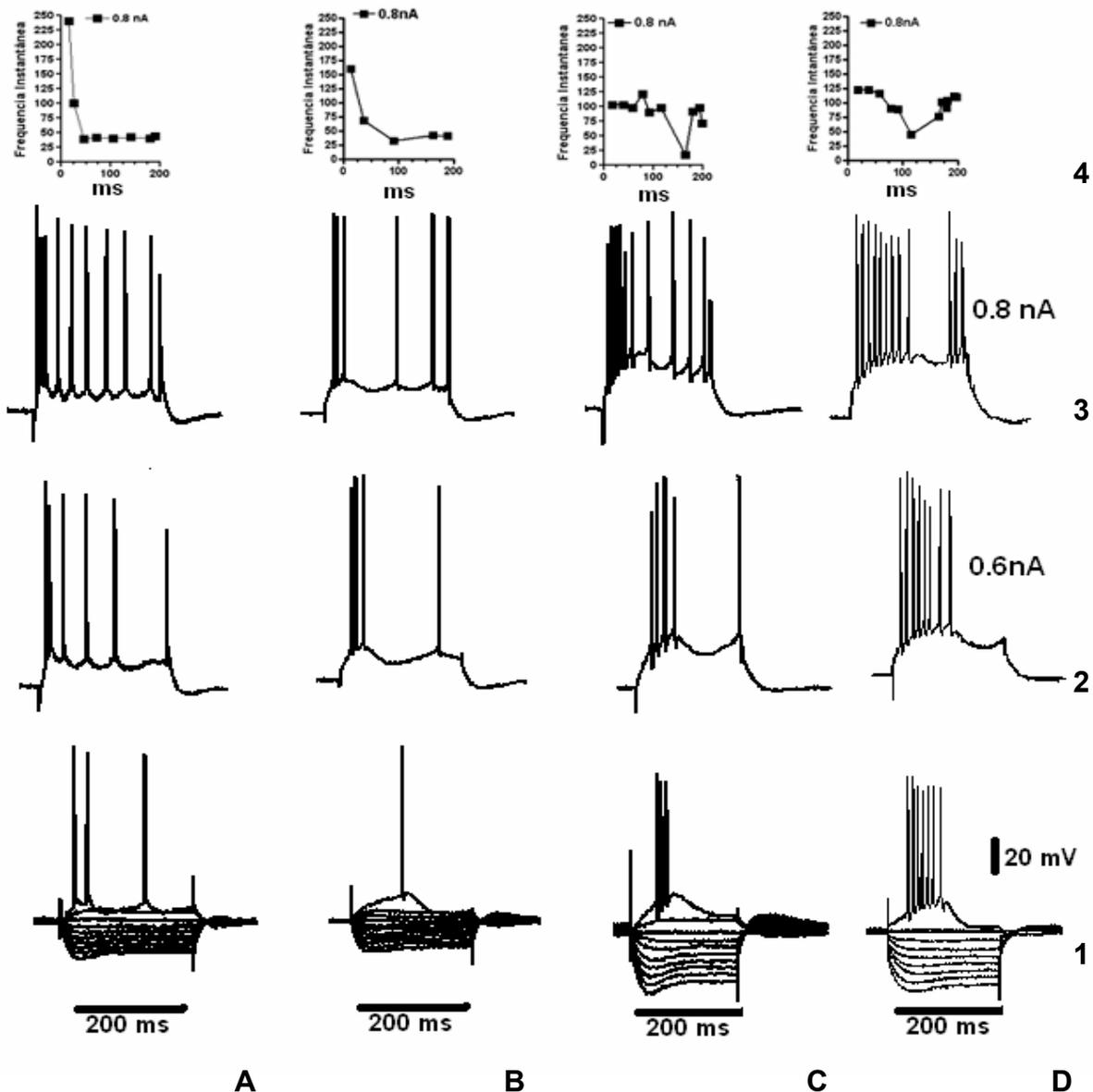


FIGURA 33. Registros eletrofisiológicos representativos dos subtipos dos neurônios ROB registrados de tecido humano. Em A-D mostra os diferentes subtipos deste padrão respondendo à aplicação de correntes hiperpolarizantes e despolarizantes (1-3) e as respectivas curvas das frequências instantâneas (CFI). Em A) –mostra o padrão f ROB- Notar a atividade dupla com ausência de FAHP, DAP e mAHP (1-3) e a CFI mostra a rápida acomodação dos potenciais de ação (4). Em B) padrão s ROB mostra a CFI com acomodação lenta dos potenciais de ação (4). Em C-D) padrão w ROB com duas CFIs mostrando a ausência de acomodação dos potenciais de ação (4). Notar que a aplicação de correntes elevadas pode provocar, após a atividade em salva inicial, o aparecimento de potenciais isolados (C) ou uma nova atividade em salva (D). Notar: em B-D a presença de f AHP, DAP e mAHP. Em A e C a SAG inclinação abrupta (antes dos 100 ms) Em B-D C a SAG é inclinação gradual (posterior a 100 ms)

TABELA 4. Propriedades elétricas medidas das três classes principais de neurônios de CA1 do tecido Hipocampal Humano.

<i>Propriedades</i>	fRS	lRS	sRS	FS	IB	fROB	sROB	wROB
PM (mV)	-68.51±5.96 (n:58)	-72.64±6.99 (n:17)	-67.38±5.13 (n:144)	-78.25±2.36 (4)	-63.88±4.34 (n:13)	-71.09±4.48 (n:11)	-69.88±8.40 (n:13)	-75 ±10.2 (n:4)
IR (mW)	37.15±7.71 (n:56)	28.51±6.19 (n:17)	34.99±13.02 (n:140)	52.42 ±2.18 (4)	35.27±8.83 (n:13)	29.39±19.08 (n:11)	34.32±3.82 (n:13)	44.75±11.87 (n:4)
TC (ms)	11.70±1.44 (n:50)	11.93±1.05 (n:17)	11.20±1.21 (n:131)	14.75±1.25 (n:4)	13.45±2.02 (n:13)	11.69±1.84 (n:11)	11.88±1.69 (n:13)	13.83±0.28 (n:4)
ICAP (nA)	0.20±0.14 (n:57)	0.14±0.25 (n:17)	0.20±0.20 (n:142)	0.22 ±0.05 (n:4)	0.21 ±0.12 (n:13)	0.23±0.13 (n:11)	0.21±0.10 (n:13)	0.13±0.11 (n:4)
LIM(mV)	-52.28±8.43 (n:57)	-49.52±8.29 (n:17)	-46.29±23.6 (n:142)	-63.50±3.69 (n:4)	-52.46±6.52 (n:13)	-53.03±6.08 (n:11)	-52.28±8.43 (n:13)	-63.7±15.34 (n:4)
AMP (mV)	83.62±4.25 (n:57)	86.17±3.73 (n:17)	84.91±5.24 (n:142)	83.62±4.25 (n:4)	82.1±10.41 (n:13)	84.09±5.20 (n:11)	82.53±7.74 (n:13)	83.25±12.4 (n:4)
DUR (ms)	3.6±0.99 (n:53)	3.53±0.99 (n:17)	3.5±1 (n:138)	2.75±1 (n:4)	2.30±0.99 (n:13)	2.4±0.99 (n:11)	2.90±0.98 (n:13)	2.5±1 (n:4)

Abreviaturas: -potencial de membrana (PM); resistência de entrada (IR), constante de tempo (TC); limiar do 1° potencial de ação (LIM); amplitude do 1° potencial de ação (AMP), duração do do 1° potencial de ação (DUR)

SUMÁRIO DAS CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS PADRÕES DE DISPARO DOS GRUPOS: RATOS CONTROLES, RATOS TRATADOS E TECIDO HUMANO.

DISTRIBUIÇÃO DOS PADRÕES DE DISPARO BÁSICOS NA ÁREA DE CA1 HIPOCAMPAL

A Figura 34 mostra indicativos da distribuição dos padrões básicos encontrados nos três grupos de estudo. O padrão RS foi predominante nos grupos estudados. Dos 93 neurônios registrados no grupo de ratos controles, 70% (n:65) apresentaram características RS. No grupo de ratos tratados, dos 45 neurônios estudados, 51% (n:23) apresentavam esta característica. No tecido humano verificamos que, dos 265 neurônios estudados, 219 apresentaram características RS, representando 80% dos neurônios estudados.

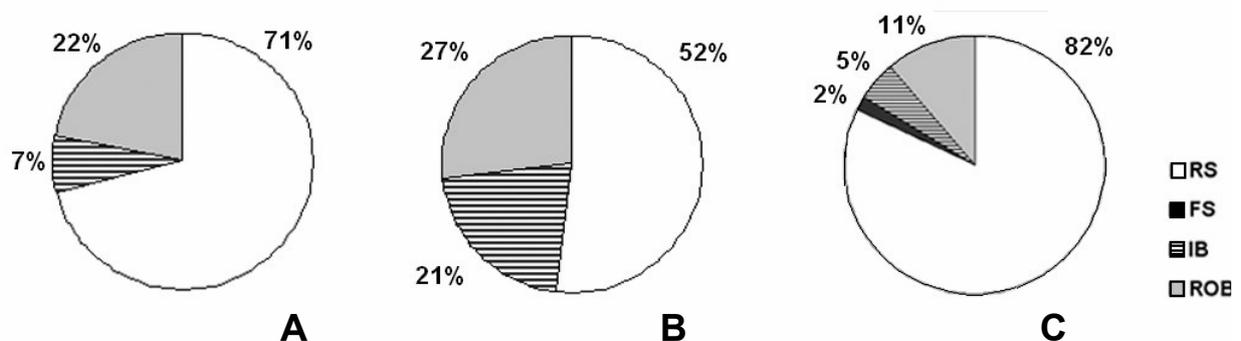


FIGURA 34. Distribuição (em porcentagem) das principais classes de disparo neuronal encontrado em ratos controles (A); ratos tratados com pilocarpina (B) e tecido hipocampal humano (C). Notar: redução de neurônios com disparo RS e o aumento dos neurônios com atividade em salva nos ratos tratados com pilocarpina. Porcentagem elevada dos neurônios RS no tecido humano. Abreviaturas: RS- Regular Spiking*; FS- Fast Spiking*; IB-Intrinsic Bursting*; ROB-Repetitive Oscillatory Bursting.

Nesta primeira parte dos resultados buscamos fazer uma descrição dos padrões observados nos três grupos de estudo. Na tabela 5 estão sumarizadas os principais achados encontrados na primeira parte deste estudo.

TABELA 5- Sumário dos principais achados encontrados em ratos controles, ratos tratados com pilocarpina e tecido hipocampal Humano.

	PADRÕES	O%	PA isolado*	PA em salva	% SAG	% de F AHP	% de DAP	Fr. Inic (Hz)*	Acomod (ms)*	Fr Acomod (Hz)*
Ratos Controles	RS:	71	+	-	60	57	44			
	F _{RS}	60			61	64	54	140 ±15,65	21,28±14,49	30± 6
	S _{RS}	40			57	46	31	80 ±10	55,7±11,7	31± 7
	L _{RS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IB									
	A _{IB}	7	-	+	-	-	NM	85 ±13	70± 10	35±12
	W _{IB}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ROB									
	F _{ROB}	22	+	+	71,42	85	52,38			
S _{ROB}	33			57,14	100	71,42	230±25,39	50± 5	36 ± 3	
W _{ROB}	62			69,2	100	76,9	157 ±6,41	65 ± 8	38	
	4	-	+	100**	100	100%	90	-	-	
RATO TRATADO COM PILOCARPINA	RS:	52	-	-	47	78	50			
	F _{RS}	30,43			43	72	57	120±21,44	34±12	37±8
	S _{RS}	69,57			50	81	43	89±10	60±11,4	45±6
	L _{RS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IB									
	A _{IB}	21	+	+	-	20	20	78±6,93	~80	37±11
	W _{IB}	70	-			**	**	100		
	30	2								
	ROB									
F _{ROB}	27	+	+	83	75	67	200±40,12	45±3	39±10	
S _{ROB}	41			60	85	60	140±27,2	65±10	42±7,2	
W _{ROB}	59			100	66	71	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO	RS:	82	+	-	47	95	43			
	F _{RS}	27			26	98	75	116±13	~40	38±5
	S _{RS}	66			52	92	36	90±11	~70	41±5,1
	L _{RS}	7			76	100	41	84±8,9	~160	37±3,5
	FS	2	+	-	-	100		120±10	-	-
	IB									
	A _{IB}	5	+	+	-	23	23,07			
	W _{IB}	61				0	0	90±11	60 ± 7	40±9
	39					60	60	~100		
	ROB									
F _{ROB}	11	+	+	69	77%	65				
S _{ROB}	42			72	75	66	220±20	50±13	38	
W _{ROB}	45			78	84	61	150±23	100±20	40	
	13			50	75	75	120			

Abreviaturas:

Percentual de observações (O%)
Presença de potenciais de ação isolados (PA isolado)
Presença de atividade em salva (PA em Salva)
Ausente (-), Presente (+), não mensurado (Nm)
Percentual de FAHP (%_FAHP)
Percentual de (% DAP)
Frequência instantânea inicial (Fr. Inic)*
Tempo de acomodação (Acomod)*
Frequência de acomodação (Fr Acomo)

**PARTE II: PROPRIEDADES ELÉTRICAS NOS PADRÕES DE DISPARO OBSERVADOS
DO TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:**

O estudo das propriedades elétricas entre os padrões de disparo do tecido humano será apresentado em dois momentos. Primeiramente, serão comparadas as médias das propriedades eletrofisiológicas dos padrões de disparo encontrados no tecido humano através de uma análise quantitativa. Posteriormente serão apresentados os resultados da análise qualitativa realizada através de testes de associação.

Nas duas análises, foram considerados como diferenças estatisticamente significativas qualquer valor de $P < 0.05$ ($\alpha = 5\%$).

Os resultados deste estudo foram organizados de acordo com a propriedade elétrica mensurada.

ANÁLISE DAS VARIÁVEIS QUANTITATIVAS

A análise estatística usada para detectar diferenças entre as propriedades elétricas dos padrões de disparo do grupo (tecido humano) foi a Análise de Variância Fatorial com um fator. Os parâmetros analisados foram: potencial de membrana (PM); resistência de entrada (IR); constante de tempo (TC); corrente injetada para o primeiro potencial de ação (ICAP), Limiar para o primeiro potencial de ação (LIM), amplitude (AMP) e duração (DUR) do primeiro potencial de ação. O fator em estudo foi Grupo com 1 nível (tecido humano) e Padrão com 8 níveis.

POTENCIAL DE MEMBRANA (PM):

As médias dessa propriedade precisaram ser ponderadas pelo método de mínimos quadrados, onde o valor da variância foi usado para a composição dos pesos. Através da análise de variância da propriedade PM (Tabela 6) pôde ser observado a existência de diferença significativa entre as médias dos padrões ($P < 0.01$) em relação a propriedade.

Através do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, observamos que existem diferenças significativas entre a médias do PM dos neurônios com padrão IB, ao nível de significância de 5% com $_{F}RS$ ($P = 0.01$), $_{L}RS$ ($P = 0.03$), $_{FS}$ ($P < 0.01$), $_{F}ROB$ ($P < 0.01$), $_{S}ROB$ ($P = 0.02$) e $_{W}ROB$ ($P < 0.01$). O padrão IB foi mais eletropositivo que os demais padrões. Em um outro extremo as células FS foram as mais eletronegativas. Os neurônios que apresentam o padrão FS diferem com nível de significância de 5% com os padrões $_{F}RS$ ($P < 0.01$), $_{L}RS$ ($P < 0.01$), $_{IB}$ ($P < 0.01$); $_{F}ROB$ ($P < 0.01$), $_{S}ROB$ ($P < 0.01$) (Tabela 7).

RESISTÊNCIA DE ENTRADA (IR)

A tabela 6 mostra a análise de variância da IR, onde foi verificada diferença significativa entre as médias dos padrões ($P=0.002$) em relação à propriedade. A resistência do padrão FS encontrava-se mais elevada, diferindo estatisticamente, com nível de significância de 5%, dos padrões sRS ; lRS e $fROB$ calculada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O padrão lRS apresentou resistência de entrada inferior aos demais (tabela 7), entretanto este valor não foi estatisticamente significativo.

CONSTANTE DE TEMPO (TC)

As médias dessa propriedade foram ponderadas pelo método de mínimos quadrados, onde o valor da variância foi usado para a composição dos pesos. A tabela 6 mostra a análise de variância da TC, onde foi verificada diferença significativa entre as médias da propriedade entre os padrões ($P<0.01$) em relação à propriedade.

A TC dos neurônios com o padrão FS encontrou-se mais elevada que os demais padrões, diferindo estatisticamente, com nível de significância de 5%, dos padrões fRS ($P=0,02$); sRS ($P<0,001$); $sROB$ ($P=0,02$) e $fROB$ ($P=0,02$) (tabela 12). Já o padrão sRS apresentou uma TC inferior, diferindo dos padrões FS, IB e $wROB$ (tabela 7). com os mesmos 5% de significância

CORRENTE INJETADA PARA O PRIMEIRO POTENCIAL DE AÇÃO (ICAP)

Através da análise de variância, verificamos que não houve diferença significativa entre as médias do fator padrão ($p=0,09$) (Tabela 6)

LIMIAR DO PRIMEIRO POTENCIAL DE AÇÃO (LIM):

Verificamos que não houve diferença significativa entre as médias da propriedade em relação ao padrão ($p=0,09$) na análise de variância (tabela 6).

DURAÇÃO DO PRIMEIRO POTENCIAL DE AÇÃO (DUR)

As médias da DUR foram ponderadas pelo método de mínimos quadrados e o valor da variância foi usado para a composição dos pesos. A tabela 6 mostra a análise de variância, sendo verificada diferença significativa entre as médias da propriedade em relação aos padrões ($P<0.01$).

