

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

Mayara Vendramin Pasquetti

**OSCILAÇÕES CORTICAIS E HIPOCAMPAIS INTERICTAIS E O EFEITO  
DO TRANSPLANTE DE PRECURSORES GABAÉRGICOS SOBRE ATIVIDADE  
PERI-ICTAL NO MODELO ANIMAL DE EPILEPSIA INDUZIDA POR  
PILOCARPINA**

Porto Alegre

2019

Mayara Vendramin Pasquetti

**OSCILAÇÕES CORTICAIS E HIPOCAMPAIS INTERICTAIS E O EFEITO  
DO TRANSPLANTE DE PRECURSORES GABAÉRGICOS SOBRE ATIVIDADE  
PERI-ICTAL NO MODELO ANIMAL DE EPILEPSIA INDUZIDA POR  
PILOCARPINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elisa Calcagnotto  
Coorientador: Prof. Dr. Adriano Bretanha Lopes Tort

Porto Alegre

2019

#### CIP - Catalogação na Publicação

Vendramin Pasquetti, Mayara  
OSCILAÇÕES CORTICAIS E HIPOCAMPAIS INTERICTAIS E O  
EFEITO DO TRANSPLANTE DE PRECURSORES GABAÉRGICOS SOBRE  
ATIVIDADE PERI-ICTAL NO MODELO ANIMAL DE EPILEPSIA  
INDUZIDA POR PILOCARPINA / Mayara Vendramin Pasquetti.

-- 2019.

127 f.

Orientador: Maria Elisa Calcagnotto.

Coorientador: Adriano Bretanha Lopes Tort.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Oscilações cerebrais. 2. Sistema GABAérgico. 3.  
Células Precursoras da MGE. 4. Análise Quantitativa de  
Eletroencefalograma-EEG. 5. Epilepsia. I. Calcagnotto,  
Maria Elisa, orient. II. Bretanha Lopes Tort,  
Adriano, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Bioquímica e aos pagadores de impostos, por fornecerem todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao Eduardo, sem o qual esta tese definitivamente não existiria. Obrigada por estar do meu lado todos os dias, por aguentar todos os ranços, por me dar todo o apoio e coragem do mundo. Afinal é só uma fase, falta pouco e eu tenho muito potencial;*

*À minha mãe, que me deu a vida, me ensinou o significado de perseverança, me ensinou que desistir não é uma opção e está sempre do meu lado em qualquer caminho;*

*À minha orientadora Elisa, por toda amizade e conhecimento, por ter me apresentado e me ajudado a desbravar os caminhos elétricos da neurociência;*

*Ao meu coorientador Adriano Tort, por todo conhecimento e ajuda, por ter me ensinado sobre o mundo da neurociência computacional;*

*À Letícia e a Jose por todos os porres, festas, discussões, conhecimentos, alegrias e tristezas. A Bol e a Fran, por toda amizade e companheirismo. A terapia do ranço foi fundamental. Essa tese também é um pouquinho de vocês. O que a pós-graduação une o homem não separa;*

*Ao Bobs que me ajudou em vários dos registros e me ensinou muito sobre como cuidar dos ratinhos;*

*A todos os colegas do lab 37 que ajudaram no caminho;*

*A todos os meus bioamigos, que estão do meu lado há 12 anos e fazem parte também desta conquista.*

*“Sonho que se sonha só  
É só um sonho que se sonha só  
Mas sonho que se sonha junto  
É realidade”  
Raul Seixas*

*Muito obrigada a todos!*

## RESUMO

Epilepsias refratárias com esclerose hipocampal e modelos animais de epilepsia com anormalidades na formação hipocampal, são associados com reorganização sináptica e consequente alteração do padrão de conectividade neuronal e oscilações cerebrais. Análise quantitativa do eletroencefalograma tem sido cada vez mais aplicada para estudar alterações específicas em oscilações cerebrais na epilepsia. A maioria destes estudos focam em análises durante ou no início das crises epiléticas. Contudo, a conectividade neuronal é também notavelmente alterada durante os estágios inter e pós-ictais. Neste trabalho, exploramos as alterações nos ritmos cerebrais no período interictal livre de pontas epileptiformes (IES). Estas alterações em oscilações cerebrais em epilepsia têm uma relação importante com anormalidades dos neurônios GABAérgicos, incluindo interneurônios que expressam parvalbumina e somatostatina. Realmente, a perda destes interneurônios do hipocampo é observada em epilepsia e associada com a reorganização anormal da rede neural em epileptogênese e em atividade epileptógena. Uma vez que a liberação de GABA na área hipocampal é dramaticamente reduzida quando as crises epiléticas começam a ocorrer em modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, nós analisamos a atividade da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e quantificamos o conteúdo de GABA e glutamato por HPLC. Como anormalidades do sistema GABAérgico constituem uma alteração importante em muitos tipos de epilepsia, por muitos anos terapias de reposição celular foram desenvolvidas com o intuito de restaurar a inibição em diferentes modelos animais, como a epilepsia. Nos focamos em investigar como transplantes de células precursoras da eminência gangliônica medial (MGE) afetam a rede neural anormal e, consequentemente, as oscilações cerebrais para modificar a atividade das crises epiléticas além de restaurar a inibição. Para tanto, primeiro quantificamos o potencial de campo local (LFP) *in vivo* em eletrodos corticais (camadas IV-CTX1 e V-ctx2) e em CA1 hipocampais (camadas oriens-Ors, piramidal-Pyr, radiada-Rad e lacunosa-molecular-LM) em ratos 5 semanas após injeção de pilocarpina. Os animais que receberam pilocarpina mas não apresentaram *status epilepticus* (SE) compõem o grupo não-SE (NSE). Animais que tiveram SE e posteriormente desenvolveram crises epiléticas espontâneas e recorrentes (CER) (animais epiléticos) exibiram maior potência de delta no córtex e Ors, Rad e LM no hipocampo. Eles também apresentaram menor potência de teta no córtex, Ors e LM, menor potência de gama lento em CTx1, Ctx2 e Ors, e menos gama médio e rápido no Ors. Animais NSE tiveram maior potência de delta e menor gama lento somente no Ctx1, e menor potência do teta no córtex e LM. Fundamentalmente, animais epiléticos apresentaram maior coerência córtico-hipocampal na faixa delta entre Ctx1-Ors, Ctx2-Ors, Ctx2-Pyr, Pyr-Ors e acoplamento fase-amplitude (PAC) mais forte da fase delta com todas as frequências na Rad. Animais NSE também apresentaram maior coerência córtico-hipocampal na frequência delta entre Ctx1-Ors e Ctx2-Ors, mas não houve alteração no PAC, sugerindo que há nestes animais alguma reorganização cortical. Em segundo lugar, nós analisamos a atividade da enzima GAD e quantificamos GABA e glutamato por HPLC no período crônico, uma vez que o fluxo de GABA é dramaticamente alterado na área hipocampal no modelo de pilocarpina. Contudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos analisados, controles, NSE e animais epiléticos. Em seguida, nós analisamos os efeitos das células derivadas da MGE transplantadas no hipocampo no modelo de epilepsia induzido por

pilocarpina. Para isso, realizamos a análise quantitativa de registros peri-ictais *in vivo* em registros corticais e hipocampais de animais epiléticos que receberam (Pilo+MGE) ou não (Pilo) transplante intra-hipocampal de precursores da MGE. As análises foram realizadas no período crônico, três meses após o transplante. Os principais achados foram: 1) As células transplantadas migraram e se diferenciaram em interneurônios maduros no parênquima cerebral hospedeiro. 2) Animais Pilo+MGE reduziram o número de crises epiléticas. 3) Animais Pilo+MGE apresentaram menor potência de delta e teta no córtex e hipocampo que Pilo, no período 5min pré-ictal, e no córtex no 5min pós-ictal. 4) Animais Pilo+MGE, no córtex, apresentaram aumento da potência de gama rápido e ripples e diminuição do acoplamento delta-gama rápido e delta-ripples nos 20s comparando com 5min antes do início da crise epilética. Todas as oscilações corticais estavam reduzidas nos 20s comparadas com 5min pós-ictais nos animais Pilo+MGE. 5) Animais Pilo+MGE apresentaram maior coerência córtico-hipocampal nas faixas delta e teta comparado com Pilo no período 5min pré-ictal, e maior coerência delta nos 20s pós-ictais comparado com animais Pilo. 6) Animais Pilo+MGE tiveram acoplamento delta/teta-gama lento/médio mais fraco nos 20s comparando com 5min antes da crise epilética e acoplamento delta-gama baixo mais forte nos 20s após o fim da crise comparando com animais Pilo. No geral, nossos dados sugerem um aumento de sincronia entre o córtex e CA1 do hipocampo em animais epiléticos, particularmente na frequência delta, com um forte acoplamento em Rad, sendo esse provavelmente um importante sítio de sincronização. A quantidade de GABA e atividade da GAD não foram alteradas, sugerindo uma possível mudança adaptativa da neurotransmissão de GABA mesmo com um número reduzido de interneurônios. As células precursoras da MGE transplantadas possivelmente induzem uma reorganização da rede neural do hospedeiro que pode ser responsável pela redução de crises e pelas alterações no padrão oscilatório. Particularmente, a diminuição da potência de delta, aumento da coerência córtico-hipocampal de delta e teta interictal e redução do acoplamento delta-oscilações de alta frequência (HFOs) na área hipocampal podem ser considerados evidências de reorganização sináptica, com conseqüente redução da epileptogênese. O aumento de potência e diminuição da coerência das HFOs no início da crise epilética são provavelmente relacionados com a integração e aumento da inibição induzida pelo transplante. Entender a organização dos ritmos cerebrais em períodos não ictais e o papel dos novos interneurônios na reorganização da rede pode nos ajudar a revelar os mecanismos por trás do controle das crises epiléticas recorrentes (CER), que claramente está além de um simples aumento da inibição.

Palavras-chave: Oscilações cerebrais; Rede Neural; Sistema GABAérgico; Células Precursoras da MGE; Análise Quantitativa de Eletroencefalograma-EEG; Epilepsia.

## ABSTRACT

Refractory epilepsies related to hippocampal sclerosis and animal models of epilepsy with abnormalities in the hippocampal formation are associated with synaptic reorganization and consequent altered pattern of neuronal connectivity and brain oscillations. Quantitative electroencephalogram analysis has been increasingly applied to study fine changes in brain oscillations in epilepsy. The majority of these studies have focused on brain synchrony either during or just before the seizure onset. However, neural connectivity is also notably altered during interictal and post-ictal states. In this work, we wanted to explore the changes in brain oscillations during interictal stages free of interictal epileptiform spikes (IES). These changes in brain oscillations in epilepsy are closely related to abnormalities of GABAergic neurons, including parvalbumin and somatostatin-expressing interneurons. Indeed, loss of these interneurons in the hippocampus has been found in epilepsy associated with the abnormal rewiring of the network, epileptogenesis and epileptiform activity. Since GABA release is shown to be dramatically reduced when spontaneous seizures begin to occur in hippocampal area in pilocarpine model of epilepsy, we analyzed the activity of glutamic acid decarboxylase (GAD) and quantified GABA and glutamate content by HPLC. As the GABAergic system is altered in many types of epilepsies, for many years cell replacement therapies have been developed in order to restore inhibition in different type of disease-based models, such as epilepsy, by grafting interneuronal precursor cells. We aimed to investigate how grafts of cells derived from the medial ganglionic eminence (MGE) affect the abnormal neuronal network, and consequently brain oscillations to modify seizure activity besides restoring inhibition. Therefore, first, we performed the quantitative analysis of the *in vivo* local field potential (LFP) from cortical layers IV to V (electrodes: Ctx1, Ctx2) and hippocampal CA1 areas (stratum oriens-Ors, pyramidale-Pyr, radiatum-Rad and lacunosum-moleculare-LM) in rats about 5 weeks after pilocarpine injection. Animals that received pilocarpine injection but did not develop status epilepticus (SE) are the non-SE (NSE) group. Animals that had SE and later spontaneous recurrent seizures (SRS) (epileptic animals) exhibited higher delta power recorded in cortical and hippocampal Ors, Rad and LM electrodes. They also had lower power of theta in cortical and hippocampal Ors and LM, lower slow gamma in Ctx1, Ctx2 and Ors, and lower middle and fast gamma power in Ors. NSE animals had higher delta and lower slow gamma power in Ctx1 only, and lower theta power in Ctx1, Ctx2 and LM. Essentially, epileptic animals had higher delta coherence between cortex and hippocampus such as, Ctx1-Ors, Ctx2-Ors, Ctx2-Pyr, Pyr-Ors and stronger phase-amplitude coupling (PAC) between delta and all frequencies in Rad. NSE animals also had higher delta coherence between Ctx1-Ors and Ctx2-Ors with no changes in PAC, suggesting some cortical network reorganization. Second, we analyzed the activity of GAD enzyme, and quantified GABA and glutamate by HPLC at the chronic period, since GABA outflow is dramatically changed in hippocampal area in the pilocarpine model of epilepsy. However, we could not find differences between all analyzed groups: controls, NSE and epileptic animals. Next, we analyzed the effect of MGE-derived cells grafted in the hippocampus of pilocarpine model of epilepsy. For that, we performed a quantitative analysis of the *in vivo* peri-ictal recordings from cortical and hippocampal areas of epileptic animals who had received (Pilo+MGE) or not (Pilo) intrahippocampal MGE-derived cells transplants. The analyses were done at the chronic period, three months after transplantation. The main findings are: 1) Grafted cells migrated and differentiated

in mature interneurons in the host brain parenchyma. 2) Pilo+MGE animals had reduced number of seizures. 3) Pilo+MGE animals had lower delta and theta power in the cortex and hippocampus than Pilo, at the 5min pre-ictal period, and in cortical area at the 5min post-ictal period. 4) Pilo+MGE animals in the cortical areas had increased fast gamma and ripples power and decreased delta-fast gamma and delta-ripples phase-amplitude coupling (PAC) at 20s when compared to 5 min before seizure onset. All cortical oscillations were reduced at 20s when compared to 5min post-ictal period of Pilo+MGE animals. 5) Pilo+MGE animals had more cortico-hippocampal coherence in delta and theta bands when compared to Pilo animals at the 5min pre-ictal period, and more delta coherence at 20s post-ictal period when compared to Pilo animals. 6) Pilo+MGE animals had weaker delta/theta–slow/middle gamma PAC at 20s compared with 5min before seizure onset and stronger delta-slow-gamma PAC at 20s compared with Pilo animals after seizure termination. Overall, our data suggest an increased synchrony in cortex and CA1 hippocampal area of epileptic animals, particularly for delta frequency with intense delta coupling in Rad, probably an important synchronization site. GABA release/ content and GAD activity was not changed, suggesting a possible adaptive change in GABA neurotransmission even with the decreased number of interneurons. The grafted MGE-derived cells possibly induced a neuronal network reorganization in the host brain that could be responsible for seizure reduction and alterations in brain oscillation pattern. Particularly, the decrease in delta power, increase in the interictal coherence in delta and theta band and the reduction in delta-high frequency oscillations (HFOs) coupling in the hippocampal area could be considered as indicators of network rewiring, with consequent reduction of epileptogenesis. The increased power and decreased coherence of HFOs at the seizure onset were probably induced by integration of new interneurons and increased inhibition induced by transplantation. Understanding the rhythms organization at non-ictal state and the role of the new interneurons on the reorganized network could help us to unveil the mechanisms behind seizure control that clearly go beyond a simple increase in inhibition.

**Keywords:** Brain Oscillations; GABAergic System, MGE Precursor Cells, Quantitative EEG Analysis; Epilepsy.



## LISTA DE ABREVIATURAS

- CA - corno de Amon
- CB - calbindina
- CCK - colecistocinina
- CE - córtex entorrinal
- CER - crises epilépticas espontâneas e recorrentes
- CFC - acoplamento de frequência cruzada (do inglês, *cross-frequency coupling*)
- CR - calretinina
- EEG - eletroencefalograma
- EGC - eminência gangliônica caudal
- EGM/MGE - eminência gangliônica medial (do inglês, *medial ganglionic eminence*)
- EH - esclerose hipocampal
- ELT - epilepsia do lobo temporal
- ELTm - epilepsia do lobo temporal mesial
- GABA - ácido gama-aminobutírico
- GAD - descarboxilase do ácido glutâmico
- GD - giro denteado
- HFOs - oscilações de alta frequência (do inglês *high frequency oscillations*).
- IES – pontas epileptiformes interictais (do inglês *interictal epileptiform spikes*)
- LFP - potenciais de campo locais (do inglês, *local field potential*).
- MI - índice de modulação (do inglês, *Modulation Index*)
- NPY - neuropeptídeo Y
- O-LM - oriens-lacunoso-molecular
- PAC - acoplamento fase-amplitude (PAC – do inglês *phase-amplitude coupling*)
- PTZ - pentilenotetrazol
- PV - parvalbumina
- SE - *status epilepticus*
- SOM - somatostatina
- VIP - peptídeo intestinal vasoativo

# SUMÁRIO

<b>PARTE I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>12</b>
INTRODUÇÃO .....	12
1 <i>EPILEPSIA</i> .....	12
1.1 Histórico.....	12
1.2 Conceitos de Epilepsia e Crises Epilépticas .....	14
1.3 Epidemiologia .....	16
1.4 Epilepsia do Lobo Temporal.....	17
2 <i>O SISTEMA GABAÉRGICO E SUAS IMPLICAÇÕES EM EPILEPSIAS</i> .....	23
2.1 O Sistema GABAérgico .....	23
2.2 Alterações GABAérgicas em Epilepsias .....	28
2.3 Origem dos Interneurônios GABAérgicos .....	29
2.4 Terapia Celular no Tratamento de Epilepsias.....	31
3 <i>MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIAS</i> .....	33
3.1 Modelo de Epilepsia Induzida por Pilocarpina .....	34
4 <i>OSCILAÇÕES CEREBRAIS</i> .....	36
4.1 Alterações Oscilatórias em Epilepsias.....	39
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE .....	41
OBJETIVOS.....	42
1 <i>OBJETIVOS GERAIS</i> .....	42
2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> .....	43
<b>PARTE II – METODOLOGIA E RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
CAPÍTULO I .....	45
<i>HIPPOCAMPAL CA1 AND CORTICAL INTERICTAL OSCILLATIONS IN THE     PILOCARPINE MODEL OF EPILEPSY</i> .....	45
1 <i>INTRODUCTION</i> .....	48
2 <i>RESULTS</i> .....	50
2.1 Spectral power.....	51
2.2 Spectral coherence.....	55
2.3 Cross-frequency coupling .....	58
3 <i>DISCUSSION</i> .....	60
4 <i>CONCLUSIONS</i> .....	64
5 <i>EXPERIMENTAL PROCEDURE</i> .....	64
5.1 Animals.....	64
5.2 Status epilepticus induction .....	65
5.3 Surgery .....	66
5.4 Local field potential recordings .....	66
5.5 Histology .....	67
5.6 Data Analysis.....	67
5.7 Spectral Analysis .....	68
5.8 Phase-amplitude coupling and comodulation maps.....	68
5.9 Statistics .....	69
<i>RESULTADOS COMPLEMENTARES</i> .....	70
1 <i>ATIVIDADE DA ENZIMA DESCARBOXILASE DO ÁCIDO GLUTÂMICO (GAD)</i> .....	70
CAPÍTULO II .....	73
<i>PERI-ICTAL OSCILLATIONS AND SEIZURE FREQUENCY MODIFIED BY GABAERGIC     PRECURSOR CELLS GRAFTED INTO THE PILOCARPINE MODEL OF EPILEPSY</i> .....	73
1 <i>INTRODUCTION</i> .....	74
2 <i>METHODS</i> .....	76
2.1 Animals.....	76
2.2 Status Epilepticus induction .....	76
2.3 Cell dissociation and transplantation .....	76
2.4 Electrodes implantation .....	77
2.5 Video EEG recording .....	78
2.6 Quantitative EEG Analysis.....	78
2.7 Detection of GFP-expressing inhibitory interneurons.....	79
2.8 Statistical Analysis .....	80
3 <i>RESULTS</i> .....	80
3.1 Identification of MGE-derived cells in the host brain .....	80

3.2 Seizure frequency .....	81
3.3 Pre-ictal EEG .....	83
3.4 Post-ictal EEG .....	92
<b>4 DISCUSSION</b> .....	<b>100</b>
<b>5 CONCLUSIONS</b> .....	<b>105</b>
<b>PARTE III – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b> .....	<b>106</b>
DISCUSSÃO .....	106
1 ANÁLISE DA POTÊNCIA ESPECTRAL .....	106
2 ANÁLISE DA COERÊNCIA DE FASE .....	111
3 ANÁLISE DO ACOPLAMENTO FASE-AMPLITUDE .....	112
CONCLUSÕES .....	114
FINANCIAMENTO .....	115
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>115</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>127</b>

## PARTE I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### INTRODUÇÃO

#### 1 EPILEPSIA

##### 1.1 Histórico

A primeira descrição de uma crise epiléptica é encontrada em documentos da Mesopotâmia, cerca de 2500 a.c. O texto descreve pacientes com perda de consciência, torção do pescoço, tensão dos membros, “olhos arregalados e espuma saindo pela boca”. A condição é chamada de “a mão do pecado” (*anta’subbu*, em acádio) (LABAT, 1952). Já o relato mais antigo encontrado sobre epilepsia aparece no famoso Código de Hamurabi, onde aparece relatada como “o trabalho de demônios e fantasmas”. Interessantemente, anotações meticulosas das manifestações, incluindo a frequência de crises epiléticas, são minuciosamente documentadas e relacionadas com a possessão de diferentes demônios (REYNOLDS, 1990). Diversos outros textos do Egito antigo, China, Índia e Babilônia descrevem os diversos tipos de crises epiléticas e epilepsias, com relatos detalhados das manifestações (PANTELIADIS et al., 2017).