O subtipo ${}_F$ RS diferiu estatisticamente, com nível de significância de 5%, dos padrões IB, ${}_F$ ROB e ${}_W$ ROB.

AMPLITUDE DO PRIMEIRO POTENCIAL DE AÇÃO (AMP)

As médias do AMP precisaram de ponderação pelo método de mínimos quadrados, cujo o valor da variância foi usada para a composição dos pesos.

A tabela 22 mostra a análise de variância da propriedade AMP e através dessa análise pôde ser observado que existe diferença significativa entre as médias da propriedade em relação aos padrões ($P=0.049$).

Utilizando o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer não foi possível determinar o padrão que difere dos demais. Desta forma foi aplicado um segundo teste, o teste DMS. A tabela 12, mostra que as amplitudes do padrão ${}_S$ RS são similares aos padrões ${}_L$ RS e FS porém diferem estatisticamente demais padrões. Os padrões ${}_S$ RS e IB representam os dois extremos, o primeiro caracteriza a AMP mais elevada e o segundo, inferior.

TABELA 6- análise de variância das propriedades eletrofisiológicas mensuradas no tecido hipocampal humano

Variação	Propriedades						
	PM*	IR	TC*	ICAP	LIM*	AMP*	DUR
GL Padrão	7	7	7	7	7	7	7
erro	256	248	240	251	254	255	253
Total corrigido	263	255	247	258	261	262	260
F calculado	14.43	3.20	28.83	0.36	1,74	2,05	13,74
Pr> F	0,0001	0,002	0,0001	0,9	0,09	0,049	0,0001

GL = grau de liberdade. *Calculado a partir das médias ponderadas

TABELA 7- Comparações Múltiplas das propriedades mensuradas no tecido hipocampal humano

Parâmetros	PM	IR	TC	DUR	AMP	N
Padrões						
_F RS	-68.51 bc	37.15 a,b	11.7 cd	3.6a	83.6 b	58
_S RS	-67 a,b	34.99 b	11.2 d	3.5 ab	86.1 a	144
_L RS	-72 bcdef	28.51 b	11.69 abcd	3.53ab	84.9 a,b	17
FS	-78.25 f	52.42 a	14.75 a	2.7abc	83.75 a,b	4
IB	-63.88 a	35.27 ab	13.45 abc	2.3c	80.84 b	13
_F ROB	-71.08 bcde	29.39 b	11.69 cd	2.4c	84.09 a,b	11
_S ROB	-69.88 bcd	34.32 ab	11.88 cd	2.9abc	82.53 b	13
_w ROB	-75 bcdf	44.75 a,b	13.83 a,b	2.5c	83.20b	4

Letras minúsculas a direita das médias comparam linhas dentro da mesma coluna

ANÁLISE DAS VARIÁVEIS QUALITATIVAS

Na análise das variáveis qualitativas foi aplicado teste de associação quanto à presença e ausência em relação ao padrão. Os parâmetros avaliados foram: onda despolarizante ativada durante a aplicação de pulsos hiperpolarizantes (SAG), hiperpolarização pós-potencial rápida (_FAHP), hiperpolarização pós-

potencial média (m AHP) e despolarização pós-potencial (DAP). A tabela 8 representa número de observações do parâmetro. O teste utilizado nesta análise foi o Qui-quadrado (χ^2) de Associação, exato de Fisher unilateral com $P < 0.05$. Os resultados foram determinados a partir das seguintes combinações:

Entre Grupos

- ROB X IB
- RS X IB
- ROB X RS
- RS X FS

Dentro dos subtipos

- s RS X L RS
- s RS X F RS
- F RS X L RS
- F ROB X s ROB
- F ROB X w ROB
- s ROB X w ROB

TABELA 8: Presença dos parâmetros qualitativos nos 4 padrões básicos registrados em CA1 humano

Padrão	Características			
	IH	DAP	AHP	mAHP
<i>RS</i>	103 (219)	93 (216)	205(216)	68(214)
FS	0 (4)	0(4)	4(4)	0(4)
IB	0 (13)	3 (13)	3 (13)	7(13)
ROB	20 (29)	19(29)	22(29)	16(29)
Total	123 (265)	107	231	91

Número de observações, entre parênteses representam o número total de neurônios

ENTRE OS PADRÕES IB X ROB

- .PRESENÇA DE SAG:

A SAG esteve ausente nos neurônios IB e presente na maioria dos neurônios ROB estudados. A tabela 9 mostra a frequência desta característica e os resíduos ajustados, através destes foi verificado que a sua presença está

associada ao padrão ROB e ausência de SAG está associada ao padrão IB Os valores positivos em negrito mostram a associação. O teste χ^2 de Fisher apresentou $P < 0.001$, confirmando associação entre padrão e propriedade

- PRESENÇA DE F AHP

Verificamos que a presença de FAHP está associada ao padrão ROB e sua ausência está associada ao padrão IB (tabela 9) O teste χ^2 exato de Fisher revelou um $P = 0.023$.

- PRESENÇA DE DAP

A presença de DAP está associada ao padrão ROB e sua ausência está associada ao padrão IB (tabela 9) O teste χ^2 exato de Fisher revelou um $P = 0.01$.

- PRESENÇA DE M AHP

A propriedade M AHP esteve presente em 15 neurônios com o padrão ROB e 7 neurônios com padrão IB. O teste χ^2 Exato de Fisher, não revelou associação entre o padrão e a presença desta característica ($P = 0.53$).

TABELA 9- Ajustes Residuais da presença dos parâmetros qualitativos entre os padrões IB X ROB registrados no tecido hipocampal humano

SAG		IB	ROB	TOTAL
Ausência	Observado	13	8	21
	Esperado	6.7	14.3	21
	Ajuste residual	4.3	-4.3	
Presença	Observado	0	21	21
	Esperado	6.3	13.7	21
	Ajuste residual	-4.3	4.3	
Total	Contado	13	29	42
	Esperado	13	29	42
FAHP				
Ausência	Observado	10	6	16
	Esperado	5.2	10.8	16
	Ajuste residual	2.3	-2.3	
Presença	Observado	3	22	25
	Esperado	6.8	19.2	25
	Ajuste residual	-2.3	2.3	
Total	Contado	13	29	42
	Esperado	13	29	42
DAP				
Ausência	Observado	10	10	20
	Esperado	4.7	15.3	20
	Ajuste residual	3.6	-3.6	
Presença	Observado	3	19	22
	Esperado	8.3	13.7	22
	Ajuste residual	-3.6	3.6	
Total	Contado	13	29	42
	Esperado	13	29	42

P (calculado pelo Teste exato de Fisher) para a presença de SAG <0.001; presença de FAHP =0.023; presença de DAP =0.01. Os valores em negrito representam associação característica-padrão

ENTRE OS PADRÕES RS X IB

- PRESENÇA DE SAG:

A presença de SAG está associada ao padrão ROB e a ausência está associada ao padrão IB (tabela 10). (Teste exato de Fisher P<0.001)

- PRESENÇA DE F AHP:

A presença de FAHP está associada ao padrão ROB, enquanto que sua ausência está associada ao padrão IB (tabela 10). (teste χ^2 de Fisher, $P < 0.001$).

- PRESENÇA DE DAP:

Verificamos que a presença de DAP está associada ao padrão RS e ausência associada ao IB observada através dos resíduos ajustados (tabela 16). (teste χ^2 de Fisher, $P = 0.01$).

- PRESENÇA DE M AHP

Assim como no estudo comparativo entre ROB x IB, verificamos a inexistência de associação entre RSX IB, onde a propriedade esteve presente em 68 neurônios com padrão de disparo RS e 7 neurônios IB. (teste exato de Fisher, $P = 0.08$)

TABELA 10- Ajustes Residuais da Presença dos parâmetros qualitativos entre os padrões RS X IB registrados no tecido hipocampal humano

SAG		RS	IB	TOTAL
Ausência	Observado	116	13	129
	Esperado	119.2	7.2	127
	Ajuste residual	-3.3	3.3	
Presença	Observado	103	0	103
	Esperado	97.2	5.8	103
	Ajuste residual	3.3	-3.3	
Total	Contado	219	13	232
	Esperado	219	13	232
FAHP				
Ausência	Observado	11	10	21
	Esperado	15	6	21
	Ajuste residual	-4.6	4.6	
Presença	Observado	205	3	208
	Esperado	200.9	7.8	208
	Ajuste residual	4.6	-4.6	
Total	Contado	216	13	229
	Esperado	216	13	229
DAP				
Ausência	Observado	123	10	133
	Esperado	127.1	5.9	133
	Ajuste residual	-2.4	2.4	
Presença	Observado	93	3	96
	Esperado	88,2	7.8	96
	Ajuste residual	2.4	-2.4	
Total	Contado	216	13	229
	Esperado	216	13	229

P (calculado pelo Teste Exato de Fisher): Para a presença de SAG- $P < 0.01$; para a presença de FAHP- $P = 0.001$; presença de DAP- $P = 0.01$.

Os valores em negrito representam associação característica-padrão

ENTRE OS PADRÕES RS X ROB

- PRESENÇA DE SAG:

Neste estudo de associação verificamos que a presença de SAG está associada ao padrão ROB e a ausência está associada ao padrão RS (tabela 11). (teste χ^2 exato de Fisher, $P=0.01$).

- PRESENÇA DE F AHP:

De posse destes dados verificamos que a presença está associada ao padrão RS e sua ausência está associada ao padrão ROB (tabela 11). (teste χ^2 exato de Fisher $P=0.007$

- PRESENÇA DE DAP:

Verificamos que a ausência de DAP está associada ao padrão RS enquanto que sua presença está associada ao ROB (Tabela 11). (teste χ^2 exato de Fisher $P<0.001$).

- PRESENÇA DE M AHP

Através destes ajustes foi observado que existe associação quanto a ausência de M AHP estar associada ao padrão RS e sua presença, com o padrão de disparo ROB (Tabela 11). (teste χ^2 exato de Fisher $P=0.007$).

TABELA 11- Ajustes Residuais da Presença dos parâmetros qualitativos entre os padrões RS X ROB registrados no tecido hipocampal humano

SAG		RS	ROB	TOTAL
Ausência	Observado	116	9	125
	Esperado	104	13	125
	Ajuste residual	2.4	-2.4	
Presença	Observado	103	20	123
	Esperado	108.9	14.1	123
	Ajuste residual	-2.4	2.4	
Total	Contado	219	29	248
	Esperado	219	29	248

F_{AHP}				
Ausência	Observado	11	6	17
	Esperado	15	2	17
	Ajuste residual	-3.2	3.3	
Presença	Observado	205	23	228
	Esperado	200.9	26	228
	Ajuste residual	3.2	-3.2	
Total	Contado	216	29	245
	Esperado	216	29	245

DAP				
Ausência	Observado	123	9	132
	Esperado	116.3	15.7	132
	Ajuste residual	2.7	-2.7	
Presença	Observado	93	20	113
	Esperado	100	13	113
	Ajuste residual	-2.7	2.7	
Total	Contado	216	29	245
	Esperado	216	29	245

M_{AHP}				
Ausência	Observado	147	12	159
	Esperado	140.6	18.4	159
	Ajuste residual	2.7	-2.7	
Presença	Observado	88	17	87
	Esperado	83.9	9.6	87
	Ajuste residual	-2.7	2.7	
Total	Contado	214	29	243
	Esperado	214	29	243

P (calculado pelo *Teste Exato de Fisher*) para a presença de SAG=0.014; para a presença de FAHP=0.004, para a presença de DAP <0.001, para a presença de MAHP=0.007.

Os valores em negrito representam associação característica-padrão

PADRÕES RS X FS

- PRESENÇA DE SAG:

A SAG esteve ausente em todos os neurônios FS registrados e presente em 103 neurônios RS. Comparando a presença de SAG entre RS X FS, não foi observada associação. (teste χ^2 exato de Fisher $P=0.08$).

- PRESENÇA DE FAHP:

A F_{AHP} esteve presente em todos os neurônios FS registrados e em 205 neurônios RS. A comparação entre a presença da propriedade e os padrões não revelou associação (teste χ^2 exato de Fisher $P=0.81$).

- PRESENÇA DE DAP:

A DAP esteve ausente nos neurônios com padrão FS registrados e presentes em 93 neurônios RS. A comparação entre os padrões não revelou associação. O (teste χ^2 exato de Fisher $P=0,127$)

- PRESENÇA DE M_{AHP}

A M_{AHP} esteve ausente nos neurônios FS registrados e presentes em 68 neurônios com padrão RS. A comparação entre os padrões não revelou associação, as observações estão na tabela 37. (teste χ^2 exato de Fisher $P=0,27$)

ENTRE SUBTIPOS DE RS: sRS X LRS

- .PRESENÇA DE SAG:

A SAG estava presente em 13 neurônios com padrão LRS , nos neurônios sRS foram 75. Verificamos que a presença de SAG está associada ao padrão LRS , enquanto que sua ausência está associada ao padrão sRS (tabela 12). (teste χ^2 exato de Fisher $P=0.049$).

- PRESENÇA DE F AHP:

Entre sRS X LRS não foi observada associação entre presença/ausência do F AHP e padrão. A propriedade FAHP esteve presente em 132 neurônios sRS e 17 neurônios LRS . (teste χ^2 exato de Fisher $P=0.31$).

- PRESENÇA DE DAP:

Não foi observada associação entre presença/ausência e padrão entre os subtipos sRS e LRS . (teste χ^2 exato de Fisher $P=0,056$)

- PRESENÇA DE M AHP

Não foi observada associação entre presença/ausência em relação sRS X LRS . A propriedade M AHP esteve presente em 38 neurônios sRS e 7 neurônios LRS . (teste χ^2 exato de Fisher $P=0,16$).

TABELA 12- Ajustes residuais da presença dos parâmetros qualitativos entre os padrões sRS X lRS

SAG		sRS	lRS	TOTAL
Ausência	Observado	68	4	72
	Esperado	64.4	7,7	72
	Ajuste residual	1.9	-1.9	
Presença	Observado	75	13	88
	Esperado	78.7	9.4	88
	Ajuste residual	-1.9	1.9	
Total	Contado	144	17	160
	Esperado	144	17	160

P(calculado pelo *Teste Exato de Fisher*) para a presença de SAG=0.049 Os valores em negrito representam associação característica-padrão

;

ENTRE SUBTIPOS DE RS: sRS X fRS

- PRESENÇA DE SAG:

A SAG esteve presente em 75 neurônios sRS registrados e em 42. fRS A presença de SAG está associada ao padrão sRS , enquanto que sua ausência está associada ao padrão fRS (Tabela 13). (teste χ^2 exato de Fisher P=0.01).

- PRESENÇA DE $fAHP$:

Comparando a presença de $fAHP$:entre sRS X fRS não foi verificado associação. A propriedade foi observada em 132 neurônios sRS e 56 neurônios fRS (Tabela 13) (teste χ^2 exato de Fisher P=0.12) .

- PRESENÇA DE DAP:

A presença de DAP está associada ao padrão fRS enquanto que sua ausência está associada ao sRS (Tabela 19). (teste χ^2 exato de Fisher $P<0.001$).

- PRESENÇA DE M_{AHP}

Entre s_{RS} X f_{RS} , observamos associação, onde a presença está associada ao f_{RS} e a ausência está associada ao padrão s_{RS} (Tabela 13). (teste χ^2 exato de Fisher; $P < 0,0010$).

Tabela 13 - Ajustes Residuais da Presença dos Parâmetros Qualitativos entre os padrões de disparo s_{RS} X f_{RS} registrados no tecido hipocampal humano

SAG		s_{RS}	f_{RS}	TOTAL
Ausência	Observado	68	42	110
	Esperado	78.7	31.4	110
	Ajuste residual	-3,4	3,4	
Presença	Observado	75	15	90
	Esperado	64.4	25.7	90
	Ajuste residual	3,4	-3,4	
Total	Contado	143	57	200
	Esperado	143	57	200

DAP		s_{RS}	f_{RS}	TOTAL
Ausência	Observado	92	14	106
	Esperado	73	33	106
	Ajuste residual	6,3	-6,3	
Presença	Observado	50	43	93
	Esperado	69	24	93
	Ajuste residual	-6,3	6,3	
Total	Contado	142	57	199
	Esperado	142	57	199

M_{AHP}		s_{RS}	f_{RS}	TOTAL
Ausência	Observado	118	18	136
	Esperado	96.6	39.4	136
	Ajuste residual	7,3	-7,3	
Presença	Observado	22	39	61
	Esperado	43,4	17,6	61
	Ajuste residual	-7,3	7,3	
Total	Contado	140	57	197
	Esperado	140	57	197

. P (calculado pelo Teste exato de Fisher) para a presença de SAG- $P=0,01$

. Presença de DAP: $P < 0,001$. Presença de M_{AHP} : $P < 0,001$

Os valores em negrito mostram onde ocorre a associação

ENTRE SUBTIPOS DE RS: F_{RS} X L_{RS}

- PRESENÇA DE SAG:

A SAG foi observada em 15 neurônios com padrão F_{RS} e em 13 L_{RS} . A presença de SAG está associada ao padrão L_{RS} enquanto que sua ausência de SAG está associada ao padrão F_{RS} (tabela 14). (teste χ^2 exato de Fisher $P < 0.001$).

- PRESENÇA DE F_{AHP} :

Entre F_{RS} X L_{RS} não foi verificada associação entre a presença/ausência de F_{AHP} e padrão. A propriedade foi observada em 56 neurônios com padrão F_{RS} e 17 L_{RS} (tabela 14). (teste χ^2 exato de Fisher $P = 0.77$).