Corroborando com o misticismo e religiosidade relacionados às manifestações, a própria palavra epilepsia quer dizer “tomar, capturar, possuir” (do grego: ἐπίληψις – *epilēpsis*). O conceito de epilepsia só foi alterado de místico para científico com Hipócrates (460-390 a.c.). O livro *Hippocratic Corpus*, com 60 capítulos, contém um ensaio intitulado “A Doença Sagrada”, onde pela primeira vez a palavra epilepsia é usada. Hipócrates foi o primeiro a considerar epilepsia como “uma doença do cérebro”, descrevendo detalhadamente sua etiologia, sintomas e prognósticos (MAGIORKINIS; SIDIROPOULOU; DIAMANTIS, 2010).

Apesar da contribuição de Hipócrates, a natureza sobrenatural da epilepsia ainda se mostrou dominante por séculos. Grandes avanços começaram a ser feitos na metade do século XIX, especialmente com as publicações de John Hughlings-Jackson (1835–1911), que definiu as crises epiléticas como descargas desordenadas, súbitas e excessivas do tecido nervoso (PANTELIADIS et al., 2017). Embora estudos eletrofisiológicos tenham sido conduzidos anteriormente em animais, foi somente em 1924 que o alemão Hans Berger demonstrou pela primeira vez oscilações cerebrais em humanos, com o advento do eletroencefalograma (EEG). Após 5 anos de experimentos, ele concluiu que a atividade elétrica mais proeminente era registrada na região occipital, quando o paciente estava calmo e com os olhos fechados. Berger chamou este ritmo de alfa. Já o ritmo mais rápido, visto quando os olhos estavam abertos, o segundo a ser visto, foi chamado de beta. Seguindo a tradição iniciada por Berger, as oscilações descobertas posteriormente foram nomeadas com letras gregas, teta e gama (BUZSÁKI, 2006). Em 1932, Berger descreveu os primeiros padrões de alterações do EEG em epilepsia (MILLETT, 2001).

Mesmo com muitos avanços mostrando as causas fisiológicas da epilepsia, pessoas epiléticas continuam sofrendo com seus estigmas. Até a década de 50, pessoas com epilepsia eram proibidas de casar em 17 estados americanos; no Reino Unido, a lei proibindo epiléticos de se casarem foi banida apenas em 1970 (FALLING, 2003). Até os dias atuais, pessoas com epilepsia sofrem de problemas psicológicos, especialmente relacionados a seus relacionamentos e empregos. Melhorar a qualidade de vida dessas pessoas ao redor do mundo e quebrar estigmas relacionados à epilepsia requer esforços para educar a mídia e a população em geral. É preciso a disseminação de conhecimentos sobre epilepsia e transtornos mentais a

ela associados, diminuindo preconceitos e aumentando o interesse pela busca de tratamentos (FALLING, 2003).

## **1.2 Conceitos de Epilepsia e Crises Epilépticas**

Entender a história das crises epilépticas e epilepsia é importante, mas é fundamental que os conceitos de ambas sejam bem compreendidos.

Uma crise epiléptica é definida como a alteração comportamental transitória em decorrência da atividade neuronal anormal, excessiva e/ou hiperssincrônica dos neurônios do cérebro (FISHER et al., 2018) causando uma ruptura na função normal da rede neural. Para fins de diagnóstico e tratamento, as crises epilépticas são classificadas em diversos tipos, divididos em três grandes grupos, de acordo com seu início: focal, generalizado ou desconhecido (FISHER et al., 2018) (Figura 1). O início da crise epiléptica é dito focal quando a atividade anormal inicia em uma região localizada, originada em circuitos limitados a um hemisfério, ou generalizada, originadas em algum local de uma rede neuronal com rápido envolvimento de redes distribuídas bilateralmente (FISHER et al., 2018). Referimos como ictal o período em que a crise epiléptica acontece, pré-ictal o momento imediatamente anterior à crise, pós-ictal o momento posterior e interictal o período compreendido entre crises epilépticas (YACUBIAN; KOCHEN, 2014).

Epilepsia é definida como um distúrbio do cérebro caracterizado pela predisposição persistente em gerar crises epilépticas, e pelas suas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais. A definição atual requer a ocorrência de pelo menos duas crises epilépticas espontâneas, não provocadas (ou reflexas) num intervalo maior que 24h; uma crise epiléptica não provocada (ou reflexa) e a probabilidade em torno de 60% de apresentar recorrência; ou o diagnóstico de

síndrome epiléptica (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018). Tal aumento de probabilidade pode ser evidenciado, por exemplo, pela presença de atividade epileptiforme registrada em EEG e indícios de anormalidades detectadas em exames de imagem (FISHER; BONNER, 2018).

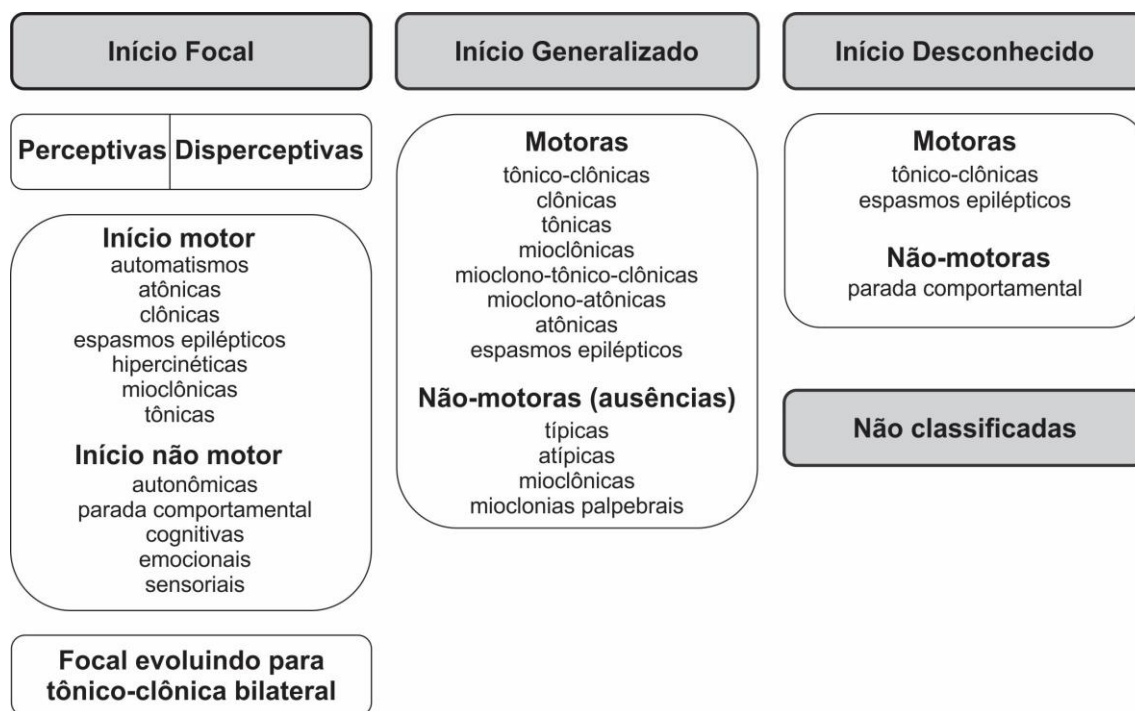


Figura 1 Classificação dos tipos de crises epiléticas. Adaptado de FISHER et al., 2018.

Segundo a mais recente definição, as epilepsias são divididas em quatro grandes grupos: focais, generalizadas, focais e generalizadas combinadas e desconhecidas. O terceiro nível de diagnóstico refere-se à classificação em uma Síndrome Epiléptica, sendo essa um conjunto de características incluindo tipos de crises, EEG e características de imagem, que tendem a ocorrer juntas (SCHEFFER et al., 2017). As causas de epilepsias são muitas e representam o último grau de classificação, sendo divididas em grandes grupos: causas estruturais, genéticas, infecciosas, metabólicas, imunes ou desconhecidas (SHORVON, 2011). Um esquema da classificação resumida pode ser visualizado na Figura 2.

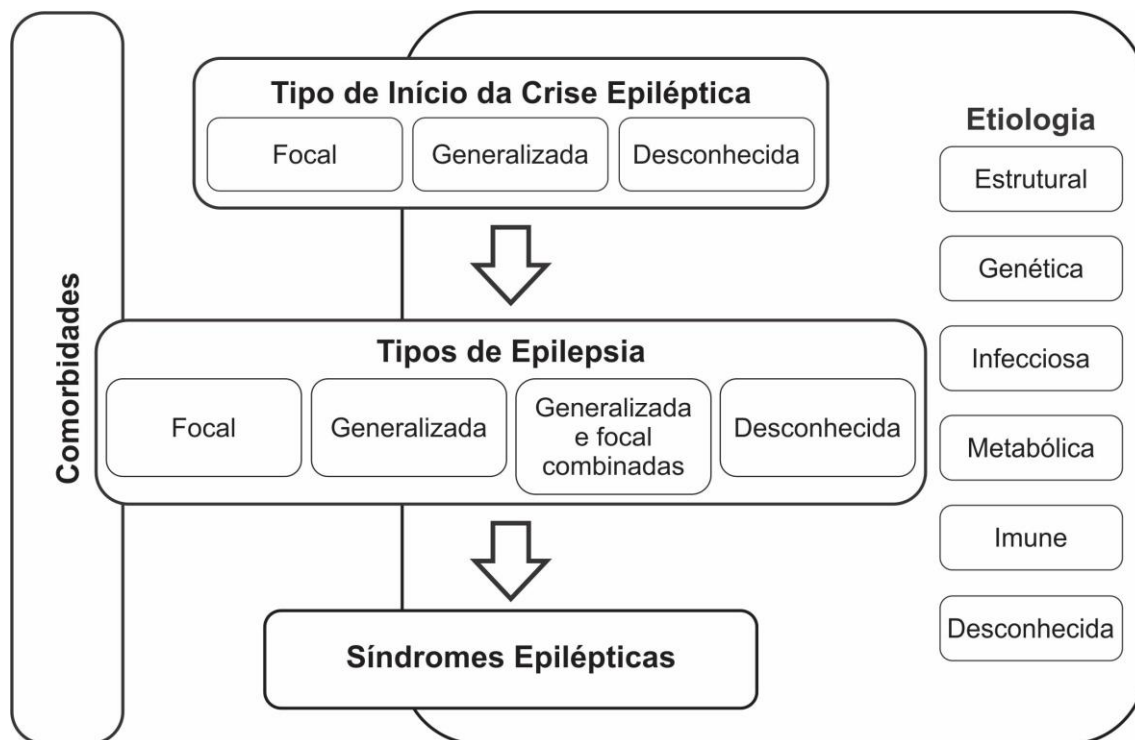


Figura 2 Esquema diagnóstico dos tipos de epilepsias. Adaptado de (SCHEFFER et al., 2017).