- PRESENÇA DE DAP:

A ausência de DAP está associada ao padrão L_{RS} enquanto que sua presença ao padrão F_{RS} (Tabela 14). (teste χ^2 exato de Fisher, $P < 0.01$).

- PRESENÇA DE M_{AHP}

A ausência de M_{AHP} está associada ao padrão L_{RS} enquanto que sua presença ao padrão F_{RS} (Tabela 14) (teste χ^2 exato de Fisher, $P = 0.01$).

TABELA 14 - Ajustes Residuais da Presença dos Parâmetros Qualitativos entre os padrões de disparo F_{RS} X L_{RS} ,

SAG		s_{RS}	L_{RS}	TOTAL
Ausência	Observado	42	4	46
	Esperado	35,4	10,6	46
	Ajuste residual	3,7	-3,7	
Presença	Observado	15	13	28
	Esperado	21,6	6,4	28
	Ajuste residual	-3,7	3,7	
Total	Contado	57	17	74
	Esperado	57	17	74

DAP				
Ausência	Observado	14	10	24
	Esperado	18,5	5,5	24
	Ajuste residual	-2,6	2,6	
Presença	Observado	43	7	50
	Esperado	38,5	11,5	50
	Ajuste residual	2,6	-2,6	
Total	Contado	57	17	74
	Esperado	57	17	74

M_{AHP}				
Ausência	Observado	18	11	29
	Esperado	22,3	6,7	29
	Ajuste residual	-2,5	2,5	
Presença	Observado	39	6	29
	Esperado	22,3	6,7	29
	Ajuste residual	2,5	-2,5	
Total	Contado	57	17	74
	Esperado	57	17	74

P (calculado pelo Teste exato de Fisher) para a presença de SAG <0,001. Presença de DAP: $P < 0,001$. Presença de M_{AHP} : $P = 0,01$. Os valores em negrito mostram a associação

ENTRE SUBTIPOS DE ROB

- **PRESENÇA DE SAG:**

A SAG, esteve presente em 8 neurônios com padrão F_{ROB} , 10 neurônios s_{ROB} e 2 neurônios, w_{ROB} . Não foi observada associação. O teste exato de Fisher não evidenciou significância entre: F_{ROB} X s_{ROB} ($P=0.59$); F_{ROB} X w_{ROB} ($P=0.40$) e s_{ROB} X w_{ROB} ($P=0.40$)

- PRESENÇA DE F AHP:

A F AHP esteve presente em 9 neurônios com padrão F ROB, 11 neurônios S ROB e 3 neurônios, W ROB. Não foi observada associação. O teste exato de Fisher não evidenciou significância entre: F ROB X S ROB ($P=0.63$); F ROB X W ROB ($P=0.72$) e S ROB X W ROB ($P=0.33$)

- PRESENÇA DE DAP:

A DAP esteve presente em 9 neurônios com padrão F ROB, 11 neurônios S ROB e 3 neurônios, W ROB. Não foi observada associação. O teste exato de Fisher não evidenciou significância entre: F ROB X S ROB ($P=0.67$); F ROB X W ROB ($P=0.72$) e S ROB X W ROB ($P=0.55$)

- PRESENÇA DE M AHP

A M AHP esteve presente em 8 neurônios com padrão F ROB, 6 neurônios S ROB e 2 neurônios, W ROB. Não foi observada associação. O teste exato de Fisher não evidenciou significância entre: F ROB X S ROB ($P=0.18$); F ROB X W ROB ($P=0.40$) e S ROB X W ROB ($P=0.66$)

PARTE III - ESTUDO COMPARATIVO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DOS PADRÕES DE DISPARO COMUNS OBSERVADOS EM RATOS E TECIDO HUMANO.

Neste estudo serão apresentados os resultados da análise comparativa entre as propriedades eletrofisiológicas passivas daqueles neurônios com padrões de disparo comuns ao observado nos hipocampos de ratos (controles e tratados com pilocarpina) e no tecido hipocampal humano.

Dessa forma foram excluídos os dados referentes aos padrões: FS, ${}_L$ RS do tecido hipocampal humano; ${}_W$ ROB de animais controles e tecido humano, pois estes padrões não foram encontrados nos três grupos. As propriedades mensuradas dos subtipos de células ${}_A$ IB e ${}_W$ IB, dos grupos de ratos epiléticos e tecido humano, foram similares e dessa forma permaneceram agrupadas dentro do padrão IB.

Neste estudo, foi aplicado o teste de análise de variância fatorial com dois fatores (ANOVA Two-way). Os parâmetros analisados foram: potencial de membrana (PM), resistência de entrada (IR), constante de tempo (TC), corrente injetada para o primeiro potencial de ação (ICAP), Limiar de disparo (LIM), amplitude (AMP) e duração do primeiro potencial de ação (DUR). Os fatores em estudo são Grupo com 3 níveis (1-Rato Controle; 2-Rato Tratado e 3-Humanos) e Padrão com 5 níveis (1-IB; 2- ${}_F$ ROB; 3- ${}_S$ ROB; 4-RSF e 5-RSS). Além disso, foram considerados valores estatisticamente significativos $P < 0.05$. Através desta análise verificaremos se as médias diferem: Padrão entre e dentro dos grupos de estudo.

Os resultados deste estudo serão apresentados de acordo com a propriedade elétrica mensurada

POTENCIAL DE MEMBRANA (PM):

As médias dessa propriedade foram ponderadas pelo método de mínimos quadrados, cujo valor usado para a composição dos pesos foi a variância. A tabela 15 mostra a análise de variância da propriedade PM, através dessa análise pôde ser observado que existe diferença significativa entre as médias de interação grupo e padrão ($p < 0.01$) em relação ao potencial de membrana.

As diferenças foram detectadas através do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, onde podemos observar a existência de diferença significativa entre a média do PM do Grupo Rato controle e a média do PM Grupo humano dentro do padrão sRS ($P < 0.01$)

Dentro do padrão rRS , entre os grupos ratos controles e tratados com pilocarpina, encontramos diferenças com $P = 0.01$ (Tabela 16-letras maiúsculas).

Analisando as médias dos padrões dentro de cada grupo verificamos diferenças significativas com nível de significância de 5%.

- Ratos Controles: O padrão sRS de ratos controles difere significativamente com $P < 0.01$ do padrão rRS , contudo não foram observados diferenças entre os demais padrões (Tabela 16-letras minúsculas).
- Ratos Tratados com Pilocarpina: Não foram identificadas diferenças estatísticas dentro do grupo (Tabela 16-letras minúsculas).
- Tecido Hipocampal Humano: O padrão IB difere significativamente com $P < 0.01$ do padrão $rROB$, contudo não foram observados diferenças entre os demais padrões (Tabela 16-letras minúsculas).

RESISTÊNCIA DE ENTRADA (IR)

A tabela 15 mostra a análise de variância da propriedade IR, na qual, foi observada interação grupo e padrão ($p=0.015$) em relação à propriedade mensurada. As diferenças foram detectadas através do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, onde podemos observar que existe diferença significativa entre as médias do IR do Grupo Rato tratado com pilocarpina e Grupo Humano dentro do padrão $_{F}ROB$ ao nível de significância de 5% ($P<0.01$). Não foram observadas diferenças com relação ao grupo controle e nem aos demais padrões. (Tabela 16-letas maiúsculas).

Analisando as médias da propriedade dentro dos padrões em cada grupo não verificamos diferenças significativas com nível de significância de 5%.

CONSTANTE DE TEMPO (TC)

As médias dessa propriedade foram ponderadas pelo método de mínimos quadrados, cujo o valor da variância foi usada para a composição dos pesos. A tabela 15 mostra a análise de variância da propriedade TC, através dessa análise pôde ser observado que existe diferença significativa entre as médias de interação grupo e padrão ($p<0.01$) em relação à propriedade.

Através do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, pôde se observar diferença significativa entre a média do TC do Grupo Rato controle em relação ao tratado e ao tecido Humano dentro do padrão $_{S}RS$ com $P<0.01$, mas entre os demais padrões não houve diferenças significativas (Tabela 16-letas maiúsculas).

Dentro dos grupos ao analisarmos as médias dos padrões verificamos diferenças significativas com nível de significância de 5%.

- Ratos Controles: O padrão s_{RS} de ratos controles difere significativamente com $P < 0.01$ do padrão r_{RS} e s_{ROB} , contudo não foram observadas diferenças entre os demais padrões (Tabela 16-letas minúsculas).
- Ratos Tratados com Pilocarpina: Não foram identificadas diferenças dentro do grupo (Tabela 16-letas minúsculas).
- Tecido Hipocampal Humano: O padrão IB difere significativamente com $P < 0.01$ do padrão s_{RS} , contudo não foram observadas diferenças entre os demais padrões (Tabela 16-letas minúsculas).

CORRENTE INJETADA PARA O PRIMEIRO POTENCIAL DE AÇÃO (ICAP)

As médias do ICAP foram ponderadas pelo método de mínimos quadrados, cujo valor da variância foi usada para a composição dos pesos. Através da análise de variância desta propriedade não foi observada diferença significativa entre as médias do fator grupo ($P=0.61$); fator padrão ($P=0.09$) e interação grupo*Padrão ($p=0.09$) em relação ao ICAP.

LIMIAR DO PRIMEIRO POTENCIAL DE AÇÃO (LIM):

As médias do LIM precisaram ser ponderadas pelo método de mínimos

quadrados, e a variância foi utilizada para a composição dos pesos. A tabela 15 mostra a análise de variância desta propriedade e através dessa análise observou-se a existência de diferença significativa entre as médias de interação grupo*Padrão ($p < 0.01$).

As diferenças foram detectadas através do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer, onde podemos observar que existe diferença significativa entre a média do LIM do Grupo dos Ratos e a média do PM Grupo Humano dentro do padrão sRS ao nível de significância de 5% ($P < 0.01$) (Tabela 16- letras maiúsculas).

Analisando as médias dos padrões dentro de cada grupo não verificamos diferenças significativas (tabela 16- letras minúsculas).

AMPLITUDE DO PRIMEIRO POTENCIAL DE AÇÃO (AMP)

As médias do AMP foram ponderadas pelo método de mínimos quadrados, cujo valor da variância foi usada para a composição dos pesos. Através da análise de variância desta propriedade não foram observadas diferenças significativas entre as médias do fator grupo ($P = 0.61$); fator padrão ($P = 0.09$) e interação grupo*Padrão ($p = 0.09$) em relação ao AMP.

DURAÇÃO DO PRIMEIRO POTENCIAL DE AÇÃO (DUR):

As médias dessa propriedade foram ponderadas pelo método de mínimos quadrados, utilizando o valor da variância para a composição dos pesos. A tabela 15 mostra a análise de variância na qual, pôde ser observado diferença

significativa entre as médias de interação Grupo*Padrão ($p < 0.01$) em relação à propriedade.

Não observamos diferença significativa entre as médias do LIM entre os grupos. (Tabela 16 letras maiúsculas).

Dentro de cada grupo verificamos diferenças significativas com nível de significância de 5%.

- Ratos Controles: A média do padrão F_{RS} de ratos controles difere significativamente com $P < 0.05$ do padrão IB e F_{ROB} , contudo não diferem de S_{RS} e S_{ROB} . A média do padrão IB difere ainda do significativamente com $P < 0.05$ do padrão S_{RS} (Tabela 16 -letras minúsculas).
- Ratos Tratados com Pilocarpina: A média do padrão F_{RS} deste grupo difere significativamente com $P < 0.05$ do padrão IB e F_{ROB} , contudo não diferem de S_{RS} e S_{ROB} . A média do padrão IB difere ainda do significativamente com $P < 0.05$ do padrão S_{RS} (Tabela 16 -letras minúsculas).
- Tecido Hipocampal Humano: A média do padrão F_{RS} no tecido humano difere significativamente com $P < 0.05$ do padrão IB e F_{ROB} , contudo não diferem de S_{RS} e S_{ROB} . A média do padrão IB difere ainda do significativamente com $P < 0.05$ do padrão S_{RS} (Tabela 16 -letras minúsculas).

TABELA 15- Análise de Variância das propriedades mensuradas

Causas de Variação/Parâmetro	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F Calculado	Pr > F
PM					
Grupo	2	0.73	0.36	0.37	0.690
Padrão	4	23.52	5.88	5.88	0.001
Grupo*Padrão	8	45.24	5.65	5.66	<0.001
Erro	361	360.00	6.92		
Total Corrigido	375	457.00	0.99		
IR					
Grupo	2	1696.06	848.03	7.45	0.001
Padrão	4	700.32	175.08	1.54	0.191
Grupo*Padrão	8	2211.23	276.40	2.43	0.015
Erro	353	40200.48	113.88		
Total Corrigido	367	44816.53			
TC					
Grupo	2	2.69	1.34	1.34	0.260
Padrão	4	5.44	1.36	1.36	0.240
Grupo*Padrão	8	60.04	7.50	7.50	<0.0001
Erro	346	346.03	1.00		
Total Corrigido	360	458.06			
LIM					
Grupo	2	18.27	9.13	9.14	<0.001
Padrão	4	6.72	1.68	1.68	0.153
Grupo*Padrão	8	31.75	3.96	3.97	<0.001
Erro	359	358	0.99		
Total Corrigido	373	484.87			
DUR					
Grupo	2	70.68	35.34	35.33	0.2
Padrão	4	5.92	1.48	1.48	<0.001
Grupo*Padrão	8	19.49	2.43	2.43	0.01
Erro	357	357.04	1.00		
Total Corrigido	371	620.73			

As médias do PM, TC , LIM foram ponderadas

TABELA 16 - Comparações Múltiplas entre e intra grupos de estudo;

Propriedade	Padrão	Grupos de Estudo		
		Rato controle	Rato tratado	Tecido Humano
PM	_S RS	B -73.63 b	AB -69.97 a	A -67.38 ab
	_F RS	A -64.73 a	B -70.27 a	AB -68.51 ab
	IB	A -66.04 ab	A -67.6 a	A -63.88 a
	_S ROB	A -69.46 ab	A -69.41 a	A -69.88 ab
	_F ROB	A -65.15 ab	A -66 a	A -71.09 b
IR	_S RS	A 41.69 a	A 43.18 a	A 35.00 a
	_F RS	A 38.48 a	A 35.74 a	A 37.15 a
	IB	A 31.58 a	A 38.54 a	A 35.28 a
	_S ROB	A 44.09 a	A 35.97 a	A 34.32 a
	_F ROB	AB 43.52 a	A 49.41 a	B 29.39 a
TC	_S RS	A 13.02 a	B 11.35 a	B 11.20 b
	_F RS	A 10.30 b	A 12.44 a	A 11.70 ab
	IB	A 12.62 ab	A 10.20 a	A 11.45 a
	_S ROB	A 9.49 b	A 11.69 a	A 11.88 ab
	_F ROB	A 11.31 ab	A 12.71 a	A 11.69 ab
LIM	_S RS	B -61.6 a	B -58.06 a	A -46.29 a
	_F RS	A -62.53 a	A -56.08 a	A -52.28 a
	IB	A -55.98 a	A -55.60 a	A -52.46 a
	_S ROB	A -55.36 a	A -51.47 a	A -55.26 a
	_F ROB	A -53.81 a	A -49.80 a	A -53.03 a
DUR	_S RS	A 3.34 ab	A 3.50 ab	A 3.52ab
	_F RS	A 3.53 a	A 3.58a	A 3.6a
	IB	A 2.2 c	A 2.3c	A 2.3c
	_S ROB	A 2.78 abc	A 2.93 abc	A 2.9 abc
	_F ROB	A 2.42 bc	A 2.45c	A 2.4c

Letras minúsculas a direita das médias comparam linhas dentro da mesma coluna
 Letras maiúsculas a esquerda das médias comparam colunas dentro da mesma linha

DISCUSSÃO

A marcação celular com biocitina teve como objetivo identificar a morfologia das células registradas dos três grupos (ratos e tecido humano). Historicamente, os neurônios foram classificados de acordo com a sua morfologia (tamanho, forma, arborização dendrítica), propriedades bioquímicas (neurotransmissores e proteínas associadas), porém critérios fisiológicos também estão sendo utilizados para mostrar a correlação entre eles e desta forma compreender a formação dos circuitos neuronais uma vez que a membrana plasmática não se comporta de maneira igual (Connors e Gutnick, 1990).

Alem disso, os neurônios, por sua vez, diferem quanto ao tipo e distribuição de canais iônicos do soma e dendritos (Connors e Gutnick, 1990; Contreras, 2004). Essas diferenças se manifestam nas diferentes formas dos potenciais de ação e proporcionam a formação de padrões de disparo (Connors e Gutnick, 1990), dessa forma constituem as bases para a classificação neuronal.

O presente estudo procurou inicialmente identificar e caracterizar os padrões de disparo das fatias de hipocampo nos grupos de estudo (ratos controles, ratos tratados com pilocarpina e tecido hipocampal humano) de acordo com o comportamento de acomodação dos potenciais de ação observados na curva da frequência instantânea. A partir desses achados comparamos os parâmetros eletrofisiológicos dos padrões de disparo comuns a ratos e tecido humano e diferenças dentro dos grupos.

PADRÕES DE DISPARO OBSERVADOS NOS GRUPOS DE ESTUDO:

Estudos realizados em CA1 de ratos utilizando a técnica de patch clamp demonstraram a existência de apenas um padrão identificado como padrão de CA1 (Staff et al., 2000). Outros estudos revelaram a ampla heterogeneidade de resposta nos neurônios de CA1 (Masukawa, 1982; Jensen et al., 1994), assim como em nossos estudos. Não está claro o porquê dessa discrepância, uma das hipóteses seria a utilização de diferentes tipos de eletrodos durante os registros de “patch clamp” e os de “current clamp” influenciariam os disparos neuronais (Staff et al., 2000).