### 1.3 Epidemiologia

Epilepsia é uma das desordens neurológicas crônicas mais comuns, afetando cerca de 70 milhões de pessoas de todas idades, locais, condições sociais e raças. Globalmente, estima-se que 2,4 milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia a cada ano. A prevalência em países desenvolvidos é em torno de 4-10/1000 habitantes, enquanto em países em desenvolvimento é entre 14-57/1000 habitantes. Já a incidência em países desenvolvidos é 45/100.000/ano e 81,7/100.000/ano em países em desenvolvimento. (ESPINOSA-JOVEL et al., 2018; SANDER, 2003). Tais diferenças são em decorrência de maiores fatores de risco em países mais pobres, como maior incidência de trauma crânio encefálico, intercorrências no pré e pós-natal, erros inatos do metabolismo e especialmente infecções. Epilepsia resultante de infecções é a maior causa de mortalidade em países em desenvolvimento e a causa mais prevalente de epilepsia no mundo (SINGH; TREVICK, 2016). As epilepsias de



início focal representam cerca de 60% do total de casos, e a epilepsia do lobo temporal (ELT) com esclerose hipocampal (ELT mesial - ELTm) é dentre estas a mais comum refratária aos tratamentos clássicos (TÉLLEZ-ZENTENO; HERNÁNDEZ-ROQUILLO, 2012).

## **1.4 Epilepsia do Lobo Temporal**

Uma vez que o hipocampo desempenha função central e tem relação direta com a fisiopatologia da ELT, é necessário primeiro o entendimento da formação hipocampal.

### 1.4.1 A formação hipocampal

Em humanos, o hipocampo é uma estrutura alongada e profundamente inserida no lobo temporal. Em roedores, o hipocampo é uma estrutura relativamente grande, em um formato que lembra uma castanha ou banana localizada logo abaixo do neocórtex. Uma secção transversal revela suas principais regiões anatômicas, divididas em giro denteado (GD), cornos de Amon (CA), córtex entorrinal (CE) e subículo. A região CA subdivide-se em CA1 e CA3, com uma zona de transição chamada de CA2 (KANDEL, 2013).

As células de CA1 se organizam em 5 diferentes camadas. As células piramidais têm seu soma alinhado numa fina camada denominada camada piramidal (ou *stratum pyramidale*). Do corpo celular emergem três troncos dendríticos, um apical e dois basais. Os dendritos apicais se estendem para a camada radiada (*stratum radiatum*) e se arborizam na camada lacunosa-molecular (*stratum lacunosum moleculare*). Os dendritos basais, por sua vez, se arborizam na camada oriens (*stratum oriens*). Os axônios das células piramidais se projetam para a camada

alveolar (*stratum alveus*), onde emitem diversas colaterais antes de deixarem o hipocampo (HAMMOND, 2015).

A atividade das células piramidais de CA1 é modulada por aferências glutamatérgicas vindas de CA3, CE e também do septo hipocampal (MÜLLER; REMY, 2018; SPRUSTON, 2008), mas também por interneurônios locais. Estes possuem seus corpos celulares em todas as 5 camadas do CA e são classificados de acordo com local de conexão com a célula piramidal, padrão de disparo, conteúdo neuroquímico e origem. Podem ser divididos em células em cesto, bi-estratificadas, oriens-lacunosomolecular (O-LM) e axo-axônicas. Mais detalhes do sistema GABAérgico serão apresentados na seção 2.

O GD é dividido em três camadas: molecular, granular e hilo. A camada granular é constituída predominantemente por células granulares ou principais. Os dendritos destas células se ramificam para a camada molecular e para a zona polimórfica do hilo. Os axônios das células granulares são as chamadas fibras musgosas e se projetam para CA3 e para o hilo, onde diversas colaterais fazem contato com interneurônios locais, dos mesmos tipos vistos em CA (SCHULTZ; ENGELHARDT, 2014).

O subículo é considerado uma zona de transição dividido em para-subículo, pré-subículo e subículo propriamente dito. Possui uma camada molecular por onde se estendem os dendritos apicais das células piramidais do subículo, que pode ser dividida em externa e interna. Dele partem as maiores projeções subcorticais para o complexo septal, núcleo accumbens, tálamo e CE (SCHULTZ; ENGELHARDT, 2014).

O CE é a principal via de entrada de informações no hipocampo, através das projeções dos axônios da camada II (via perforante) fazendo sinapse nas células granulares do GD (sinapse 1). Os axônios destas células granulares, chamados de

fibras musgosas, por sua vez, fazem sinapse nos dendritos apicais das células piramidais de CA3 (sinapse 2). Além disso, axônios das células granulares do GD fazem sinapses recorrentes entre seus neurônios. Os axônios das células piramidais de CA3, colaterais de Schaffer, formam sinapses com os dendritos apicais das células piramidais de CA1 no *stratum radiatum* (sinapse 3). Os neurônios piramidais da região de CA1 então projetam seus axônios de volta para o CE na camada V/VI, passando pelo Subículo, completando o ciclo da via trissináptica. Paralelamente, axônios da camada III do CE projetam-se diretamente a CA1, formando a chamada via tempoamônica. Adicionalmente, axônios de CA3 fazem sinapses recorrentes entre seus neurônios (KNIERIM, 2015). Um esquema das principais vias de entrada e saída de informação do hipocampo pode ser visualizado na Figura 3.

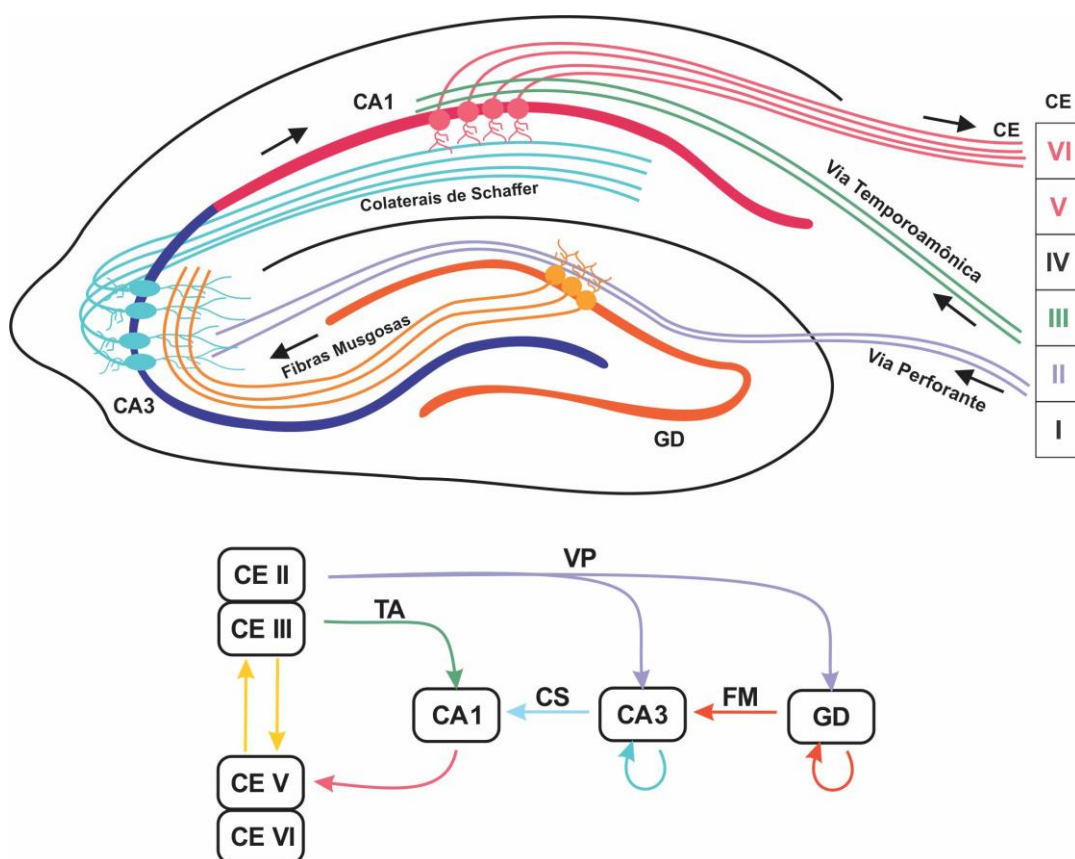


Figura 3 Esquema das principais vias de entrada e saída de informação do hipocampo. CE: córtex entorrinal; GD: giro denteado; CS: colateral de Schaffer; FM: fibras musgosas; VP: via perforante; TA: via tempoamônica. Adaptado de (CHENG, 2013; DENG; AIMONE; GAGE, 2010).

### 1.4.2 Esclerose hipocampal

O conhecimento sobre as alterações hipocampais na ELT tem avançado muito nas últimas décadas, de modo que muitos detalhes sobre alterações moleculares e celulares já são conhecidos, mas eles giram em torno de dois principais processos observados na esclerose hipocampal (EH). Primeiro, a reorganização da circuitaria do giro denteado, com perda de células granulares, com afinamento da camada granular do GD e muitas vezes dispersão das células remanescentes para a camada molecular. Os dendritos das células sobreviventes ficam menos espalhados no eixo longitudinal, com aumento da penetração na camada molecular e aumento na densidade de espinhos dendríticos (SLOVITER et al., 2012). O aumento de sinapses recorrentes acontece em todo o hipocampo, mas o mais evidente ocorre com o chamado brotamento das fibras musgosas, o massivo crescimento dos axônios das células granulares. Essas fibras recorrentes fazem então sinapses com os contatos das porções proximais e distais dos dendritos das próprias células granulares, aumentando a excitabilidade. Se o brotamento das fibras musgosas é causa ou consequência das crises epilépticas é um intenso debate, bem como se somente a perda das células granulares é suficiente para desencadear o fenômeno. Outra importante alteração é a perda e reorganização de interneurônios, especialmente na região do hilo, os quais são majoritariamente GABAérgico, e resultam, portanto, na diminuição da inibição hipocampal (BUCKMASTER, 2012). As alterações do sistema GABAérgico serão discutidas na seção 2. Outra teoria para explicar o aumento da excitabilidade na ELTm é a chamada hipótese das células em cesto dormentes. Segundo esta, a morte de neurônios da área de CA3, que habitualmente excitaria as células em cesto na área de CA1, resultaria num estado dormente destes importantes interneurônios inibitórios. Desse modo, ocorreria uma redução da inibição de todo o

sistema, mas o sistema inibitório estaria “intacto”, porém inativo pela falta de estímulo vinda da área de CA3 (KAPUR, 2003; SLOVITER, 1991).

Em segundo lugar ocorre a proliferação e ativação glial, sendo a proliferação dos astrócitos a característica histopatológica mais reconhecida. Esses astrócitos apresentam alterações como aumento de receptores glutamatérgicos, com aumento de liberação do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e a ocorrência de ondas de  $\text{Ca}^{+2}$ . Ocorre ainda alteração de canais que removem o  $\text{K}^{+}$  extracelular, os chamados Kir, o que favorece a criação de um ambiente extracelular com excesso de glutamato e  $\text{K}^{+}$ , favorecendo a hiperexcitabilidade de toda a formação hipocampal e a generalização das crises (DE LANEROLLE; LEE; SPENCER, 2012).

Tais alterações levam a uma redução significativa no volume hipocampal, e as modificações na laminação da circuitaria são visíveis em estudos histológicos. Outras lesões podem estar presentes fora do hipocampo, como isquemia, hemiatrofia, tumores, malformações vasculares e/ou corticais e afinamento neocortical (MALMGREN; THOM, 2012).

A EH é utilizada como modo de classificação da lesão hipocampal em ELTm como veremos a seguir.

#### 1.4.3 Classificação da Epilepsia do Lobo Temporal

Os pacientes com ELTm frequentemente possuem histórico de algum insulto inicial, como crises febris, trauma crânio encefálico ou infecções nos primeiros anos de vida, sugerindo que insultos durante o desenvolvimento podem ter relação com a epileptogênese; comumente há algum histórico familiar, indicando uma possível predisposição genética (BAULAC, 2015). Crises epiléticas espontâneas geralmente começam na infância, normalmente crises epiléticas tônico-clônicas de início focal,

e são responsivas a tratamento farmacológico. Na forma intratável, por outro lado, quando as crises são refratárias aos fármacos antiepilépticos, geralmente na adolescência ou em jovens adultos, torna-se difícil ou impossível o controle por medicamentos (ENGEL, 2001). Embora alguns casos sejam associados a tumores ou malformações hipocampais, a lesão mais comum é a esclerose hipocampal (MALMGREN; THOM, 2012).

Como mencionado, a esclerose hipocampal (EH) é utilizada como modo de classificação da lesão hipocampal em ELTm, separando quatro diferentes grupos, baseado em padrão quanto a perda celular hipocampal em amostras cirúrgicas extraídas de pacientes. EH tipo 1 é a mais comum, correspondendo a 60-80% dos casos, e afeta diversas áreas hipocampais. A área de CA1 é a mais fortemente afetada, com perda de cerca de 80% das células, mas ocorre grande morte celular dos neurônios piramidais de CA2 (30-50%), CA3 (30-90%), CA4 (40-90%) e também das células granulares do GD (50-60%). Na EH do tipo 2 a morte celular ocorre predominantemente na região de CA1, e na EH do tipo 3 a morte ocorre principalmente na região de CA4/DG. O quarto caso é chamado de não-EH, ocorre quando não há morte neuronal significativa, apenas gliose, o que evidencia o importante papel da glia na fisiopatologia (BLÜMCKE et al., 2013).

Embora a esclerose hipocampal seja a principal característica da ELTm, as anormalidades em pacientes muitas vezes se estendem para além do hipocampo. Frequentemente, por exemplo, ELT é associada a displasia cortical focal, sendo então classificada como FCD tipo IIIa (do inglês *focal cortical dysplasia*). A existência de uma relação de causa e efeito entre a associação das duas alterações é foco de grande debate, mas ainda não há evidências de que a EH é, por exemplo, decorrência do aumento da hiperexcitabilidade cortical vista nestes casos (BLÜMCKE et al., 2013;

MALMGREN; THOM, 2012). A esclerose temporal mesial, que define a ELTm, é definida como a EH mais alterações em outras estruturas da parte mesial do lobo temporal, como amígdala e regiões para-hipocampais. A patologia mais frequente vista na ELTm é a clássica e total esclerose de CA, sendo o achado mais reconhecido em ELT resistentes a tratamento farmacológico (BLÜMCKE et al., 2007).

Diversos processos decorrentes da perda neuronal e gliose na ELTm estão envolvidos na geração e manutenção das crises epiléticas, mas é inegável que o sistema GABAérgico, a principal força inibitória no sistema nervoso central, tem fundamental importância nesse processo (GUAZZI; STRIANO, 2019; TREIMAN, 2001).

## **2 O SISTEMA GABAÉRGICO E SUAS IMPLICAÇÕES EM EPILEPSIAS**

### **2.1 O Sistema GABAérgico**

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) (KANDEL, 2013). Ele é formado dentro dos terminais axônicos a partir do glutamato numa reação catalisada pela descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). O GABA é então liberado nas sinapses e atua em dois tipos de receptores: ionotrópico, permeável a cloreto, GABA<sub>A</sub> (e GABA<sub>c</sub> na retina); e metabotrópico (acoplado à proteína G que possui 7 domínios transmembrana), GABA<sub>B</sub>, que ativa uma cascata de segundos mensageiros que frequentemente induz a fosforilação de modo indireto de canais de potássio (KANDEL, 2013).

Existem 19 diferentes genes responsáveis por codificar as subunidades do receptor GABA<sub>A</sub>. Um receptor funcional é formado por uma combinação de 5 destas subunidades ao redor de um eixo, formando um canal iônico. A maioria dos receptores resulta de uma combinação de pelo menos 2 ou 3 tipos de subunidades. O mais

comum é formado por  $2\alpha 1$ ,  $2\beta 2$  e  $1\gamma 2$ , por exemplo. Estudos em células piramidais revelam que cerca de 60% dos receptores GABA<sub>A</sub> são extra-sinápticos com uma expressão relativa de 33–48%  $\alpha 1$ -, 40%  $\alpha 2$  e 36%  $\beta 3$  para cada subunidade. (KNOFLACH; HERNANDEZ; BERTRAND, 2016). As propriedades fisiológicas e farmacológicas dependem da combinação destas subunidades. Por exemplo, a presença da subunidade  $\gamma 2$  é o que confere ao receptor sensibilidade à benzodiazepínicos. Mais especificamente, subunidades  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  são relacionadas a mediação de efeitos de ansiedade pelo diazepam, um importante benzodiazepínico, enquanto a presença da subunidade  $\alpha 1$  tem relação com os efeitos sedativos causados pelo fármaco (RUDOLPH; KNOFLACH, 2011).

É importante salientar que os interneurônios que liberam GABA (GABAérgicos) desempenham um papel central na regulação da atividade neural através dos seus efeitos inibitórios em neurônios excitatórios e inibitórios. A nível celular, a inibição GABAérgica é importante na regulação de circuitos locais (como codificação de informação e plasticidade sináptica) e na sincronização das oscilações da rede neural (MANN; PAULSEN, 2007).

Os interneurônios são classificados de acordo com suas propriedades morfológicas, moleculares e eletrofisiológicas. Quanto à morfologia, são levados em conta a forma dos principais componentes estruturais e os tipos de conexões com a rede, de acordo com a localização do contato sináptico (dendrítica distal, exercendo ou proximal ou somática). Quanto às características moleculares, os interneurônios são classificados especialmente de acordo com a expressão de proteínas ligantes de  $Ca^{+2}$ , e neuropeptídeos como por exemplo os interneurônios que expressam PV (parvalbumina), SOM (somatostatina), VIP (peptídeo intestinal vasoativo) CR (calretinina), CB (calbindina) e NPY (neuropeptídeo Y). Quanto às características



eletrofisiológicas, estas células são classificadas de acordo com as características ativas, passivas da membrana celular e a forma de propagação (Figura 4) (HUANG; PAUL, 2019; PETILLA et al., 2008). Entre os interneurônios que expressam PV destacam-se as células candelabro e as células em cesto (do inglês *basket cells*, ambas de disparo rápido e particularmente relevantes no circuito hipocampal (JIANG; LACHANCE; ROSSIGNOL, 2016).

A localização do contato pós-sináptico é envolvida na regulação e modulação das atividades de rede pelos interneurônios GABAérgicos. Em CA1, por exemplo, interneurônios NPY e SOM fazem sinapse preferencialmente nos dendritos apicais, modulando as sinapses excitatórias. Interneurônios que expressam PV, como as células em cesto, por outro lado, podem modular o sistema através de sinapses nos dendritos, mas preferencialmente podem regular os padrões de disparo das células alvo, através de sinapses em compartimentos somáticos (CALCAGNOTTO, 2016; KLAUSBERGER; SOMOGYI, 2008). Um esquema reduzido da localização dos contatos sinápticos de alguns interneurônios em CA1 pode ser visto na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