Através dos registros intracelulares de CA1 dos grupos estudados foi possível caracterizar os disparos neuronais em condições próximas das fisiológicas. A mimetização do ambiente aconteceu através da perfusão com o Ringer normal e com isso foram evidenciados quatro padrões de disparo distintos, cuja nomenclatura adotada foi à mesma usada para a classificação de neurônios neocorticais de diferentes espécies (McCormick *et al.*, 1985 Connors e Gutnick, 1990; Silva et al., 1991; Yang et al., 1996), sendo: *regular spiking* (RS), *intrinsic bursting* (IB), *repetitive oscillatory bursting* (ROB) e *fast spiking* (FS). No presente estudo, os três primeiros padrões foram observados em ratos e tecido humano e o quarto padrão, FS, somente no tecido humano.

Nos neurônios hipocâmpais humanos foram aplicados critérios semelhantes para caracterizar os disparos de neuronios córtex de outras espécies (Connors e Gutnick, 1990). Estudos iniciais em neocórtex humano apontavam para a existência apenas do padrão RS (Avoli e Olivier, 1989) entretanto estudos preliminares de Stroubridge e colaboradores (1987) indicaram a presença de

neurônios que disparavam em salva (Stowbridge et al., 1987). Outros relatos identificaram os padrões de disparo RS e IB cortical humano (Foehring e Wyler, 1990) contudo o padrão IB, era diferente da descrição em roedores (Connors e Gutnick, 1990) e de nossas observações conforme veremos posteriormente.

A partir de agora discutiremos os principais achados encontrados nos quatro padrões em estudo.

Neurônios com potencias de ação com intervalos regulares (do inglês *Regular Spiking - RS*):

Em todos os grupos estudados, os neurônios RS constituíram a classe de disparo predominante. Estes dados foram compatíveis com os relatos observados entre os neurônios neocorticais (Connors e Gutnick, 1990; Silva et al., 1991; Chen et al., 1996; Cho, 2004 e Contreras, 2004) e de CA1 (Sanabria et al., 2001) de diferentes espécies. Entre os neurônios RS do tecido hipocampal humano também verificamos compatibilidade com os escassos relatos existentes no tecido cortical humano (Foehring e Wiler, 1990, Foehring et al, 1991) e a outras espécies (revisado por Contreras, 2004).

Ao compararmos o número de observações dos neurônios RS entre ratos (controles e tratados com pilocarpina), verificamos um menor número observado de neurônios com padrão RS nos animais tratados com pilocarpina em relação aos controles. A pilocarpina per se não parece ser responsável pela diminuição do número de observações do padrão RS. Animais que receberam pilocarpina, mas não desenvolveram *status epilepticus* (SE) apresentaram as mesmas taxas de neurônios RS, classificadas nesse estudo como *não-bursters* (NB) quando comparadas com os controles (Sanabria et al., 2001).

Curiosamente, ao contrário dos animais tratados com pilocarpina, nas fatias de hipocampo humano a percentagem de neurônios RS superou a taxa observada nos animais controles. Entretanto a correlação entre a distribuição dos padrões entre ratos e tecido humano, precisa ser interpretada com cautela, pois no tecido humano existem outros fatores que interferem na condição do tecido obtido na cirurgia. Entre as manifestações que possam interferir na expressão de um padrão de disparo inclui-se os aspectos clínicos (tempo de epilepsia, idade do paciente, sexo, frequência das crises, drogas administradas, presença e grau de atrofia e esclerose hipocampal; vascularização do hipocampo, etc), condições em que as fatias foram obtidas (tempo de isquemia, manipulação do hipocampo). Comparando a ocorrência de neurônios RS de CA1 humanos com os padrões similares de CA1 em macacos verificamos que neste, a população de neurônios com potenciais de ação isolados é oito vezes menor nos macacos (Altemus *et al.*, 2005). Um estudo comparativo dos padrões eletrofisiológicos nos neurônios do núcleo central da amígdala, em gatos, ratos e cobaias, determinou distribuição distinta para cada espécie estudada (Dumont *et al.*, 2002).

Talvez o fator filogenético coligado à conseqüente complexidade do sistema nervoso humano e as próprias condições patológicas da epilepsia determine estas diferenças. Associando a esses fatores inerentes à complexidade do cérebro humano e as características da epilepsia, salientamos que o modelo da pilocarpina em roedores possivelmente mimetiza somente parte da epilepsia temporal humana. Esta questão foi abordada recentemente por Kohling e Avoli, (2006) da necessidade de rever a questão do modelo experimental e tecido humano.

Existe escassez de estudos em tecido humano e nos poucos relatos existentes o padrão de disparo predominante foi o RS em córtex (Foehring e Wyler, 1990; Foehring *et al.*, 1991) e subiculum (Wozni *et al.*, 2003). Na questão do grupo controle alguns autores sugerem que na porção cerebral removida possam existir neurônios saudáveis e que estes seriam os controles (Schwartzkroin *et al.*, 1983), contudo a probabilidade de obtenção de registros eletrofisiológicos nestes neurônios são remotas, visto que, há baixa densidade destas células no tecido estudado. A questão da distribuição dos padrões entre tecido normal e epilético, será abordado novamente nas considerações finais.

Independentemente do grupo estudado, observamos que os neurônios RS em nenhum momento despolarizaram salva de potenciais de ação, os potenciais de ação isolados apresentavam regularidade no intervalo que culminavam na acomodação dos mesmos. Estes comportamentos eletrofisiológicos são características determinantes na identificação dos neurônios RS dos demais padrões (McCormick *et al.*, 1985; Connors e Gutnick, 1990). O processo de acomodação serve para contrastar o comportamento dos potenciais de ação e, foi primeiramente descrito como um fenômeno psicofísico em que a exposição de estímulo de alta frequência resulta numa subsequente redução da percepção (Blakemore e Campbell, 1969)

Alguns relatos caracterizam os neurônios RS neocorticais como homogêneos (Silva *et al.*, 1991a;b). Outros autores verificaram que os neurônios RS não eram tão similares quanto se pensava e diferentes critérios passaram a ser adotados para diferenciar suas subpopulações, como: hiperpolarização pós-potencial (AHP) (unifásico ou bifásico) em neurônios do GD de pacientes com epilepsia (Dietrich, *et al.*, 1999) e acomodação dos

potenciais de ação em neocórtex de diferentes espécies *in vivo* e *in vitro* (Agmon e Connors, 1990; Gottlieb e Keller, 1997, Locke e Nerbonne, 1997a, 1997b; Degenetais *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2004).

Nos neurônios de CA1 de ratos e tecido humano verificamos que existem diferenças quanto ao tempo que leva à acomodação dos potenciais de ação e adotamos critérios semelhantes aos aplicados para os neurônios corticais, onde levamos em consideração o comportamento temporal de acomodação. O comportamento de acomodação neuronal é um diferencial para a identificação dos neurônios RS sendo relatadas para qualquer área do cérebro e independente da espécie em questão (Connors e Gutnick, 1990, revisado por Contreras, 2004).

Os neurônios RS de CA1 foram classificados como RS de acomodação rápida ($_F$ RS), RS de acomodação lenta ($_S$ RS) e um terceiro grupo encontrado exclusivamente no material humano que apresentou além da acomodação lenta, latência para a geração do primeiro potencial de ação, no qual classificamos como ($_L$ RS).

Antes de discutirmos o comportamento de acomodação dos potenciais de ação, verificamos que a aplicação de 0.8 nA provoca comportamentos distintos na frequência instantânea inicial entre os neurônios $_F$ RS e $_S$ RS, independente do grupo estudado. Nos neurônios $_F$ RS a frequência inicial encontrava-se elevada em relação ao $_S$ RS. Gottlieb e Keller (1997) classificaram os neurônios RS corticais da camada VI como RS_1 e RS_2 , onde a mesma intensidade de corrente utilizada por nós provocava uma frequência de disparo inicial mais elevada em RS_2 em relação ao RS_1 . Os neurônios $_F$ RS de CA1 não apresentaram frequências tão elevadas quanto ao RS_2 . Uma explicação para

as diferenças de frequências entre RS_2 e RS_1 , mas que também pode ser aplicada em nosso estudo, estariam relacionadas aos aspectos morfológicos (densidade de dendritos, espinhas e canais iônicos) (Gottlieb e Keller, 1997).

No mesmo estudo os autores classificaram os neurônios RS_1 com um comportamento de acomodação mais lento e RS_2 com acomodação rápida, ao transpor estas observações para outros estudos, verificamos que tanto RS_1 quanto RS_2 são exemplos de acomodação rápida. Isto é, o subtipo RS_1 de Gottlieb e Keller (1997) é o RS de acomodação rápida identificado por Connors e colaboradores (1985) e o RS_2 é o mesmo observado por Nuñez (Nunez *et al.*, 1993). Em CA1 os neurônios fRS apresentaram características mistas entre RS_1 e RS_2 de Gottlieb e Keller (1997), as frequências iniciais foram similares quanto ao RS_1 e alguns neurônios despolarizaram até o final da estimulação (~180ms) e outros a interrupção ocorria em um período mais curto. Nós verificamos, assim como em córtex, que disparo dos neurônios fRS tinham uma propensão maior de se acomodar em um tempo mais curto quando comparados com os neurônios com acomodação lenta.

Os padrões fRS e fRS tiveram um comportamento de acomodação similar aos padrões RS, grupos I e II de acomodação lenta ($sRS_{\text{grupo I}}$ e $sRS_{\text{grupo II}}$) observado por Degenetais e colaboradores (2002). Neste estudo os autores classificaram os neurônios $sRS_{\text{grupo I}}$ com acomodação mais rápida que o $sRS_{\text{grupo II}}$ corticais com características compatíveis com os nossos respectivos padrões fRS e sRS . Além disso, estes autores identificaram um outro padrão RS classificado como RS de acomodação rápida, cujo tempo para a interrupção dos potenciais de ação foi o fator determinante para a classificação, ocorrendo na primeira metade do pulso. Nos neurônios fRS hipocampais

também tivemos neurônios que apresentaram interrupção dos disparos, contudo levamos em consideração somente a curva de acomodação dos potenciais de ação e desta forma estes neurônios foram agrupados em um único padrão.

Verificamos elevação da frequência de acomodação quando comparamos f_{RS} e s_{RS} entre ratos controles com os demais grupos (ratos tratados com pilocarpina e tecido hipocampal humano). No processo de acomodação dos disparos neuronais há o envolvimento de pelo menos três correntes de potássio independentes de Cálcio, I_D , I_A e I_K (Locke e Nerbonne, 1997a,b), onde o aumento da concentração de I_D e I_K favorecem a acomodação neuronal nos neurônios RS (Locke e Nerbonne, 1997a). O nosso estudo não teve o intuito de determinar qual ou quais correntes estão envolvidas na acomodação dos neurônios de CA1 e como estas correntes estão afetadas na epilepsia. O fato é que existe alteração na acomodação dos potenciais de ação e estas alterações podem ser compatíveis com uma aberração molecular e funcional de canais iônicos de K^+ responsáveis por esse fenômeno. Resultados similares foram obtidos no modelo da toxina tetânica (Watts *et al.*, 1993). Uma falha crônica dos mecanismos normais de acomodação poderia favorecer um efeito epileptogênico de determinados circuitos aferentes gerando atividade epilética no hipocampo em resposta à ativação de áreas externas.

O terceiro subtipo de células RS foi observado somente no tecido humano, este padrão diferiu dos demais por apresentar latência para a geração do primeiro disparo, no qual classificamos como L_{RS} . Um padrão que apresenta esta característica foi descrito nas camadas II/III do córtex perhimal, sendo identificado como LS (do inglês "*late spiking*") através da técnica de *patch*

clamp (Faulkner e Brown, 1999). Os neurônios LS, além de apresentarem retardo para o primeiro disparo, a aplicação de corrente provocava uma atividade auto-sustentada (Falkoner e Brown, 1999; Beggs *et al.*, 2002) não havendo acomodação dos potenciais que é uma característica dos neurônios RS. Em nosso estudo verificamos um comportamento de acomodação dos potenciais semelhante ao observado nos neurônios δ RS. Quanto aos tempos de latência entre LS e δ RS verificamos que acontece diferenças, pois o tempo observado no primeiro grupo ocorre na ordem de segundos, e o segundo na ordem de milissegundos. Deve se levar em conta que as técnicas utilizadas para o estudo e os tempos de estimulação também diferiram, 6 segundos para as células LS e 200ms para δ RS. A função dos neurônios LS não foi ainda elucidada, entretanto há indícios de que ele desempenhe alguma função durante o aprendizado associativo (Beggs *et al.*, 2002). Em nosso estudo ressaltamos que não temos dados suficientes para postular hipóteses para sua possível função no circuito neuronal epilético, entretanto verificamos que a grande maioria destes neurônios foram observados em fatias hipocampais de pacientes sem atrofia desta estrutura e com idade inferior a 5 anos. Nestes pacientes a patologia era predominantemente do córtex cerebral e não primariamente do hipocampo, sendo pacientes submetidos à hemisferectomia. Pode-se especular que a observação do neurônio δ RS esteja relacionado a presença da função hipocampal normal.

Tanto nos neurônios RS dos ratos epiléticos quanto tecido humano foram observados, entre os potenciais de ação, pequenas espículas despolarizantes. As espículas despolarizantes são provocadas pelos canais de Ca^{2+} (Chen, 1996), sendo um indicativo de hiperexcitabilidade.

Neurônios com descargas em salva (do inglês *intrinsic bursting*-IB):

Em córtex de pacientes com epilepsia (Foehring e Wyler, 1990) e córtex pré-frontal de ratos (Yang *et al.*, 1996), os neurônios IB foram caracterizados pela presença de atividade em dupla e que pulsos supralimíares elevados produzem uma atividade semelhante ao RS. Na maioria dos estudos, os neurônios IB apresentam uma onda despolarizante lenta, da qual emergem o trem de potenciais de ação com ou sem a presença de potenciais de ação isolados, tanto para córtex (Connors e Gutnick, 1990; Silva *et al.*, 1991 Contreras, 2004.), subíctulo (Staff *et al.*, 2000; Stafstrom, 2005) e hipocampo (Masukawa, 1982; Jensen *et al.*, 1994). Segundo Nowak e colaboradores (2003) a presença da atividade em salva não é uma característica suficiente para caracterizar um tipo celular, neste contexto podem ser incluídos outros critérios adicionais como intervalo entre espículas e inativação dos potenciais de ação. Dessa forma, a caracterização desse padrão pode incluir diferentes ângulos. Em nosso estudo classificamos como IB neurônios que despolarizavam atividade em salva, sem a presença dos potenciais de ação isolados e após a atividade em salva inicial.

Surge a questão se as descargas em salva poderiam ser consequência da lesão neuronal provocada pela inserção de microeletrodos. Segundo McCormick e colaboradores (1985) a capacidade de geração da atividade em salva não foi consequência da injúria neuronal provocada pelo empalamento do neurônio. Além disso, durante os registros eletrofisiológicos a capacidade dos neurônios na geração da atividade em salva era mantida durante o período de estimulação enquanto a curva de capacitância observada durante a aplicação dos pulsos hiperpolarizantes se mantinha inalterada.

Assim como nos neurônios com o padrão RS, os neurônios IB apresentaram características de acomodação diversas, o que permitiram agrupá-los em duas subclasses: neurônios IB com acomodação ($_A$ IB) e sem acomodação ($_W$ IB).

A frequência instantânea inicial e a de acomodação dos neurônios $_A$ IB apresentaram valores similares dos neurônios $_S$ RS. A atividade inicial destes neurônios era com atividade dupla ou tripla sendo observados nos três grupos estudados (ratos controles, epiléticos e tecido humano). O subtipo $_W$ IB não mostrou a capacidade de acomodação dos potenciais, mantendo a frequência elevada, neurônios com estas características não foram observados nos animais controles. Contudo não significa a inexistência dos mesmos em animais sem epilepsia, correlatos e semelhantes já haviam sido observados em córtex onde a acomodação dos neurônios IB variava (Connors e Gutnick, 1990).

Nos trabalhos de Jensen e colaboradores (1994, 1996) foram observadas características similares as nossas observações sem, no entanto, relatarem a acomodação dos disparos pela frequência instantânea. Devido a similaridade dos valores mensurados nas propriedades eletrofisiológicas passivas não separamos os subtipos do padrão IB.

A ausência de SAG, as presenças de $_F$ AHP e DAP serão abordados nos respectivos subitens desta discussão.

Neurônios com atividade em salva oscilatória (do inglês *Repetitive Oscillatory bursting* -ROB)

A designação de neurônios que apresentavam a atividade em salva oscilatória surgiu inicialmente nos trabalhos de Silva e colaboradores (1991) sendo uma subclasse das células IB e posteriormente como uma classe de disparo nos trabalhos de Yang e colaboradores (1996). Estas células foram caracterizadas por apresentar atividade em salva seguida por uma nova atividade em salva ou potenciais de ação isolados (Yang et al., 1996). Encontramos um número significativo de neurônios que despolarizavam desta maneira, sendo a segunda classe predominante nos três grupos estudados.

Através da curva da frequência instantânea possibilitou a identificação de comportamentos diversos quanto à acomodação dos potenciais de ação: ROB de acomodação rápida ($_F$ ROB), ROB de acomodação lenta ($_S$ ROB) e ROB sem acomodação ($_w$ ROB). É importante ressaltar que, até o presente estudo, não havia relatos na literatura (Silva *et al.*, 1991 e Yang *et al.*, 1996) que descrevessem o comportamento de acomodação dos padrões ROB e nem da sua diversidade observada no presente estudo. Os dois primeiros subgrupos ($_F$ ROB e $_S$ ROB) foram observados nos três grupos de estudo (ratos e tecido humano).