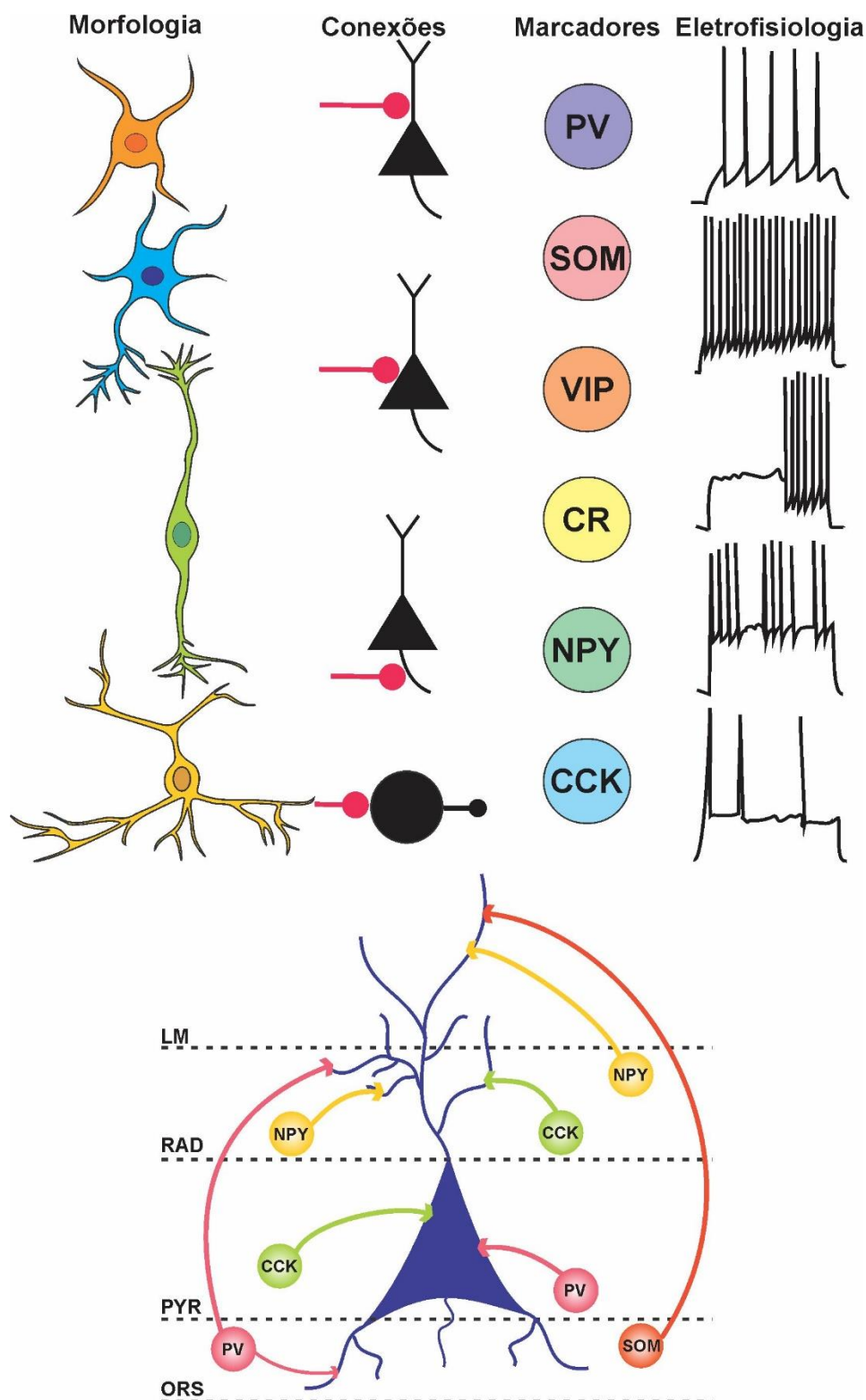


Figura 4 Classificação dos interneurônios e exemplo de conexões dos interneurônios com as células piramidais de CA1. PV – parvalbumina; SOM – somatostatina; NPY – neuropeptídeo Y; VIP – peptídeo intestinal vasoativo; CR – calretinina; CCK – colecistocinina; LM: camada lacunosa-molecular; RAD: camada radiada; PYR: camada piramidal; ORS: camada oriens. Adaptado de (KEPECS; FISHELL, 2014; LEDRI et al., 2014).

No hipocampo, a população de interneurônios representa entre 10-15% do total de células, tendo os corpos celulares localizados em diferentes camadas e suas arborizações dendríticas e axônios percorrendo longas distâncias. Mais do que terem importante papel na regulação da excitabilidade, os interneurônios também regulam a janela de tempo das sinapses excitatórias, regulando a iniciação do potencial de ação (PELKEY et al., 2017). Além disso, eles são fundamentais na sincronização de circuitos locais e corticais, facilitando a atividade oscilatória. No córtex, os interneurônios correspondem a 20 a 30% das células, e participam de funções regulatórias de migração, proliferação celular e desenvolvimento de circuitos corticais (WONDERS; ANDERSON, 2005). Considerando que os diferentes subtipos de interneurônios disparam em diferentes padrões quando relacionados às fases das oscilações, cada subtipo tem provavelmente um diferente papel gerando ou modulando diferentes ritmos cerebrais (WULFF et al., 2009). Células em cesto que expressam PV, por exemplo, disparam preferencialmente na fase descendente do ciclo das oscilações teta no hipocampo (LAPRAY DAMIEN et al., 2012) e o padrão de disparo de interneurônios SOM é fortemente acoplado a oscilações gama no prosencéfalo basal (ESPINOSA et al., 2019).

Diversas pesquisas *in vitro* e *in vivo* indicam que o processamento complexo de informação no hipocampo e neocórtex criticamente depende da atividade dos interneurônios GABAérgicos (BARTOS; VIDA; JONAS, 2007; HU; GAN; JONAS, 2014). Quando pensamos no controle fino da atividade oscilatória, os interneurônios PV e SOM desempenham especial papel na regulação da rede (KUKI et al., 2015). Uma vez que interneurônios de disparo rápido, como as células em cesto, também representam um alto gasto de energia, estas células são cruciais para a manutenção ou o declínio de funções cognitivas quando ocorre um estresse metabólico e, portanto,

podem estar relacionadas com o envelhecimento do cérebro e diferentes patologias como isquemia, epilepsia, esquizofrenia e doença de Alzheimer (KANN, 2016).

## 2.2 Alterações GABAérgicas em Epilepsias

Evidências clínicas e experimentais indicam que o sistema GABAérgico tem um importante papel nos mecanismos e tratamentos das epilepsias. Bloqueio da inibição em animais saudáveis resulta em descargas epiléticas, e bloqueadores dos receptores GABA como picrotoxina, pentilenotetrazol (PTZ) e bicuculina são usados como modelos de crises epiléticas e epilepsia (CYMERBLIT-SABBA; SCHILLER, 2010; PAIVA et al., 2017; PASQUETTI et al., 2014). Além disso, fármacos que aumentam a inibição mediada por GABA são amplamente utilizados com o intuito de reduzir as crises epiléticas, como benzodiazepínicos (KHAZIPOV, 2016).

O envolvimento do sistema GABAérgico nas crises epiléticas tem sido evidenciado por pesquisas que mostram que a taxa de disparo de interneurônios que expressam PV na camada piramidal de CA1 diminui antes do início das crises epiléticas, indicando que essas células podem ter um padrão de disparo diferente nesta camada relacionado com as alterações vistas na ELTm (LOPEZ-PIGOZZI et al., 2016; TOYODA et al., 2015). Nos últimos anos, com o advento da optogenética, tem se tornado mais factível a manipulação de neurônios e o entendimento do seu papel em cada fase das crises epiléticas. Estudos mostram que a despolarização de interneurônios por optogenética inicia crises epiléticas *in vivo* e *in vitro* na presença de 4-aminopiridina (4-AP), um bloqueador de canais de potássio (GONZÁLEZ et al., 2018). Estimulação de interneurônios que expressam PV ou SOM pode desencadear atividades epileptiformes *in vitro*, e diversas hipóteses para explicar esta relação têm sido formuladas. Por exemplo, a atividade epileptiforme pode ser gerada por um efeito

rebote de sincronização desencadeado pelo aumento de ativação dos interneurônios; pela geração de um gradiente positivo de potássio extracelular, suficiente para desencadear crises epiléticas; por alterações no potencial do equilíbrio do GABA ( $E_{GABA}$ ) desencadeadas pela entrada massiva de cloreto em células piramidais, enfraquecendo a inibição sobre as células principais; ou ainda pela depleção de vesículas GABAérgicas (MAGLOIRE et al., 2018). Por outro lado, a ativação específica de interneurônios desencadeia a atividade epileptiforme induzida por 4-AP e também por meio com zero magnésio, e a ativação específica de interneurônios que expressam PV suprimiu a ocorrência de crises epiléticas em modelo de epilepsia do lobo temporal em roedores (YE; KASZUBA, 2017).

Embora a relação e a importância do sistema GABAérgico na epileptogênese seja evidente, os mecanismos e o real papel dessas alterações na geração, manutenção e generalização das crises epiléticas ainda não são claros.

### **2.3 Origem dos Interneurônios GABAérgicos**

Durante a embriogênese, precursores neurais oriundos da eminência gangliônica, uma estrutura transitória localizada no *subpalium* ventral do telencéfalo, migram de maneira tangencial para o neocórtex, hipocampo e bulbo olfatório. São estes precursores que darão origem a grande maioria dos interneurônios GABAérgicos (ANDERSON; BARABAN, 2012). A correta diferenciação e migração desses precursores é dependente de uma complexa rede de fatores de transcrição e de sinalização molecular, ao que se destaca os papéis dos genes homeobox, os quais possuem o papel na migração neuronal durante a formação de estruturas na embriogênese, especialmente o Dlx (do inglês *distal-less homeobox*) e NFK2-1 (NK2 homeobox 1) (PLA et al., 2018; SANDBERG et al., 2016).

Cerca de 90% dos interneurônios GABAérgicos são derivados da eminência gangliônica medial (EGM) e da eminência gangliônica caudal (EGC) e formados entre o dia embrionário 9 e o nascimento em roedores (WONDERS; ANDERSON, 2005). A EGM produz aproximadamente 60% dos interneurônios do neocórtex e hipocampo, especialmente dos tipos PV e SOM, já a EGC produz cerca de 30%, incluindo os colecistocinina (CCK), calretinina (CR) e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (PELKEY et al., 2017). A área pré-óptica (APO) é a origem de uma pequena população de interneurônios GABAérgicos multipolares com disparos rápidos e adaptáveis expressando NPY e/ou *reelin* (GELMAN; MARÍN, 2010). Um esquema dos interneurônios derivados de cada uma das eminências gangliônicas pode ser visualizado na Figura 5.

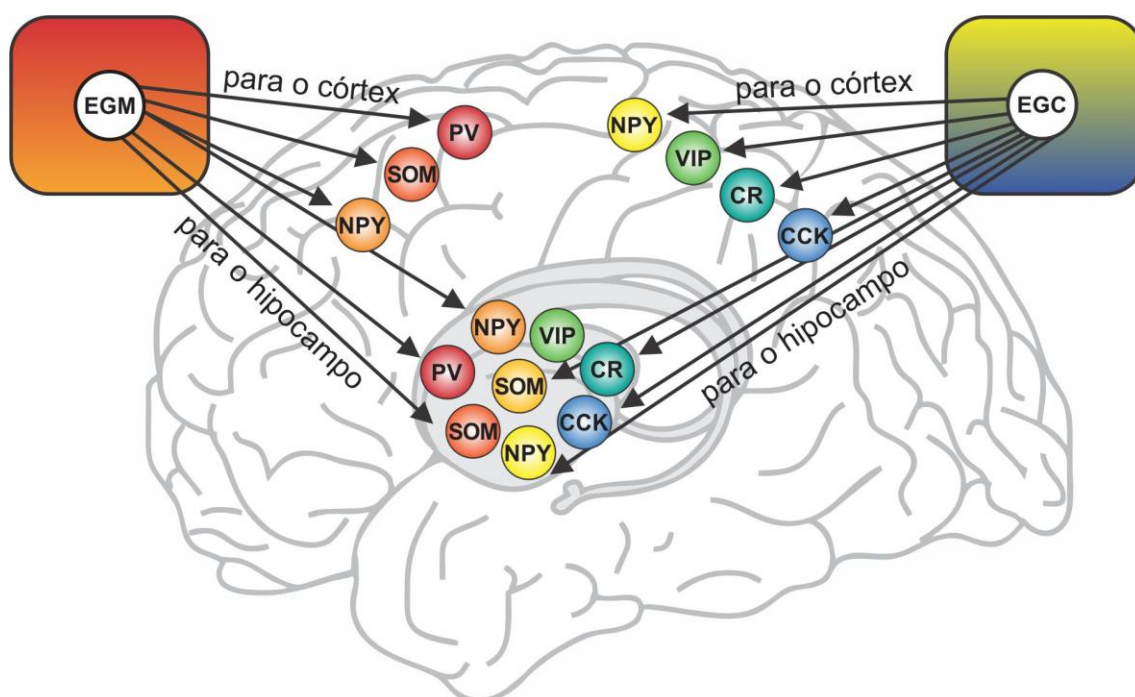


Figura 5 Esquema resumido dos interneurônios derivados das eminências gangliônicas medial (EGM) e caudal (EGC) e seu local de migração. PV – parvalbumina; SOM – somatostatina; NPY – neuropeptídeo Y; VIP – peptídeo intestinal vasoativo; CR – calretinina; CCK – colecistocinina. Adaptado de Pelkey et al.(2017).