O terceiro grupo foi observado em um exemplar de ratos controles e em um número expressivo de neurônios de CA1 humano. Tanto nos trabalhos de Silva e colaboradores (1991) quanto Yang e colaboradores (1996) não houve uma descrição detalhada desta forma de disparo sobre o comportamento de acomodação.

Mesmo não havendo na literatura um estudo minucioso dos neurônios ROB existem correlatos eletrofisiológicos de padrões com características comuns ao padrão. Desta forma, vimos que os neurônios $_S$ ROB apresentaram

características do disparo similares aos WB (do inglês *weak bursting*) descrito para o subículum (Staff *et al.*, 2002; Knopp *et al.*, 2005). O r ROB apresenta algumas características similares aos disparos SB (do inglês *strong Bursting*) do subículum (Staff *et al.*, 2002; Knopp *et al.*, 2005), diferindo deste por não apresentar uma nova atividade em salva e sim atividade dupla. Tanto os neurônios WB quanto SB apresentavam potenciais de ação com alta frequência (Staff *et al.*, 2002; Knopp *et al.*, 2005) sem qualquer menção quanto à existência de acomodação dos mesmos. A similaridade entre os subgrupos de ROB e WB e SB, se deve a características dos potenciais de ação observados (n° de descargas em salva e potenciais de ação isolados) e pela frequência de disparo elevada e não da frequência instantânea. Ao comparar as frequências de ROB em relação aos demais padrões estudados, independente do grupo, verificamos que a frequência inicial se sobressaia. O subtipo w ROB, encontrado em apenas um exemplar de rato controle e expressivo nos neurônios humanos, foi o padrão que mais se aproximou da descrição do disparo de Yang e colaboradores (1996). A semelhança se deve ao comportamento observado durante a aplicação de correntes supralimiais elevadas e principalmente pela repetição da atividade em salva e não da sua frequência de disparo.

Para compreender a heterogeneidade nos subtipos observados no padrão ROB serão necessárias uma análise morfológica detalhada associada com a determinação das correntes iônicas envolvidas na geração dos potenciais de ação.

Neurônios com intervalos curtos (do inglês *Fast spiking -FS*)

Os neurônios FS foram definidos como um subtipo de neurônios corticais (córtex) que morfológicamente correspondem a neurônios não-piramidais (McCormick et al., 1985; Connors e Gutnick, 1990) e constituem entre 6-11% dos neurônios de CA1 (Aika et al., 1994). Em nosso estudo, só obtivemos registros em tecido humano e não em hipocampo de ratos.

A técnica de registro não permitiu marcar com biocitina nenhum neurônio FS, uma vez que não foi possível manter um registro estável por mais de 5 minutos. As dificuldades da obtenção de registros estáveis, por longos períodos, já haviam sido relatados em outros estudos que utilizam as técnicas convencionais de clampeamento de corrente (Chen et al., 1996).

Uma pequena população de neurônios hipocámpais humanos apresentou características do disparo compatíveis ao disparo FS descritas para neurônios corticais (Connors e Gutnick, 1990; Contreras, 2004), isto é presença de potenciais com intervalos curtos e amplitudes irregulares. Existem poucos correlatos deste tipo de padrão no tecido humano, sendo que os estudos mais expressivos foram realizados por Foehring e colaboradores, (1991) em neocórtex de pacientes com epilepsia. Os autores ainda destacam as presenças de uma hiperpolarização pós-potencial rápida (F AHP) e as ausências de DAP e SAG. Estas observações foram compatíveis com os nossos resultados em CA1 de hipocampo humano e para córtex de diferentes espécies (revisado por Contreras, 2004).

Outra característica que difere os neurônios FS, dos demais padrões, é a ausência de acomodação dos potenciais de ação tanto *in vivo* (Descalzo et al., 2005) e *in vitro* (McCormick, 1985; Connors e Gutnick, 1990; Descalzo et al., 2005). A frequência dos potenciais de ação foram mantidas em torno dos 120Hz, durante aplicação de pulsos de 200ms, contudo há relatos de que esta frequência possa estar ainda mais elevada

chegando a 1KHz (Descalzo *et al.*, 2005). Chen e colaboradores subclassificaram os neurônios com características compatíveis com FS dando a mesma denominação quando a frequência era maior que 150Hz. No mesmo estudo, os autores, determinaram um outro padrão denominado de potenciais com intervalos reduzidos (do inglês *Narrow spiking*) com frequência inicial inferior a 100Hz. Os neurônios FS do tecido hipocampal humano apresentaram frequências intermediárias. Descalzo e colaboradores (2005) observaram que correntes supralimiais com duração >20 segundos podem levar a uma acomodação lenta dos potenciais de ação.

A base da acomodação dos potenciais nos neurônios FS, são os canais de Na e K (Kv3) que apresentam rápida ativação e recuperação da cinética de ativação. A fase ascendente dos PAs dos neurônios FS são similares ao RS e diferem na taxa de inativação que é mais rápida nos FS (Descalzo *et al.*, 2005).

Hiperpolarização pós-potencial (do inglês after-hyperpolarization AHP):

A fase descendente do potencial de ação é seguida por uma fase de repolarização (Kandel e Spencer, 1961; Storm, 1987) na qual podem ser observados dois períodos: 1) período de hiperpolarização denominando de hiperpolarização pós-potencial (do inglês *after-hyperpolarization- AHP*) e 2) período despolarizante, denominado de despolarização pós potencial (do inglês *depolarizing after potential- DAP*) (Storm, 1987). O período hiperpolarizante é composto por três componentes: AHP rápido (do inglês *fast after-hyperpolarization- fAHP*); médio- (do inglês *medium after-hyperpolarization- mAHP*) e lento- (do inglês *slow after-hyperpolarization- sAHP*). O componente fAHP esteve presente em todos os padrões de todos os grupos, sendo mais

freqüente nos neurônios ROB e menos freqüente nos neurônios IB. Estes pró-potenciais são semelhantes aos descritos por Connors e Gutnick (1990) e Yang e colaboradores (1996).

O AHP esteve presente nos neurônios IB após a atividade dupla, contudo não foi possível identificar o seu componente rápido nos neurônios IB dos animais controles. Alguns autores descrevem o fAHP nos neurônios IB após a primeira espícula da atividade em salva (Jensen et al, 1996), em nosso estudo não consideramos esta propriedade entre as espículas que compõem a salva.

Entretanto o percentual de ocorrência de AHP foi menor nos neurônios RS dos animais controles quando comparado com os RS dos ratos epilépticos e tecido humano. Estes achados podem sugerir que as AHPs constituam uma tentativa neuronal de reduzir a excitabilidade prolongando o período de repouso ou que estas células constituem aquelas que sobrevivem a hiperexcitabilidade do circuito epiléptico justamente por expressar esta propriedade. Em nosso estudo nos preocupamos em relacionar a presença da fAHP com o padrão de disparo e não entramos no mérito das alterações provocadas pela epilepsia. O papel do AHP e de seus componentes é pouco conhecido na epilepsia, entretanto uma falha nos componente M AHP e S AHP pode prolongar a duração da despolarização paroxística (PDS), já que por ser um potencial hiperpolarizante, contribui para o bloqueio da atividade em salva (Lorenzon e Foehring, 1992). Em neurônios de tecido epiléptico crônico, dependendo do modelo, tem demonstrado alterações das mais variadas entre os pós-potenciais. Assim, nos trabalhos de Asprodine e colaboradores (1992), não houve alteração do AHP no modelo do “*kindling*”. Sanabria (1999) não

observou alterações das propriedades do F AHP e M AHP no modelo da pilocarpina.

Em neurônios do tecido humano encontramos associação significativa entre o componente M AHP e o padrão F RS. O fato de não encontrarmos diferenças na presença de F AHP e M AHP com os subtipos de ROB poderia contribuir para mais um elemento diferencial na classificação (ROB X F RS).

Despolarização pós-potencial (do inglês depolarizing after potential- DAP)

A despolarização DAP foi observada em todos os padrões registrados de ratos e tecido humano, exceto o padrão FS do tecido humano. Esta propriedade foi descrita inicialmente em neurônios hipocámpais de CA2-CA4 que não apresentavam atividade em salva (NB) e naqueles com atividade em salva (B) por Kandel e Spencer (1961), sendo que neste último as DAPs encontram-se sobrepostas.

Os números de observações desta propriedade entre os neurônios RS foram compatíveis com os achados de Silva *et al* (1991) em córtex e contrários a Yang *et al* (1996) que não observou a presença de DAP nos neurônios RS.

Entre os neurônios de CA1, Jensen e colaboradores (1996) definiram que a DAP poderia ser ativa (com F AHP precedendo a onda despolarizante-DAP_{ativa}) ou passiva (sem a onda despolarizante- DAP_{passiva}). O fato de não termos observado a DAP em alguns neurônios registrados no nosso estudo não significa necessariamente ausência de DAP, pois a mesma pode encontrar-se na forma passiva e conseqüentemente de difícil detecção. O estudo da DAP passiva requer a utilização de modelos *in vitro*, como a perfusão das fatias com

Ringer, com concentração elevada de potássio (Jensem *et al.*, 1996). Se considerarmos que todas as nossas observações da presença DAP apresentaram características que sugerem um DAP ativo, encontramos similaridade aos resultados de Jensem e colaboradores (1996) quanto a porcentagem de DAP ativa entre neurônios NB e B. Em nosso estudo verificamos que esta característica foi observada em maior quantidade entre os neurônios com descargas em salva, principalmente nos neurônios ROB, independente do subgrupo, o que pode significar uma maior expressão de DAP_{ativo}.

No tecido humano a expressão de DAP foi inferior aos observados nos ratos. Isto sugere pelo menos duas possibilidades: 1) menor expressão de DAP ativo nos neurônios hipocampais humanos; 2) sobrevivência neuronal seletiva, diferente no tecido hipocampal que decorre de mecanismos epiléticos distintos.

Entre os subtipos de RS a DAP estava presente em número maior nas células μ RS, ao contrário das células ς RS, que apresentaram um número menor nos três grupos estudados. Em neurônios neocorticais, foi descrito uma discrepância quanto a presença de DAP entre os neurônios RS de adaptação lenta e rápida. Assim, Chagmat-Amitai e Connors (1989) verificaram que a DAP eram comuns à adaptação lenta enquanto que Gottlieb e Keller (1997) observaram o oposto, isto é maior incidência em neurônios com adaptação rápida. Até o presente momento não existe nenhum relato que explique a discrepância na distribuição das DAPs. Tanto Chagmat-Amitai e Connors, (1989) quanto Gottlieb e Keller, (1997) usaram as mesmas estruturas,

entretanto nestes dois estudos foram utilizadas espécies distintas de ratos. Este fator pode ter determinado a diferença dos resultados.

Entre os neurônios IB a presença de DAP isolada foi identificada em nosso estudo só após o potencial de ação simples nos neurônios w IB. Nos demais neurônios IB, a DAP foi vista na atividade dupla e na própria atividade em salva. Correlatos apontam para alterações da DAP em neurônios de animais com epilepsia (Sanabria, 1999). Acredita-se que, os canais iônicos envolvidos no mecanismo ativo do DAP também participe da gênese das descargas em salva espontâneas em células piramidais de CA1 (Jensen *et al.*, 1996), CA3 (Kandel e Spencer, 1961) e neurônios neocorticais (Tseng e Prince, 1993, 1996). Alguns autores defendem que o somatório de vários DAPs poderiam ser capazes de gerar a descarga em salva (Chagnac *et al.*, 1990, Yang *et al.*, 1996). Em neurônios neocorticais foi verificado que a presença de um DAP era uma característica determinante dos neurônios IB, que se distingui das células RS (Yang *et al.*, 1996). No nosso estudo isto não se aplicaria, pois os neurônios IB de Yang e colaboradores correspondem aos nossos r RS da nossa classificação.

Entre os neurônios FS não observamos a presença de DAP em nenhum neurônio registrado, o que está de acordo com as observações realizadas em córtex de roedores (McCornick *et al.*, 1985; Connors e Gutnick, 1990, revisado por Contreras, 2004).

Em neurônios do tecido humano encontramos associação significativa entre o componente DAP e o padrão r RS. O fato de não encontrarmos diferenças na presença de DAP com os subtipos de ROB poderia contribuir para mais um elemento diferencial na classificação (ROB X r RS).

Em nosso estudo não comparamos a amplitude e nem a duração da DAP entre os grupos controles com os tratados, entretanto há relatos na literatura que mostram diferenças entre eles (Jensen et al, 1996,1997). O fato de detectarmos a presença de DAP com certa facilidade já é um indicativo de que existe alteração da amplitude e duração dessa propriedade.

Onda despolarizante ativada pela hiperpolarização (SAG)

Nos neurônios hipocâmpais de CA1 estudados, observamos que existem neurônios que exibem a onda despolarizante ativada pela hiperpolarização (SAG) e outros não. A SAG se deve à ativação da corrente catiônica mista (I_H) que dependendo das condições promove tanto a hiperpolarização quanto a despolarização, dependendo das condições (Poolos, 2002). Estas características foram descritas originalmente por Schwindt et al (1988), e posteriormente observada por outros (Silva *et al*, 1991, Yang *et al*, 1996). Em nosso estudo, a propriedade nos neurônios RS e ROB foi ativada durante a hiperpolarização. Nesta condição, a SAG o promoveu uma despolarização da membrana fazendo com que esta retornasse a valores do potencial próximo do repouso. Em contra partida, os neurônios com a SAG ausente ou inativa, o potencial de membrana tende a valores mais negativos.

Em outras regiões do cérebro como córtex entorhinal ocorre regionalização da SAG, sendo mais freqüente na camada III do que na II (Van der Linden e Lopes da Silva, 1998) e nas diferentes colunas do córtex somato-sensorial onde a SAG está associada a camada infragranular (Gottlieb e Keller, 1997). A SAG é a expressão da ativação da corrente I_H , corrente catiônica

mista de Na^+/K^+ , que auxilia na manutenção do potencial de membrana (Pape, 1996) e favorece a interação iônica nestes níveis (Hutcheon e Yarom, 2000). No nosso estudo, verificamos que a presença de SAG esteve presente na maioria dos neurônios RS nos animais controles, ROB de ratos (controles e epiléticos) e tecido humano. Em CA1 de macaco tanto nos neurônios com potencial isolado, quanto em salva a SAG foi constante (Altemus *et al.*, 2005).

Dentro dos subtipos de neurônios RS a presença de SAG foi mais frequente no subtipo rRS nos animais controles ao contrário dos observados nos demais grupos, onde houve um predomínio de SAG no padrão sRS . Além da inversão na proporção de SAG nos subtipos RS, existiu uma redução do número de observação entre os grupos de ratos tratados com pilocarpina e tecido hipocampal humano. Contudo a influência da I_H nos neurônios sobreviventes em condições patológicas como epilepsia ainda é puramente especulativa (Santoro e Baram, 2003).

Estudos demonstram que a alta incidência da corrente I_H nos neocorticais entorrinais da camada II de ratos sem epilepsia, aumentaria a excitabilidade (Van der Linden e Lopes da Silva, 1998). Em contrapartida, a redução de I_H na camada III de animais com epilepsia induzida pela pilocarpina aumentaria a excitabilidade neuronal (Shah *et al.*, 2004). Existem evidências da participação da I_H na epileptogênese, no modelo experimental de crises febris induzido por frio e tanto a I_H ativada quanto a inibição GABAérgica estariam aumentadas (revisado por Poolos, 2004).

Existe contradição entre o significado funcional do aumento da I_H , uma das hipóteses é que a I_H contribuiria para a excitabilidade neuronal, onde a aplicação de bloqueadores seletivos de I_H teriam um potencial efeito

antiepiléptico (Kitayama *et al.*, 2003). Em um outro extremo, o aumento da ativação da I_H seria uma tentativa da célula em combater a excitabilidade provocada pelo aumento da resposta GABAérgica no modelo de crises febris (Chen *et al.*, 2001). E este conceito tem impulsionado a busca de drogas antiepilépticas que potencializem a atividade da I_H no combate as crises (Surges *et al.*, 2003). O aumento, nestas condições, poderia ser consequência de modificações da cinética (Santoro e Tibbs, 1999) ou alteração da expressão (Brewster *et al.*, 2002) de determinados subtipos de canais I_H (HCN). Embora tenha sido demonstrada a relação entre a modulação da I_H com os modelos experimentais ainda não há dados suficientes para a transposição desses achados para epilepsia humana (Poolos *et al.*, 2004).

No nosso estudo verificamos que nos neurônios RS humanos a ativação da SAG poderia ocorrer de forma abrupta ou de forma contínua. A inclinação da SAG pode ser resultado do aumento da população de um determinado subtipo de HCN. Existem 4 subtipos de HCN (HCN1-4), os canais HCN1 e HCN2, que apresentam respectivamente distribuição restrito a área de CA1 e ampla distribuição no sistema nervoso (revisado por Chen *et al.*, 2002 e Poolos, 2004). O canal HCN1 apresenta cinética de ativação rápida durante a hiperpolarização e responsivo a níveis mínimos de AMPc, já o canal HCN2 apresenta uma cinética lenta e sua modulação depende de níveis elevados de AMPc (Santoro e Tibbs, 1999). A ampla maioria dos neurônios hipocâmpais de CA1 humano apresentou um comportamento de ativação lento o que nos sugere um aumento da expressão do subtipo HCN2.

Alterações moleculares no HCN provocadas pelas crises, em animais imaturos (modelo do ácido Caínico e hipotermia), produzem uma inversão nos

níveis de mRNA de HCN1 e HCN2, levando a um aumento de HCN2 (Chen, 2002; Santoro e Baram, 2003). Nas células granulares do GD de pacientes com epilepsia a expressão de HCN1 (Bender *et al.*, 2003) está aumentada. Para verificar as alterações nas subunidades HCN1 e HCN2 em CA1 provocados pela epilepsia há necessidade do estudo em *patch-clamp* associadas à biologia molecular.

Em neurônios do tecido humano encontramos associação significativa entre o componente SAG e o padrão \perp RS. O fato de não encontrarmos diferenças na presença de DAP com os subtipos de ROB poderia contribuir para mais um elemento diferencial na classificação (ROB X \perp RS). O fato do subtipo \perp RS apresentar uma propensão a apresentar esta propriedade pode ser outro indicativo da importância deste padrão na função hipocampal normal, uma vez que este padrão foi observado principalmente em pacientes sem esclerose hipocampal.

ESTUDO COMPARATIVO DAS PROPRIEDADES ELETROFISIOLÓGICAS PASSIVAS E ATIVAS OBSERVADAS NOS PADRÕES DE DISPARO DO TECIDO HUMANO.

O tecido hipocampal humano foi o grupo que apresentou maior variabilidade quanto aos padrões de disparo, sendo identificados 4 padrões principais (RS, FS, IB e ROB) compatíveis com os padrões de disparo observado em outras estruturas do sistema nervoso. Além disso, dentro destes foram encontrados 8 variações que possibilitaram uma subclassificação (F RS, s RS, \perp RS; A IB, w IB. F ROB, s ROB e w RS). Devido à complexidade de padrões de disparo fez-se necessário um estudo

comparativo das propriedades elétricas passivas e ativas. Nesta análise foi levada em consideração primariamente a diversidade de padrões de disparo e secundariamente a patologia humana.

Segundo, Foehring e colaboradores (1991), para determinar as anormalidades que acompanham a epilepsia do lobo temporal humana é importante analisar a variabilidade de suas propriedades elétricas. E infelizmente não existem estudos eletrofisiológicos relacionados ao tecido humano. Além da escassez de relatos na literatura nenhum deles faz uma abordagem da área de CA1 e conseqüentemente correlacionar nossos resultados com outros estudos tornaram-se limitado e ao mesmo tempo um desafio. O predomínio dos relatos eletrofisiológicos (técnicas de registro intracelular) explorou estruturas como córtex, giro denteado e subiculum. Sendo que, a maioria dos estudos em neocórtex data as décadas de 80 e 90 do século passado (Avoli *et al.*, 1989; Foehring e Wyler, 1990; Foehring *et al.*, 1991). Posteriormente, um ou outro estudo foi realizado em outras áreas como o subiculum (Wozni *et al.*, 2003) e giro denteado humano (Dietrich *et al.*, 1999).

Os neurônios neocorticais humanos foram identificados inicialmente como RS (Avoli *et al.*, 1989) e estes não eram capazes de desenvolverem atividade em salva espontaneamente ou quando estimulados no soma durante os registros eletrofisiológicos. Mais tarde foram identificados os padrões RS, IB e FS nos neurônios neocorticais (Foehring e Wyler, 1990; Foehring *et al.*, 1991) no subiculum, RS e neurônios com descarga em salva no (Wozni *et al.*, 2003). Entretanto deve se ressaltar que os neurônios IB descrito por Foehring e Wyler (1990) diferem de nossas observações, assim como os neurônios do subiculum (Wozni *et al.*, 2003) no qual agrupam neurônios com características IB e ROB

de nosso estudo. Nas células granulares do GD, os disparos foram classificados nos tipos I e II, com características semelhantes aos neurônios RS, diferindo na presença de hiperpolarização pós-potencial bifásica ou monofásica. Em todos os relatos citados acima não foram identificadas diferenças significativas nas propriedades elétricas mensuradas entre os padrões ao contrário de nossas observações no qual verificamos algumas diferenças.

O potencial de membrana do padrão FS foi o mais eletronegativo que os demais, não diferindo de \perp RS e ω ROB. Embora em córtex não tenha sido evidenciado diferença estatística nesta propriedade em relação aos demais houve uma tendência à hiperpolarização. Ao mesmo tempo se compararmos o valor do potencial de membrana entre neurônios FS do neocortex (Foehring *et al*, 1991), verificamos que nos neurônios de CA1 os valores semelhantes. Um outro ponto em comum entre os neurônios FS de CA1 e os corticais é a ausência de SAG. A ausência de SAG nos neurônios pode favorecer a atuação de canais de potássio a hiperpolarizarem a membrana a valores próximos ao potencial de equilíbrio com potássio. É importante ressaltar ainda que o padrão FS esta associado aos interneurônios.

Em outro extremo, o potencial de membrana do padrão IB foi o mais eletropositivo que nos demais grupos neuronais estudados com exceção apenas de \mathfrak{s} RS. Uma explicação para este fenômeno pode também estar associado à diferença na densidade de canais potássio sendo menor nos neurônios IB.

Dentro dos subtipos de neurônios RS, não observamos diferenças no potencial de membrana, entretanto verificamos que nos \mathfrak{s} RS encontrava-se

mais eletropositivo que ${}_F$ RS e ${}_L$ RS. O que nos chamou atenção foi que no subtipo ${}_L$ RS foram registrados potenciais de membrana mais eletronegativos. Neste aspecto levamos em consideração que a maioria dos neurônios ${}_L$ RS foram registrados em fatias hipocâmpais sem atrofia desta estrutura. Não temos como correlacionar estas observações com estudos em tecido humano. Se considerarmos este padrão similar ao LS (Beggs *et al.*, 2000), verificamos que nestes neurônios apresentam valores iguais aos neurônios RS observado por Beggs e colaboradores (2000) e que ambos são mais eletronegativos que os neurônios ${}_S$ RS e ${}_F$ RS de nosso estudo. Estas observações corroboram a idéia da importância destes neurônios no circuito hipocâmpal normal

A resistência de entrada (IR) de FS apresentou-se mais elevada diferindo de ${}_S$ RS, ${}_L$ RS e ${}_F$ ROB. A IR elevada nos neurônios FS também já havia sido relatada no córtex cerebral (Foerhing *et al.*, 1991). Nos neurônios do córtex entorrinal de ratos com epilepsia induzida pelo ácido caínico, mostraram que a redução da SAG promovia um aumento da resistência de entrada (Shah *et al.*, 2004). Embora existam outros canais iônicos que auxiliam na manutenção das propriedades de membrana não há como negar a importância da corrente I_H .

Em nosso estudo verificamos ainda que outras propriedades estavam alteradas como a constante de tempo, principalmente entre o subtipo ${}_S$ RS e FS. A constante de tempo nas células granulares de hipocampo de animais epiléticos estaria reduzida (Isokawa, 1996). Neste estudo de comparação dentro dos padrões observados no tecido humano poderia se inferir que os valores observados seria um reflexo do padrão. Entretanto, como veremos

posteriormente na discussão quando comparamos com outros grupos verificamos alterações dessa propriedade.

A amplitude dos potenciais de ação diferiu entre os padrões observados no tecido humano. Nos relatos de Foehring e colaboradores (1991), embora sem diferença estatística, a amplitude do padrão RS encontrava-se ligeiramente maior do que FS, assim como nossas observações. Contudo entre os subtipos SRS e FRS houve diferença de amplitude sendo maior no SRS . A partir destas diferenças pode se inferir que é uma característica do próprio padrão de disparo porém não se descarta a possibilidade de um recrutamento maior de canais de sódio voltagem-dependentes que podem apresentar maior densidade nos neurônios SRS . Tem sido relatado patologias associadas aos canais de sódio que estão relacionados com a epilepsia, sendo identificados mutações promovendo alteração da cinética e expressão desses canais (Noebels, 2002)

A duração do potencial de ação também mostrou diferenças entre os diversos padrões. Todavia, acreditamos que sejam características inerentes do próprio padrão. O padrão RS de um modo geral apresentou potenciais de ação com longa duração, quando comparado com os demais padrões. Estes dados são compatíveis com a literatura (Silva et al, 1991, Chen et al, 1996).

ESTUDO COMPARATIVO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS PASSIVAS ENTRE OS PADRÕES DE DISPARO COMUNS OBSERVADOS EM RATOS E TECIDO HUMANO:

Estudos iniciais realizados em tecido hipocampal e cortical humano (Schwartzkroin *et al.*, 1983; Schwartzkroin, 1994) demonstraram que as

propriedades eletrofisiológicas de neurônios, presumivelmente piramidais, foram similares as descritas em outras espécies (Knowles *et al.*, 1992; Schwartzkroin, 1994). Nos estudos prévios de nosso grupo (Tavares *et al.*, 2002) revisado por Kohling e Avoli (2006), foi verificado que as propriedades intrínsecas passivas dos neurônios de CA1 de modelos experimentais e tecido humano não diferiram estatisticamente. O fator comum entre os estudos citados acima é que estes dados são referentes ao “pool” de neurônios registrados e não ao padrão. E nesta questão chamamos a atenção para a relevância de nosso estudo, pois foram comparadas as propriedades elétricas dos padrões de disparo comuns a ratos e tecido humano.

Investigações eletrofisiológicas no tecido de animais cronicamente tratados tem demonstrado contradições em relação aos parâmetros passivos, não levando em consideração o padrão. Diferenças nestas propriedades foram relatadas em modelos de epilepsia induzido pelo ácido caínico (Franck *et al.*, 1988) e lesão crônica do córtex (Prince e Tseng, 1993), onde relataram um aumento da resistência de entrada. Neste estudo pode ser observado que entre ratos controles e ratos tratados com pilocarpina, a propriedade do padrão τ_{ROB} encontrava-se mais elevada nos animais epiléticos, contudo não observamos diferença estatística. Sanabria relatou resultados semelhantes aos nossos resultados quando comparou neurônios de ratos controles e tratados com pilocarpina. Não pode ser descartado que o fato de não observarmos diferenças na propriedade seja um reflexo de um fenômeno real ou provocado pelo número pequeno de observações nos grupos.

Estudos utilizando técnicas de *patch-clamp* das células granulares de animais com epilepsia induzida por pilocarpina, mostrou redução na constante

de tempo (Isokawa, 1996). Os autores postularam que essa anomalia pode refletir em alterações das células granulares (deformações dendríticas, etc.) na epileptogênese crônica. Sanabria (1999) não observou diferenças nestas propriedades. O padrão ς RS apresentou redução na constante de tempo do grupo controle em relação aos tratados com pilocarpina e tecido humano. Uma possível explicação para a divergência de resultados pode estar relacionada a diferentes metodologias (Staley *et al.*, 1992). Ao mesmo tempo temos que levar em consideração que os estudos de Isokawa (1996) e Sanabria (1999) consideravam as médias globais dos neurônios estudados e não de um padrão específico.

Encontramos diferenças na duração dos potenciais de ação, principalmente do padrão RS em relação aos demais e não entre os grupos de estudo. As alterações observadas nesta propriedade, assim como já foi discutido no tecido humano, pode ser uma característica inerente ao padrão e não relacionada à epilepsia. Estudo em neurônios corticais de gatos, Chen e colaboradores (1996), demonstraram que os neurônios RS apresentaram duração maior, sem ter sido evidenciado diferenças nas propriedades.

Dentro dos padrões estudados verificamos que o padrão ς RS parece ser o mais sensível a modificações de suas propriedades intrínsecas passivas provocadas pela epilepsia. Em nosso estudo verificamos alterações das propriedades elétricas passivas deste padrão do grupo de animais controles em relação aos grupos tratados com pilocarpina e tecido humano. Em alguns parâmetros as propriedades elétricas deste padrão se comportavam como o grupo controle (resistência de entrada) em outras, próxima ao grupo tratado

com pilocarpina (potencial de membrana, constante de tempo) ou diferia de ambos (limiar do potencial de ação).

Para compreender a importância do padrão θ RS no tecido hipocampal normal e epilético serão necessários estudos eletrofisiológicos e morfológicos criteriosos. Um modelo para estudo eletrofisiológico que pode ser usado é a perfusão com alto potássio associados a bloqueadores de canais de potássio relacionado às correntes independentes de cálcio (I_D , I_A e I_K) (Locke e Nerbonne, 1997a) que participam da acomodação normal; as correntes voltagem-dependentes de ativação lenta (I_M) (Halliwell e Adans, 1982) e a corrente ativada por cálcio intracelular (I_{AHP}) (Madison e Nicoll, 1984). Estas duas correntes parecem estar envolvidas na fisiopatologia das anormalidades observadas na acomodação durante a epileptogênese crônica (Halliwell e Adans, 1982; Madison e Nicoll, 1984). Os defeitos observados na acomodação podem contribuir para o aumento da hiperexcitabilidade, já que após a ativação dos neurônios há uma susceptibilidade intrínseca para a geração dos potenciais de ação. E a alteração pode também se associar aos mecanismos de sincronização ou propagação da atividade epilética local. Existem relatos na literatura que determinados fármacos antiepiléticos, como a fenitoina, auxiliem na acomodação (Lewis *et al.*, 1981). Associado a este estudo funcional, a marcação de neurônios como a técnica de marcação com a biocitina terão um papel fundamental para correlacionar os achados funcionais com os morfológicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Os neurônios com descargas em salva (padrões IB e ROB) foram às classes menos numerosas quando comparadas com os neurônios RS dos neurônios hipocampais de CA1 nos três grupos estudados. Esses dados foram compatíveis com as observações realizadas em outras estruturas de diferentes espécies (Connors e Gutnick *et al.*, 1990; O'Mara *et al.*, 2001; Stafstron, 2005).

Entre ratos controles e tratados com pilocarpina verificamos um aumento de observações de neurônios com esta atividade. Este aumento pode ter sido provocado por diversas razões: morte dos neurônios RS e neurogênese de neurônios IB, alteração dos padrões de disparo RS.

Um mecanismo possível, embora pouco provável, que poderia explicar o aumento dessa população seria um processo de neurogênese em CA1 promovendo um aumento dos neurônios IB. Um fenômeno similar foi observado utilizando diferentes modelos de injúria neuronal como a pilocarpina (Lewis *et al.*, 1981; Parent *et al.*, 1997; Scharfman *et al.*, 2003) ácido caínico e kindling (Parent, 2003) no GD, onde a neurogênese nesta região favoreceria a geração das crises (Parent *et al.*, 1997, 2003). Scharfman e colaboradores (2003) observaram que a neurogênese acontecia antes da indução do SE pela pilocarpina e que após havia um aumento da taxa do fenômeno. Além disso, os autores verificaram que as propriedades eletrofisiológicas dos “novos” neurônios do GD dos animais epiléticos (NGDE) eram semelhantes aos controles (NGD). No mesmo estudo ficou evidenciado que nos NGDE havia uma propensão a gerar atividade espontânea ao contrário do NGD e a formação de novos circuitos, foram observadas através da marcação com c-fos 3 horas após a crise. Todavia em nenhum dos trabalhos citados acima relatava

a neurogênese de neurônios IB, ao mesmo tempo a hipótese não pode ser totalmente descartada. Para aceitar ou refutar esta hipótese serão necessários estudos eletrofisiológicos associado a técnicas imunistoquímicas para verificar a natureza destes neurônios.

Outro mecanismo que pode estar envolvido a um aumento das observações dos neurônios IB está associado a uma modificação do padrão de disparo neuronal (Sterfáde, 2004) isto é, um neurônio RS que literalmente se “transforma” em IB. Estudos *in vitro* com alteração da composição do meio de perfusão provocavam a geração de atividade em salva em neurônios que apresentavam inicialmente potenciais de ação isolados, nos modelos de alta concentração de potássio (Jensem *et al*, 1994,1996; Sanabria *et al*, 2001) ou na infusão de Ringer sem magnésio (Tavares *et al*, 2002). *In vivo* a alteração do micro ambiente celular pode levar a alterações do padrão neuronal interferindo também na sua acomodação, como a presença de neurotransmissores (acetilcolina e noradrenalina, etc.) alterando as correntes iônicas participantes da acomodação neuronal (Madison e Nicoll, 1984) No caso dos animais tratados com pilocarpina há uma susceptibilidade maior desses neurônios a modificar o seu padrão de disparo.

Em animais com epilepsia crônica o aumento relativo dos neurônios IB pode, portanto significar um processo de neuroplasticidade ao insulto e lesão *pós-status epilepticus*. Os neurônios com atividade em salva podem participar ativamente na sincronização dos neurônios locais (plasticidade sináptica, recrutamento da rede neuronal, etc) promovendo a geração de descargas epileptiformes. A estrutura da rede neural vai se modificando progressivamente após o SE (formação de circuitos excitatórios, aumento da expressão de

receptores glutamatérgicos e da desinibição, etc) levando a transformação de todo o agregado neuronal.

No tecido humano foi observada uma situação inversa onde a população dos neurônios com atividade em salva encontrava-se ainda mais reduzida. O estudo *in vitro* das propriedades eletrofisiológicas dos neurônios tem sido infrutífero em demonstrar aumento do padrão IB de áreas epileptogênicas na ELT humana (Avoli e Williamson, 1996). Não deve ser descartado que a dificuldade de obtenção de neurônios com atividade em salva pode estar relacionada com a medicação administrada aos pacientes epiléticos, que em geral estão submetidos a politerapia.