Alterações nos fatores de transcrição relacionados à migração destas células estão relacionadas a doenças neuropsiquiátricas e epilepsias (DI CRISTO, 2007; KALEMAKI et al., 2018; PLA et al., 2018; SANDBERG et al., 2016). Por exemplo, a inativação do fator de transcrição Dlx1 em modelo experimental de camundongos resulta na perda de interneurônios que expressam SOM, NPY e calretinina, com redução da inibição e aparecimento de crises epiléticas (COBOS et al., 2005). Em modelo experimental de esquizofrenia, são vistas alteração de migração tangencial de interneurônios que expressam PV, por exemplo, que se distribuem anormalmente no córtex (LEE et al., 2013). Tais evidências apontam para a importância na migração e regulação dos interneurônios GABAérgicos na rede neural, despertando o interesse para sua utilização de maneira terapêutica em casos de epilepsia.

#### **2.4 Terapia Celular no Tratamento de Epilepsias**

O sistema GABAérgico é um dos principais alvos das terapias farmacológicas atualmente disponíveis para epilepsias. Há vários anos, terapias celulares que buscam restaurar a inibição em diferentes modelos animais vêm sendo desenvolvidas. (HSIEH; BARABAN, 2017; ZHU; NAEGELE; CHUNG, 2018). Precusores neurais derivados da EGM transplantados no cérebro de hospedeiro são capazes de se dispersar a longas distâncias através do neocórtex e hipocampo, e adquirir capacidades morfofisiológicas características de interneurônios GABAérgicos maduros (BACKOFEN-WEHRHAHN et al., 2018; HSIEH; BARABAN, 2017). As células progenitoras derivadas de humanos transplantadas em modelo de epilepsia em ratos são capazes de migrar em torno a até 5mm do sítio de injeção e apresentam taxa de sobrevivência em torno de 50% quatro semanas após o transplante, 30% após 8 semanas e 18% após um ano (LEE et al., 2014). Estudos eletrofisiológicos mostram

que estas células, tanto derivadas de humanos, roedores e porcos se integram funcionalmente, exibem correntes sinápticas espontâneas e evocadas, além de potenciais de ação, indicando que são capazes de se integrar completamente ao cérebro hospedeiro (ALVAREZ-DOLADO et al., 2006; BACKOFEN-WEHRHAHN et al., 2018; HSIEH; BARABAN, 2017; LEE et al., 2014; PAIVA et al., 2017; ZIPANCIC et al., 2010).

Quando estes precursores são transplantados em modelos animais, verifica-se o aumento do limiar para indução de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol, um antagonista GABA<sub>A</sub> (CALCAGNOTTO et al., 2010a), assim como a redução na frequência, duração e severidade das crises espontâneas em modelos de epilepsia (CASALIA; HOWARD; BARABAN, 2017; UPADHYA et al., 2019). Em modelos animais de epilepsias, tanto de ratos quanto de camundongos, vê-se que os transplantes resultam na supressão de 35% e 90% das crises epiléticas espontâneas, e as células são capazes de aumentar a inibição e reorganizar a árvore dendrítica das células granulares do GD, fortemente envolvidas na patologia da ELTm como visto anteriormente (BARABAN, 2007; GUPTA et al., 2019; HENDERSON et al., 2014). As células transplantadas apresentam propriedades semelhantes a interneurônios que expressam PV e SOM, as quais têm sido relacionadas diretamente com diversas das alterações eletroencefalográficas vistas em epilepsias (ESPINOSA et al., 2019; HSIEH; BARABAN, 2017). Uma das grandes vantagens de tratamentos de terapia celular é que eles podem ser feitos de maneira local, em contraponto à maioria dos fármacos que são administradas de maneira sistêmica e geram diversos efeitos colaterais (ANDERSON; BARABAN, 2012).

Embora os achados sobre supressão de crises e melhora do quadro epilético sejam evidentes, pouco se sabe ainda sobre as modificações decorrentes do



transplante. Os mecanismos envolvidos no controle das crises epiléticas ainda não são conhecidos e parecem ir além de apenas aumento na inibição.

### 3 MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIAS

O fato de epilepsias serem muito heterogêneas, com muitas etiologias e sintomas e comorbidades, torna o estabelecimento de bons modelos animais uma tarefa desafiadora. Um modelo ideal deve recapitular os mecanismos causadores da doença em humanos, as características fenotípicas e as respostas aos tratamentos vistas clinicamente. Existem diversos modelos animais de crises epiléticas, diversos tipos de epilepsias e epileptogênese bastante estudados. Diversas espécies têm sido utilizadas nos estudos, como moscas, moluscos, cachorros, e humanos não primatas, mas a grande maioria dos estudos utiliza roedores, especialmente pelo seu tamanho, rápida procriação e facilidade de manipulação (GRONE; BARABAN, 2015).

Frequentemente, os modelos são de crises epiléticas provocadas. Eles podem ser incitados de diferentes formas: induzidos quimicamente (como o modelo de indução por pentilenotetrazol – PTZ – um antagonista GABA<sub>A</sub>), por eletrochoque ou outros insultos, como traumas. São modelos agudos de crises, sendo úteis para estudo de mecanismos de geração de crises epiléticas, sua propagação e fim, representando uma ótima ferramenta para testes de muitos fármacos antiepiléticos. Embora mais superficiais, esses modelos foram utilizados no *screening* de muitos dos fármacos antiepiléticos utilizadas atualmente (COPPOLA; MOSHE, 2014). Entretanto estes não são modelos de epilepsia.

Em modelos de epilepsia, os animais apresentam crises epiléticas espontâneas, crônicas e recorrentes (CER), e incluem modelos genéticos ou induzidos (LÖSCHER, 2017; SERIKAWA et al., 2015). Nos modelos induzidos, os

animais apresentam um processo de epileptogênese desencadeado por um estímulo inicial, resultando no desenvolvimento de CER. Este tipo de modelo pode ser dividido em três diferentes categorias, de acordo com o insulto inicial: crises epiléticas provocadas por hipertermia em animais recém-nascidos; indução de um *status epilepticus* (SE) por estimulação elétrica local ou por injeção local de uma toxina (geralmente toxina tetânica) de cainato, ou pilocarpina; ou pela injeção sistêmica de cainato (agonista glutamatérgico) ou pilocarpina (agonista colinérgico) (DEPAULIS; HAMELIN, 2015). SE consiste em crises anormalmente prolongadas que pode levar a consequências de longo-prazo, incluindo morte neuronal, reorganização sináptica e alterações persistentes da rede neural, dependendo do tipo e duração (TRINKA et al., 2015). Em modelos animais de epilepsia, utiliza-se como duração para a indução entre 30 min e 120 min (LÖSCHER, 2017). O modelo utilizado neste trabalho foi o modelo de epilepsia onde o SE foi induzido por pilocarpina.

### **3.1 Modelo de Epilepsia Induzida por Pilocarpina**

O modelo de pilocarpina foi descrito pela primeira vez por Turski e colaboradores em 1983 (TURSKI et al., 1983). A pilocarpina é um agonista muscarínico, causando aumento da excitabilidade por uma complexa cascata dependente de ativação dos receptores de acetilcolina. Ao se ligar no receptor muscarínico M1, a pilocarpina ativa a fosfolipase C, produzindo diacilglicerol (DG) e inositol trifosfato (IP3), alterando correntes de  $K^+$  e  $Ca^{+2}$ . O aumento da excitabilidade ocorre provavelmente devido à diminuição da atividade das ATPases no hipocampo, que não repolarizam a membrana. O aumento do  $Ca^{+2}$  promove a liberação de glutamato, que age nos receptores AMPA, permitindo a entrada de  $Na^+$  e de mais  $Ca^{+2}$ . A despolarização permite a ativação dos receptores NMDA, que novamente

permitem a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  na célula pós-sináptica, o que, de maneira prolongada, induz excitotoxicidade e morte celular. A massiva ativação de receptores de glutamato, com retroalimentação positiva pela entrada constante de  $\text{Ca}^{+2}$  acaba por gerar um prolongado SE, capaz de danificar permanentemente o animal, o que desencadeará a epileptogênese (CAVALHEIRO et al., 2006).

Estudos reportam que, com um SE entre 30 e 120min, a maioria dos animais irá desenvolver CER. O espaço de tempo entre o término do SE e o aparecimento da primeira crise epiléptica é chamado de período latente, e dura entre 4 e 40 dias, dependendo da intensidade do insulto inicial. É neste período que iniciam os processos estruturais, moleculares e funcionais que culminam na transformação de uma rede cerebral sadia em uma capaz de gerar CER, a chamada epileptogênese (KELLY; COULTER, 2017).

Como um modelo de ELT, muitos critérios de aproximação das alterações vistas em pacientes são alcançados. Alterações neuropatológicas como perda neuronal em várias áreas do encéfalo, especialmente no hipocampo, alteração na distribuição de espinhas nas células granulares do giro dentado, distorção na arborização dendrítica, perda de interneurônios GABAérgicos no hipocampo, brotamento de fibras musgosas, aumento da taxa de neurogênese, proliferação de astrócitos, esclerose hipocampal e outras características muito similares às vistas em pacientes com ELT (CAVALHEIRO et al., 2006; LEITE; GARCIA-CAIRASCO; CAVALHEIRO, 2002). Embora seja frequentemente apontado como um modelo de ELTm, cabe ressaltar que as alterações ocorrem muito além do hipocampo, com envolvimento de outras estruturas como tálamo, amígdala e córtex, que por hora são reportadas como raramente envolvidas em pacientes (KANDRATAVICIUS et al., 2014; WEI et al., 2016).