Um outro aspecto a ser questionado é se o tempo de epilepsia destes pacientes não influenciaria na redução do número de observações da atividade em salva. Neste caso os pacientes com epilepsia nos estágios iniciais apresentariam um número elevado de neurônios com atividade em salva, mas que com o tempo de epilepsia e a morte neuronal levaria uma redução destes neurônios. Os neurônios sobreviventes apresentariam uma série de anomalias em suas acomodações e disparo neuronal que juntamente com os poucos neurônios IB existentes, promoveriam a geração das crises. Nestes pequenos circuitos, a atividade epileptiforme neles gerada pode, por sua vez propagar-se para outras áreas menos lesadas, com um potencial maior no que se refere à gênese de atividade epilética de grande magnitude. Babb e colaboradores (Babb *et al.*, 1984) demonstraram que as células sobreviventes na epilepsia do lobo temporal podem se integrar a uma circuitária altamente epileptogênica. Desta forma podemos sugerir que devam existir mecanismos celulares distintos que se modificam com o tempo de epilepsia. Infelizmente os dados

apresentados no presente estudo não nos permite outra coisa a não ser conjecturas.

Entretanto, nossos dados são compatíveis com as observações de O'Mara (2001) no subiculum e reforçam os questionamentos de Wozni e colaboradores (2003), a respeito da necessidade de rever conceitos sobre importância dos neurônios IB durante as crises (Yaari e Beck, 2002).

O comportamento do funcionamento do neurônio do foco epiléptico em relação aos outros neurônios adjacentes é extremamente complexo. Existem muitos elementos na literatura que abordam a patofisiologia das epilepsias, entretanto estamos longe do entendimento pleno dos mecanismos que as envolvem. Segundo Sloviter (2005), existe muita informação, mas pouco conhecimento. O fato de classificarmos estes neurônios de acordo com as características do disparo serve apenas como ferramenta de simplificação .

Na tabela 17, buscamos fazer uma correspondência entre os padrões aqui relatados em diferentes áreas cerebrais e espécies animais.

Além disso, a categorização dos disparos neuronais não significa que este não assuma, momentaneamente características do outro padrão em resposta a modificação do meio como já foi comentado. Desta forma, assim como nos neuronios corticais, verificamos que dentro da área de CA1 encontramos uma ampla diversidade de padrões de disparo. Ao contrário de outras regiões do cérebro (Silva et al, 1991; Connors e Gutnick, 1990) os padrões de disparo dos neuronios de CA1 não se encontram regionalizados. Isto pode ser explicado pela própria função dos neurônios hipocampais no aprendizado e memória.

Desta forma nossos resultados podem representar um processo de seleção dos neurônios e que aqueles sobreviventes seriam responsáveis pelos padrões de descargas observados.

TABELA 17: Tentativa de correspondência entre as classes eletrofisiológicas observadas (primeira e segunda coluna) e estudos prévios (quarta coluna) com os respectivos padrões eletrofisiológicos (terceira coluna).

CP	SUB	
RS		disparos isolados (<i>in vivo</i> CA ₂₋₄ de gato)
		CA ₁ (<i>in vitro</i> , CA1 de ratos)
fRS		RS ₁ (<i>in vitro</i> , cortex de camundongo)
		fRS (<i>in vivo</i> , córtex de gato)
		RS1 e RS2
		sRS _{grupo I} (<i>in vivo</i> , córtex de rato)
		fRS (<i>in vivo</i> , córtex de rato)
		IB (<i>in vitro</i> , cortex de rato)
		RS-SA e RS-FA (<i>in vitro</i> córtex de rato)
		RS ₁ (<i>in vitro</i> , córtex de ratos long-Evans hooded)
sRS		RS (<i>in vitro</i> , cobáia)
		RS ₂ (<i>in vitro</i> , córtex de camundongo)
		RS (<i>in vitro</i> , córtex de gato)
		Tipo ₁ (<i>in vitro</i> , córtex de rato)
		sRS _{grupo II} (<i>in vivo</i> , córtex de rato)
		RS (<i>in vitro</i> , córtex peririnal de rato)
		RS (<i>in vivo</i> , córtex visual de gato)
		RS ₂ (<i>in vitro</i> , córtex de ratos long-Evans hooded)
LRS		LS (<i>in vitro</i> , córtex peririnal de rato)
IB		Neurônios com descargas em salva
		Grau II(?) (<i>in vitro</i> , CA1 de rato)
ROB		IB (<i>in vivo</i> , córtex visual de gato)
fROB		SB (?) (<i>in vitro</i> subiculum de rato)
sROB		“doublet or burst” (<i>in vitro</i> , córtex de gato)
		IB (<i>in vitro</i> , porco da índia)
		WB (?) (<i>in vitro</i> subiculum de rato)
		IB (<i>in vitro</i> , córtex de ratos long-Evans hooded)
wROB		ROB (<i>in vitro</i> , córtex de rato)
		IB (<i>in vitro</i> córtex de rato)
FS		FS (<i>in vitro</i> , córtex de gato)
		FS (<i>in vitro</i> , porco da índia)
		Tipo 2 (<i>in vitro</i> , córtex de rato)

CONCLUSÕES

1. Os padrões de disparo de neurônios de CA1 do hipocampo foram heterogêneos : RS, IB e ROB (presentes no hipocampo de ratos e tecido hipocampal humano) e FS (tecido hipocampal humano).

2. Presença de subtipos de disparo RS:

comuns a ratos e tecido hipocampal humano: SRS e FRS

exclusivo para o tecido hipocampal humano: LRS

3. Presença de Subtipos IB:

comuns a ratos e tecido hipocampal humano: aIB

comuns a ratos epiléticos e tecido hipocampal humano :

WibPresença de subtipos de disparo ROB:

comuns a ratos e tecido hipocampal humano: SROB e FROB

comuns a ratos controles e tecido hipocampal humano : WROB

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar e comparar os diferentes padrões de disparo dos neurônios de CA1 de ratos (controles e com epilepsia induzida pela pilocarpina) e de hipocampo humano cirurgicamente removido para o tratamento da epilepsia do lobo temporal refratária. Em nosso estudo, identificamos os padrões RS (do inglês “*regular-spiking*”), IB (do inglês “*intrinsic bursting*”), ROB (do inglês “*repetitive oscillatory bursting*”) e FS (do inglês “*fast-spiking*”). O padrão FS foi observado somente no tecido humano. De acordo com a frequência instantânea, observamos diferentes graus de acomodação nos padrões RS, IB e ROB: 1- neurônios que apresentaram acomodação rápida, $_F$ RS, $_F$ ROB ($_F$ -do inglês *fast*), 2- acomodação lenta, $_S$ RS, $_S$ ROB ($_S$ -do inglês *slow*), 3- com acomodação, $_a$ IB ($_a$ - do inglês *accommodation*); 4- neurônios sem acomodação $_w$ ROB e $_w$ IB ($_w$ -do inglês *without*) e 5- com latência para o primeiro disparo, $_L$ RS ($_L$ - do inglês *late*). O padrão $_w$ ROB foi observado em ratos controles e tecido humano. O padrão $_w$ IB foi observado em ratos epiléticos e tecido humano. O padrão $_L$ RS foi encontrado exclusivamente no tecido humano. O estudo comparativo das propriedades elétricas passivas revelou alterações nas propriedades do padrão $_S$ RS, entre controles e tecido epilético. Além disso, foi observado que a população de neurônios IB estava elevada em ratos tratados com pilocarpina com relação aos controles. Já no tecido humano, esta população estava reduzida. Nossos resultados sugerem que no modelo de epilepsia da pilocarpina e na epilepsia temporal humana ocorram processos de seletividade neuronal distintos. Além disso, este trabalho é pioneiro na caracterização criteriosa dos padrões de disparo neuronal não só em CA1 de roedores, mas principalmente no tecido

humano. Identificar e caracterizar os disparos neuronais de CA1 humano pode ser a chave para a compreensão da interação entre os neurônios na formação dos circuitos neuronais e maior conhecimento da epileptogênese temporal.

ABSTRACT

The aim of the present study was to characterize and compare the firing patterns of neurons from the CA1 region of rats (control and pilocarpine-treated) and patients submitted to the surgical removal of part of the hippocampus to treat refractory temporal lobe epilepsy. We identified the following patterns: RS (*regular-spiking*), IB (*intrinsic bursting*), ROB (*repetitive oscillatory bursting*) and FS (*fast-spiking*). FS was observed only in human tissue. Based on the instantaneous frequency, we found different degrees of accommodation in patterns RS, IB and ROB. 1- neurons with fast accommodation: $_F$ RS, $_F$ ROB (*F-fast*), 2- slow accommodation: $_S$ RS, $_S$ ROB (*S-slow*), 3-with accommodation: $_a$ IB (*a-accommodation*); 4- without accommodation: $_W$ ROB and $_W$ IB (*W-without*) and 5-latency for the first spike: $_L$ RS (*L-late*). $_W$ ROB cells were observed in control animals and human tissue. $_W$ IB neurons were detected in pilocarpine-treated animals and human tissue. $_L$ RS neurons were only found in human tissue. Comparison of passive electrical properties revealed alterations in the properties of $_S$ RS neurons between control and pilocarpine-treated animals. In addition, we observed that the population of neurons presenting activity bursts was increased in pilocarpine-treated rats when compared to controls. In human tissue, this population was reduced. Our results suggest that different processes of neuronal selection occur in the pilocarpine epilepsy model and in human temporal epilepsy. Furthermore, this study is the first to characterize in detail the firing patterns not only in rodent CA1 but, particularly, in human tissue. Identifying and characterizing firing patterns in human CA1 might be the key to understand the way neurons interact to form neuronal circuits, something that surely will enlarge our knowledge about the pathophysiology of epilepsy.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Affifi AK e Bergman RA. (1998). *Functional Neuroanatomy: Text and Atlas*. McGraw-Hill., New York.
2. Agmon A e Connors BW. (1989). Repetitive burst-firing neurons in the deep layers of mouse somatosensory cortex. *Neurosci Lett* 99, 137-141.
3. Agmon A e Connors BW. (1992). Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *J Neurosci* 12, 319-329.
4. Aika Y, Ren JQ, Kosaka K e Kosaka T. (1994). Quantitative analysis of GABA-like-immunoreactive and parvalbumin-containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the disector. *Exp Brain Res* 99, 267-276
5. Alger BE, Dhanjal SS, Dingledine R, Garthwaite J, Henderson G e King GL. (1984). Appendix: Brain Slices Methods. In *Brain Slices*, ed. Dingledine R, pp. 381-437. Plenum Press, New York.
6. Ali AB, Deuchars J, Pawelzik H e Thomson AM. (1998). CA1 pyramidal to basket and bistratified cell EPSPs: dual intracellular recordings in rat hippocampal slices. *J Physiol* 507 (Pt 1), 201-217.
7. Altemus KL, Lavenex P, Ishizuka N e Amaral DG. (2005). Morphological characteristics and electrophysiological properties of CA1 pyramidal neurons in macaque monkeys. *Neuroscience* 136, 741-756.
8. Amaral DG e Witter MP. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.
9. Anderson P, Bliss TV e Skrede KK. (1971). Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 13, 222-238.
10. Arida RM, Scorza FA, Perez CA, Cavalheiro EA. (1999). The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy *Epilepsy res*, 34: 99-107
11. Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G e Tancredi V. (2002). Network and pharmacological

- mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol* 68, 167-207.
12. Avoli M, Louvel J, Pumain R e Kohling R. (2005). Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol* 77, 166-200.
 13. Avoli M e Olivier A. (1989). Electrophysiological properties and synaptic responses in the deep layers of the human epileptogenic neocortex in vitro. *J Neurophysiol* 61, 589-606.
 14. Avoli M e Williamson A. (1996). Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro. *Prog Neurobiol* 48, 519-554.
 15. Babb TL, Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Yeoman KM e Kuhlman PA. (1996). Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 26, 193-205.
 16. Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR e Crandall PH. (1989). Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 9, 2562-2574.
 17. Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J e Crandall PH. (1984). Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia* 25, 721-728.
 18. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN e Langer SZ. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50, 291-313.
 19. Bear J, Fountain NB e Lothman EW. (1996). Responses of the superficial entorhinal cortex in vitro in slices from naive and chronically epileptic rats. *J Neurophysiol* 76, 2928-2940.
 20. Beggs JM, Moyer JR, Jr., McGann JP e Brown TH. (2000). Prolonged synaptic integration in perirhinal cortical neurons. *J Neurophysiol* 83, 3294-3298.

21. Bekenstein JW e Lothman EW. (1993). Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 259, 97-100.
22. Ben-Ari Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375-403.
23. Bender RA, Soleymani SV, Brewster AL, Nguyen ST, Beck H, Mathern GW e Baram TZ. (2003). Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) in surviving dentate gyrus granule cells of human and experimental epileptic hippocampus. *J Neurosci* 23, 6826-6836.
24. Bilkey DK e Schwartzkroin PA. (1990). Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain Res* 514, 77-83.
25. Blakemore C e Campbell FW. (1969). Adaptation to spatial stimuli. *J Physiol* 200, 11P-13P.
26. Blumcke I, Beck H, Scheffler B, Hof PR, Morrison JH, Wolf HK, Schramm J, Elger CE e Wiestler OD. (1996). Altered distribution of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit GluR2(4) and the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol (Berl)* 92, 576-587.
27. Blumcke I, Zusratter W, Schewe JC, Suter B, Lie AA, Riederer BM, Meyer B, Schramm J, Elger CE e Wiestler OD. (1999). Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. *J Comp Neurol* 414, 437-453.
28. Bradford HF. (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol* 47, 477-511.
29. Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M e Baram TZ. (2002). Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* 22, 4591-4599.

30. Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY e Coulter DA. (1998). Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 4, 1166-1172.
31. Brown TH e Zador AM. (1997). Hippocampus. In *Synaptic Organization of the Brain*, 4 edn, ed. Shepherd GM, pp. 346-378. Oxford University Press, New York.
32. Buckmaster PS, Zhang GF e Yamawaki R. (2002). Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *J Neurosci* 22, 6650-6658.
33. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C e Turski L. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32, 778-782.
34. Cavalheiro EA, Santos NF e Priel MR. (1996). The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia* 37, 1015-1019.
35. Cavazos JE, Jones SM e Cross DJ. (2004). Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience* 126, 677-688.
36. Chagnac-Amitai Y e Connors BW. (1989). Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J Neurophysiol* 62, 1149-1162.
37. Chen K, Aradi I, Santhakumar V e Soltesz I. (2002). H-channels in epilepsy: new targets for seizure control? *Trends Pharmacol Sci* 23, 552-557.
38. Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ e Soltesz I. (2001). Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med* 7, 331-337.
39. Chen W, Zhang JJ, Hu GY e Wu CP. (1996a). Different mechanisms underlying the repolarization of narrow and wide action potentials in

- pyramidal cells and interneurons of cat motor cortex. *Neuroscience* 73, 57-68.
40. Chen W, Zhang JJ, Hu GY e Wu CP. (1996b). Electrophysiological and morphological properties of pyramidal and nonpyramidal neurons in the cat motor cortex in vitro. *Neuroscience* 73, 39-55.
 41. Cho RH, Segawa S, Mizuno A e Kaneko T. (2004). Intracellularly labeled pyramidal neurons in the cortical areas projecting to the spinal cord. I. Electrophysiological properties of pyramidal neurons. *Neurosci Res* 50, 381-394.
 42. Choi DW, Maulucci-Gedde M e Kriegstein AR. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7, 357-368.
 43. Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M e Miles R. (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298, 1418-1421.
 44. Cohen I, Navarro V, Le Duigou C e Miles R. (2003). Mesial temporal lobe epilepsy: a pathological replay of developmental mechanisms? *Biol Cell* 95, 329-333.
 45. Connors BW e Gutnick MJ. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13, 99-104.
 46. Connors BW, Gutnick MJ e Prince DA. (1982). Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 48, 1302-1320.
 47. Contreras D. (2004). Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural Netw* 17, 633-646.
 48. Coulter DA. (2000). Mossy fiber zinc and temporal lobe epilepsy: pathological association with altered "epileptic" gamma-aminobutyric acid A receptors in dentate granule cells. *Epilepsia* 41 Suppl 6, S96-99.
 49. de Lanerolle NC e Lee TS. (2005). New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 7, 190-203.
 50. Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J e Giovanni Y. (2002). Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat

- prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex* 12, 1-16.
51. Descalzo VF, Nowak LG, Brumberg JC, McCormick DA e Sanchez-Vives MV. (2005). Slow adaptation in fast-spiking neurons of visual cortex. *J Neurophysiol* 93, 1111-1118.
 52. Dietrich D, Clusmann H, Kral T, Steinhauser C, Blumcke I, Heinemann U e Schramm J. (1999). Two electrophysiologically distinct types of granule cells in epileptic human hippocampus. *Neuroscience* 90, 1197-1206.
 53. Dudek FE. (2001). Zinc and Epileptogenesis. *Epilepsy Curr* 1, 66-70.
 54. Dumont EC, Martina M, Samson RD, Drolet G e Pare D(2002) Physiological properties of central amygdala neurons: species differences *European Journal of Neuroscience*, Vol. 15, pp. 545±552,
 55. Empson RM e Jefferys JG. (1993). Synaptic inhibition in primary and secondary chronic epileptic foci induced by intrahippocampal tetanus toxin in the rat. *J Physiol* 465, 595-614.
 56. Faulkner B e Brown TH. (1999). Morphology and physiology of neurons in the rat perirhinal-lateral amygdala area. *J Comp Neurol* 411, 613-642.
 57. Feder R e Ranck JB, Jr. (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. II. Hippocampal slow waves and theta cell firing during bar pressing and other behaviors. *Exp Neurol* 41, 532-555.
 58. Fernandes JG. (1993). Epidemiologia das crises epilépticas em Porto Alegre: um estudo populacional. In *Curso de pósgraduação em Medicina*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul., Porto Alegre.
 59. Foehring RC, Lorenzon NM, Herron P e Wilson CJ. (1991). Correlation of physiologically and morphologically identified neuronal types in human association cortex in vitro. *J Neurophysiol* 66, 1825-1837.
 60. Foehring RC e Wyler AR. (1990). Two patterns of firing in human neocortical neurons. *Neurosci Lett* 110, 279-285.

61. Fountain NB, Bear J, Bertram EH, 3rd e Lothman EW. (1998). Responses of deep entorhinal cortex are epileptiform in an electrogenic rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 80, 230-240.
62. Fox SE e Ranck JB, Jr. (1981). Electrophysiological characteristics of hippocampal complex-spike cells and theta cells. *Exp Brain Res* 41, 399-410.
63. Frederickson CJ, Hernandez MD e McGinty JF. (1989). Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res* 480, 317-321.
64. Friedman LK, Pellegrini-Giampietro DE, Sperber EF, Bennett MV, Moshe SL e Zukin RS. (1994). Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. *J Neurosci* 14, 2697-2707.
65. Fustes OJH e Fustes OJH. (1992). Historia de las epilepsias apuntes historicos cubanos. *Jornal da Liga Brasileira contra Epilepsia* 5, 47-49.
66. Gastaut H. (1973). Letter: 'Epileptic seizures'. *Dev Med Child Neurol* 15, 688-689.
67. Gastaut H, Gastaut JL, Goncalves e Silva GE e Fernandez Sanchez GR. (1975). Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 16, 457-461.
68. Gill R e Lodge D. (1997). Pharmacology of AMPA antagonists and their role in neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 40, 197-232.
69. Gloor P. (1997). *The Temporal Lobe and Limbic System*. Oxford University Press, Oxford.
70. Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E e Lopes da Silva FH. (2001). Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci* 13, 657-669.

71. Gottlieb JP e Keller A. (1997). Intrinsic circuitry and physiological properties of pyramidal neurons in rat barrel cortex. *Exp Brain Res* 115, 47-60.
72. Grooms SY, Opitz T, Bennett MV e Zukin RS. (2000). Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3631-3636.
73. Hammond C. (2000). Subliminal Voltage-Gated Currents of the Somato-Dendritic Membrane. In *Cellular and Molecular Neurobiology*, ed. Hammond C, pp. 358-373. Academic Press, Paris.
74. Hefti BJ e Smith PH. (2000). Anatomy, physiology, and synaptic responses of rat layer V auditory cortical cells and effects of intracellular GABA(A) blockade. *J Neurophysiol* 83, 2626-2638.
75. Henderson G. (1993). Capitulo 5: Pharmacological Analysis of Synaptic Transmission in Brain Slices. In *Electrophysiology: A practical Approach*, ed. Wallis DI, pp. 89-107. Oxford University press, Oxford.
76. Hollmann M, Hartley M e Heinemann S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252, 851-853.
77. Horikawa K, Armstrong WE (1988). A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods*. 25(1), 1-11.
78. Hutcheon B e Yarom Y. (2000). Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci* 23, 216-222.
79. Inaba Y, Biagini G e Avoli M. (2006). The H current blocker ZD7288 decreases epileptiform hyperexcitability in the rat neocortex by depressing synaptic transmission. *Neuropharmacology*.
80. Ishizuka N, Weber J e Amaral DG. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295, 580-623.
81. Isokawa M. (1996). Decreased time constant in hippocampal dentate granule cells in pilocarpine-treated rats with progressive seizure frequencies. *Brain Res* 718, 169-175.

82. Jensen MS, Azouz R e Yaari Y. (1994). Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J Neurophysiol* 71, 831-839.
83. Jensen MS, Azouz R e Yaari Y. (1996). Spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 492 (Pt 1), 199-210.
84. Kandel ER e Spencer WA. (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons. II. After-potentials and repetitive firing. *J Neurophysiol* 24, 243-259.
85. Karpuk NN e Vorob'ev VV. (2004). The role of the electrophysiological properties of neurons in the mechanisms grouping their discharges in the cerebral cortex. *Neurosci Behav Physiol* 34, 881-888.
86. Kitayama M, Miyata H, Yano M, Saito N, Matsuda Y, Yamauchi T e Kogure S. (2003). Ih blockers have a potential of antiepileptic effects. *Epilepsia* 44, 20-24.
87. Klink R e Alonso A. (1997). Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 77, 1829-1843.
88. Knopp A, Kivi A, Wozny C, Heinemann U e Behr J. (2005). Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 483, 476-488.
89. Kohling R e Avoli M. (2006). Methodological approaches to exploring epileptic disorders in the human brain in vitro. *J Neurosci Methods* 155, 1-19.
90. Knowles WD. (1992). Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol* 9, 252-263.
91. Kohling R. (2002). Neuroscience. GABA becomes exciting. *Science* 298, 1350-1351.
92. Kohling R, Lucke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H e Ooppel F. (1998). Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain* 121 (Pt 6), 1073-1087.
93. Kohr G e Mody I. (1994). Kindling increases N-methyl-D-aspartate potency at single N-methyl-D-aspartate channels in dentate gyrus granule cells. *Neuroscience* 62, 975-981.

94. Koyama R e Ikegaya Y. (2004). Mossy fiber sprouting as a potential therapeutic target for epilepsy. *Curr Neurovasc Res* 1, 3-10.
95. Lancaster B e Adams PR. (1986). Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 55, 1268-1282.
96. Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, Eilers A, Kivi A, Schulze K, Lanksch WR, Meencke HJ e Heinemann U. (2000). Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia* 41 Suppl 6, S190-194.
97. Lewis DV, Jr., Zbicz KL, Nepp ME, Colmers WF e Wilson WA. (1981). Diphenylhydantoin enhances early adaptation in Aplysia giant neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 218, 41-45.
98. Llinas RR. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242, 1654-1664.
99. Locke RE e Nerbonne JM. (1997a). Role of voltage-gated K⁺ currents in mediating the regular-spiking phenotype of callosal-projecting rat visual cortical neurons. *J Neurophysiol* 78, 2321-2335.
100. Locke RE e Nerbonne JM. (1997b). Three kinetically distinct Ca²⁺-independent depolarization-activated K⁺ currents in callosal-projecting rat visual cortical neurons. *J Neurophysiol* 78, 2309-2320.
101. Lorenzon NM e Foehring RC. (1992). Relationship between repetitive firing and afterhyperpolarizations in human neocortical neurons. *J Neurophysiol* 67, 350-363.
102. Lynch MA e O'Mara SM. (1997). Electrophysiological Recording in Brain Slide. In *Neuroscience Labfax*, pp. 13-32. Academic Press.
103. Maccaferri G e McBain CJ. (1995). Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* 15, 137-145.
104. Madison DV e Nicoll RA. (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 354, 319-331.

105. Mangan PS e Lothman EW. (1996). Profound disturbances of pre- and postsynaptic GABAB-receptor-mediated processes in region CA1 in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 76, 1282-1296.
106. Masukawa LM, Benardo LS e Prince DA. (1982). Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different subfields. *Brain Res* 242, 341-344.
107. Mathern GW, Bertram EH, 3rd, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Spradlin S e Mendoza D. (1997). In contrast to kindled seizures, the frequency of spontaneous epilepsy in the limbic status model correlates with greater aberrant fascia dentata excitatory and inhibitory axon sprouting, and increased staining for N-methyl-D-aspartate, AMPA and GABA(A) receptors. *Neuroscience* 77, 1003-1019.
108. McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW e Prince DA. (1985). Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 54, 782-806.
109. Mcllmwain H e Buddle HL. (1953). Techniques in tissue metabolism.1. A mechanical chopper. *Biochemichal Journal* 53, 412-420.
110. McNamara JO. (1994). Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 14, 3413-3425.
111. Mello L.M.A, Cavalheiro E. A ; Tan M. A , et al (1993). Circuit mechanisms of seizure in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fibers sprouting. *Epilepsia*, 34(6):985- 94; 1993
112. Mody I e Heinemann U. (1987). NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. *Nature* 326, 701-704.
113. Mountcastle VB, Talbot WH, Sakata H e Hyvarinen J. (1969). Cortical neuronal mechanisms in flutter-vibration studied in unanesthetized monkeys. Neuronal periodicity and frequency discrimination. *J Neurophysiol* 32, 452-484.

114. Nadler JV, Perry BW e Cotman CW. (1980). Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res* 182, 1-9.
115. Nakanishi S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.
116. Neher E, Sakmann B e Steinbach JH. (1978). The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 375, 219-228.
117. Noebels JL. (2002). Sodium channel gene expression and epilepsy. *Novartis Found Symp* 241, 109-120; discussion 120-103, 226-132.
118. Nowak LG, Azouz R, Sanchez-Vives MV, Gray CM e McCormick DA. (2003). Electrophysiological classes of cat primary visual cortical neurons in vivo as revealed by quantitative analyses. *J Neurophysiol* 89, 1541-1566.
119. Nunez A, Amzica F e Steriade M. (1993). Electrophysiology of cat association cortical cells in vivo: intrinsic properties and synaptic responses. *J Neurophysiol* 70, 418-430.
120. O'Dell TJ e Alger BE. (1991). Single calcium channels in rat and guinea-pig hippocampal neurons. *J Physiol* 436, 739-767.
121. O'Keefe J e Dostrovsky J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34, 171-175.
122. O'Mara SM, Commins S, Anderson M e Gigg J. (2001). The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 64, 129-155.
123. Pape HC. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58, 299-327.
124. Parent JM. (2003). Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 9, 261-272.
125. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS e Lowenstein DH. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network

- reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17, 3727-3738.
126. Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH e Thompson SM. (1997). Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron* 18, 463-472.
127. Poolos NP. (2004). The Yin and Yang of the H-Channel and Its Role in Epilepsy. *Epilepsy Curr* 4, 3-6.
128. Prince DA e Tseng GF. (1993). Epileptogenesis in chronically injured cortex: in vitro studies. *J Neurophysiol* 69, 1276-1291.
129. Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, v. 32, p. 334-340,
130. Ranck JB, Jr. (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol* 41, 461-531.
131. Regesta G e Tanganelli P. (1999). Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res* 34, 109-122.
132. Remy S e Beck H. (2006). Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 129, 18-35.
133. Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM e Nadler JV. (2000). Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. *J Comp Neurol* 428, 240-253.
134. Sanabria ER, Su H e Yaari Y. (2001). Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* 532, 205-216.
135. Sanabria EG. (1999). Estudo eletrofisiológico da epileptogênese crônica no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina. In *Escola Paulista de Medicina*, pp. 205. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
136. Sanabria EG, Scorza FA e Cavalheiro EA. (1997). O Uso de Fatias de Tecido Cerebral (Brain Slices) No Estudo da Epilepsia do Lobo Temporal. *Revista de Neurociências* 5, 34-46.

137. Sander JW e Hart YM. (1999). Capítulo 1: O que é Epilepsia? In *Epilepsia: Um Guia Prático*, ed. Sander JW e Hart YM, pp. 13. Merit-Publishing International, Coral Springs.
138. Santoro B e Baram TZ. (2003). The multiple personalities of h-channels. *Trends Neurosci* 26, 550-554.
139. Santoro B e Tibbs GR. (1999). The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868, 741-764.
140. Scharfman HE, Sollas AE, Berger RE, Goodman JH e Pierce JP. (2003). Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. *Neuroscience* 121, 1017-1029.
141. Schwartzkroin PA. (1994). Cellular electrophysiology of human epilepsy. *Epilepsy Res* 17, 185-192.
142. Schwartzkroin PA. (1975). Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain Res* 85, 423-436.
143. Schwartzkroin PA, Turner DA, Knowles WD e Wyler AR. (1983). Studies of human and monkey "epileptic" neocortex in the in vitro slice preparation. *Ann Neurol* 13, 249-257.
144. Schwartzkroin PA e Prince DA. (1976). Microphysiology of human cerebral cortex studied in vitro. *Brain Res* 115, 497-500.
145. Schwartzkroin PA e Prince DA. (1978). Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. *Brain Res* 147, 117-130.
146. Segal M, Rogawski MA e Barker JL. (1984). A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurons. *J Neurosci* 4, 604-609.
147. Sensi SL, Yin HZ e Weiss JH. (1999). Glutamate triggers preferential Zn²⁺ flux through Ca²⁺ permeable AMPA channels and consequent ROS production. *Neuroreport* 10, 1723-1727.
148. Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X e Johnston D. (2004). Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron* 44, 495-508.

149. Shepherd GM e Koch C. (1997). Introduction to synaptic circuits. In *Synaptic Organization of the Brain*, 4^o edn, ed. Shepherd GM, pp. 1-36. Oxford University Press, New York.
150. Silva LR, Amitai Y e Connors BW. (1991a). Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 251, 432-435.
151. Silva LR, Gutnick MJ e Connors BW. (1991b). Laminar distribution of neuronal membrane properties in neocortex of normal and reeler mouse. *J Neurophysiol* 66, 2034-2040
- Sloviter RS. (1991). Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1, 41-66.
152. Sloviter RS. (2005). The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol* 328, 143-153.
153. Sloviter RS. (1999). Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization. *Epilepsia* 40 Suppl 1, S34-39; discussion S40-31.
154. Stables JP, Bertram EH, White HS, Coulter DA, Dichter MA, Jacobs MP, Loscher W, Lowenstein DH, Moshe SL, Noebels JL e Davis M. (2002). Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland. *Epilepsia* 43, 1410-1420.
155. Staff NP, Jung HY, Thiagarajan T, Yao M e Spruston N. (2000). Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 84, 2398-2408.
156. Stafstrom CE. (2005). The role of the subiculum in epilepsy and epileptogenesis. *Epilepsy Curr* 5, 121-129.
157. Staley KJ, Otis TS e Mody I. (1992). Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J Neurophysiol* 67, 1346-1358.
158. Steriade M. (2004). Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat Rev Neurosci* 5, 121-134.

159. Storm JF. (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385, 733-759.
160. Strowbridge BW, Sheperd GM, Spencer DD e Masukawa LM. (1987). Intracellular Responses of Human Cortical Biopsies Maintained in vitro. *Society for Neuroscience* 13, 941.
161. Surges R, Freiman TM e Feuerstein TJ. (2003). Gabapentin increases the hyperpolarization-activated cation current Ih in rat CA1 pyramidal cells. *Epilepsia* 44, 150-156.
162. Tavares AA, Da Costa JC, Salamoni SD, Fonseca GK, Simão F, Breda RV, Paglioli-Neto E, Azambuja N, Palmieri A. (2002) Estudo eletrofisiológico das propriedades neuronais intrínsecas passivas de CA1 em fatias hipocâmpais de ratos e de tecido humano. *J.f Epilepsy and Clinical Neurophysiol.* 8(4);.229-234
163. Tateno T, Harsch A e Robinson HP. (2004). Threshold firing frequency-current relationships of neurons in rat somatosensory cortex: type 1 and type 2 dynamics. *J Neurophysiol* 92, 2283-2294.
164. Treiman DM. (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 Suppl 3, 8-12.
165. Tseng GF e Prince DA. (1993). Heterogeneity of rat corticospinal neurons. *J Comp Neurol* 335, 92-108.
166. Tseng GF e Prince DA. (1996). Structural and functional alterations in rat corticospinal neurons after axotomy. *J Neurophysiol* 75, 248-267.
167. Turner DA, Buhl EH, Hailer NP e Nitsch R. (1998). Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. *Prog Neurobiol* 55, 537-562.
168. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z e Turski L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9, 315-335.
169. van der Linden S e Lopes da Silva FH. (1998). Comparison of the electrophysiology and morphology of layers III and II neurons of the rat medial entorhinal cortex in vitro. *Eur J Neurosci* 10, 1479-1489.

170. Watts AE, Whittington MA e Jefferys JG. (1993). Epileptic focus induced in rat by intrahippocampal cholera toxin: neuronal properties in vitro. *Neuroscience* 55, 45-56.
171. Weiss JH e Sensi SL. (2000). Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci* 23, 365-371.
172. Williams S, Vachon P e Lacaille JC. (1993). Monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic potentials in CA1 pyramidal cells of hyperexcitable hippocampal slices from kainic acid-treated rats. *Neuroscience* 52, 541-554.
173. Williams SR e Stuart GJ. (1999). Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 521 Pt 2, 467-482.
174. Williamson A, Telfeian AE e Spencer DD. (1995). Prolonged GABA responses in dentate granule cells in slices isolated from patients with temporal lobe sclerosis. *J Neurophysiol* 74, 378-387.
175. Witter MP, Griffioen AW, Jorritsma-Byham B e Krijnen JL. (1988). Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. *Neurosci Lett* 85, 193-198.
176. Wittner L, Eross L, Czirjak S, Halasz P, Freund TF e Magloczky Z. (2005). Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain* 128, 138-152.
177. Wong RK e Prince DA. (1978). Participation of calcium spikes during intrinsic burst firing in hippocampal neurons. *Brain Res* 159, 385-390.
178. Wozny C, Kivi A, Lehmann TN, Dehnicke C, Heinemann U e Behr J. (2003). Comment on "On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro". *Science* 301, 463; author reply 463.
179. Wu M, Shanabrough M, Leranth C e Alreja M. (2000). Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. *J Neurosci* 20, 3900-3908.
180. Wuarin JP e Dudek FE. (1996). Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. *J Neurosci* 16, 4438-4448.

-
181. Yaari Y e Beck H. (2002). "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 12, 234-239.
 182. Yamamoto C e McIlwain H. (1966). Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J Neurochem* 13, 1333-1343.
 183. Yang CR, Seamans JK e Gorelova N. (1996). Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. *J Neurosci* 16, 1904-1921.
 184. Zhang L, Valiante TA e Carlen PL. (1993). Contribution of the low-threshold T-type calcium current in generating the post-spike depolarizing afterpotential in dentate granule neurons of immature rats. *J Neurophysiol* 70, 223-231.
 185. Zhang N e Houser CR. (1999). Ultrastructural localization of dynorphin in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy: a study of reorganized mossy fiber synapses. *J Comp Neurol* 405, 472-490.