#### 4 OSCILAÇÕES CEREBRAIS

A atividade elétrica cerebral registrada no EEG é caracterizada por ondas de diferentes amplitudes e frequências, também conhecidas por oscilações ou ritmos cerebrais. Oscilações cerebrais são flutuações periódicas no potencial de campo decorrentes da atividade elétrica e sináptica produzida pela integração das células neurais no encéfalo. Estas ondas registradas no EEG são geradas no córtex cerebral devido ao fluxo de correntes iônicas extracelulares associadas ao somatório dos potenciais pós-sinápticos excitatórios e inibitórios originados nos dendritos de milhares de células piramidais corticais (BUZSÁKI, 2006; BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012).

Oscilações de rede cobrem uma vasta gama de frequências (~0,01-600Hz) e definem diferentes estados cognitivos e comportamentais. A atividade oscilatória registrada no EEG é comumente dividida em bandas de frequências como delta (1-4 Hz), teta (4-12 Hz), alfa (8-12 Hz), beta (12-30 Hz), *high-frequency oscillations* (HFOs) (gama, *ripples* e *fast ripples*: 30-500 Hz). Além do EEG, os ritmos cerebrais podem ser detectados em registros de eletrocorticograma (ECoG) e através de eletrodos de profundidade intracerebrais, os chamados potenciais de campo locais (do inglês, *local field potential* - LFP). Um exemplo de alguns destes ritmos registrados no EEG pode ser visto em (BUZSÁKI, 2006).

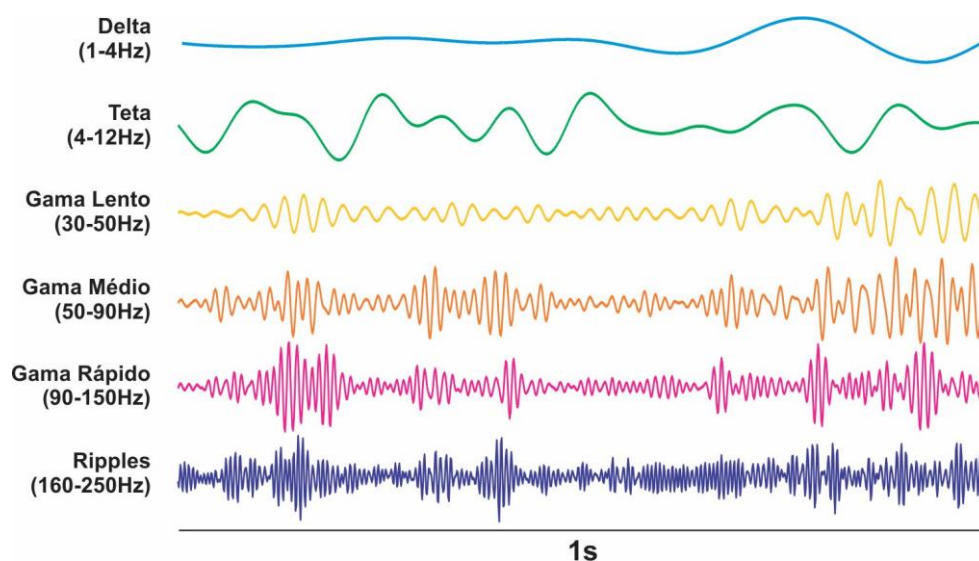


Figura 6 Exemplo de faixas de frequência registradas no EEG.

Em geral, oscilações de rede podem ser descritas como um somatório de ondas senoidais de diferentes frequências (ciclos por segundo ou hertz), picos de amplitude (potência = amplitude ao quadrado) e fase que se somam formando o traçado bruto. Essa estrutura é o que permite as várias análises e medidas utilizadas para avaliar o comportamento das oscilações. Dessa forma, um traçado bruto pode ser decomposto em suas ondas componentes, representando a quantidade de cada uma dessas frequências, numa análise denominada densidade de potência espectral (MATHALON; SOHAL, 2015).

O grau em que dois registros de duas estruturas diferentes estão correlacionados ou coerentes pode refletir aspectos da conectividade neural. Um método de medir essa sincronia é através da coerência quadrática de magnitude (do inglês *magnitude-squared coherence*), que é medida entre dois sinais para diferentes frequências. Quanto maior o valor desta coerência (que varia entre 0 e 1), mais sincronizada estariam os dois sinais (e no caso, estruturas) na frequência em questão (ROACH; MATHALON, 2008).

As oscilações cerebrais nas diferentes faixas de frequências não são entidades isoladas, mas interagem entre si em um fenômeno chamado acoplamento de frequência cruzada (do inglês, *cross-frequency coupling* – CFC). Em um tipo de interação conhecida como acoplamento de fase-amplitude (PAC – do inglês *phase-amplitude coupling*), a amplitude de uma oscilação de alta frequência é modulada pela fase de outra de baixa frequência. O acoplamento mais estudado é visto no hipocampo, onde a fase da oscilação teta modula a amplitude da oscilação gama, sendo fundamental para funções cognitivas (TORT et al., 2008, 2013). Existem diversas formas de medir PAC, mas neste trabalho utilizaremos o índice de modulação (MI). Esta medida é definida como uma adaptação da distância de Kullback-Leiber (usada para inferir a distância entre duas distribuições), sendo considerada uma medida de entropia normalizada que calcula o quanto uma distribuição de amplitudes ao longo de bins (intervalos) de fase desvia de uma distribuição uniforme. Dessa forma, se a amplitude média é uniformemente distribuída ao longo das fases,  $MI=0$  e dizemos que não há acoplamento. O MI aumenta conforme a distribuição de amplitude se distancia da distribuição uniforme, variando entre 0 e 1 (TORT et al., 2010).

Além de diversos tipos de acoplamentos em distintas estruturas cerebrais, pode haver diferenças significativas dentro de uma própria estrutura. No hipocampo, por exemplo, as regiões CA3 e CA1 podem ter diferentes sub-bandas de oscilação gama moduladas pela fase da frequência teta (SCHEFFER-TEIXEIRA; TORT, 2017). Além disso, em CA1 os padrões de acoplamento são específicos a cada camada, e indicam que oscilações teta modulando oscilações gama de diferentes frequências refletem inputs de diferentes áreas (SCHEFFER-TEIXEIRA et al., 2012).

Nas últimas décadas, além das relevantes pesquisas sobre cognição e comportamento, o estudo das oscilações cerebrais como marcadores para diferentes

doenças tem se mostrado cada dia mais relevante. As alterações na integridade sináptica se refletem como modificações que podem ser detectadas nos padrões oscilatórios e vêm sendo estudadas em diferentes patologias, como doença de Alzheimer, autismo, esquizofrenia e epilepsias (BAŞAR et al., 2016; NIMMRICH; DRAGUHN; AXMACHER, 2015).

#### **4.1 Alterações Oscilatórias em Epilepsias**

Além da evidente alteração oscilatória durante as crises epiléticas, com a reorganização neuronal e sináptica resultantes da epileptogênese, alterações nos ritmos cerebrais são vistas em diferentes momentos. Análise quantitativa do EEG, através de análises de potência e coerência espectral e PAC tem se mostrado uma importante ferramenta no entendimento das alterações de sincronia e frequência vistas em humanos e modelos animais.

No período interictal, os dois principais eventos observados são pontas epileptiforme interictais (IES, do inglês *interictal epileptiform spikes*) e oscilações de alta frequência (HFOs, do inglês *high frequency oscillations*). As IES são associadas com hiperexcitabilidade, seguida de um potencial inibitório, o qual acredita-se tenha relação com uma tentativa de proteção contra generalização das crises epiléticas (De Curtis and Avanzini, 2001; Salami et al., 2014). Já as HFOs parecem ter relação com regiões epileptogênicas e têm sido apontadas como excelentes marcadores para auxílio na escolha dos locais de ressecção cirúrgica (Zijlmans et al., 2012). Tais eventos interictais são indicações de uma complexa reorganização sináptica e podem ter diferentes funções no processo de ictogênese (Devinsky et al., 2018).

De especial interesse para o entendimento da rede epileptogênica são as análises do período pré-ictal, como é chamado o curto espaço de tempo antes do

início da crise epiléptica, as quais fornecem evidências dos motivos pelos quais a rede entra em um estado de hipersincronia. Na ELT, os dois padrões de início de crise mais reportados são os iniciados por oscilações de baixa voltagem e atividade rápida, chamadas de LVF (do inglês, *low voltage frequency*) e o iniciado com baixa frequência e pontas periódicas de alta amplitude, chamados de HYP (do inglês, *hypersynchronous-onset*) (PERUCCA; DUBEAU; GOTMAN, 2014). Estudos apontam relação direta da geração de HFOs com ativação de interneurônios, especialmente PV e SOM (KLAUSBERGER et al., 2003), e a inibição perissomática das células em cesto que expressam PV no hipocampo é fundamental para a geração de oscilações gama (BUZSÁKI; WANG, 2012; CARDIN et al., 2009). De fato, a ativação de interneurônios PV por optogenética em modelo *in vitro* de epilepsia focal induz atividade epileptiforme (SESSOLO et al., 2015). Além disso, análise do padrão de disparo de interneurônios em modelo de epilepsia induzido por pilocarpina mostra que os interneurônios ficam mais ativos no período pré-ictal, especialmente no subículo, GD e CA3, porém há uma diminuição dos disparos na área de CA1 (TOYODA et al., 2015). A inibição seletiva dos interneurônios PV e SOM durante a crise epiléptica prolonga a duração da mesma (KHOSHKHOO; VOGT; SOHAL, 2017). Desse modo, é evidente que os interneurônios GABAérgicos participam de algum modo na geração das atividades ictais, mas o seu papel na alteração do padrão oscilatório da rede ainda é controverso.

Alterações de acoplamento entre oscilações são relacionadas com alterações na dinâmica da excitabilidade de rede em assembleias neuronais e diretamente dependentes da atividade dos interneurônios (BUZSÁKI; WANG, 2012; CAIXETA et al., 2013). Aumento do PAC entre oscilações lentas (<4Hz) e rápidas (gama a ripples, 80-250Hz) na área CA3 de animais epilépticos é relacionado com o aumento do



número de crises epilépticas por dia nesses animais (SAMIEE et al., 2018a). Diversos trabalhos correlacionam aumento de PAC com zonas de início de crises epilépticas em modelos animais e em pacientes, indicando que esta medida pode ser usada como um marcador de foco epileptogênico (AMIRI; FRAUSCHER; GOTMAN, 2016; JACOBS et al., 2018; NARIAI et al., 2011).

Embora menos estudado, o período pós-ictal, que ocorre logo após o término da crise epiléptica, pode fornecer evidências de como a rede retorna para o estado basal, não hipersincrônico. Um estudo com pacientes pediátricos mostrou que crises generalizadas apresentavam maior potência de delta pós-ictal quando comparado com crises focais, e tal aumento mostrou correlação positiva com persistência de crises generalizadas após cirurgia (TOMLINSON et al., 2018). Mais estudos focando em alterações após as crises podem ajudar a entender melhor as modificações de rede e garantir desfechos melhores de tratamentos.

## **JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

O sistema GABAérgico, principal fonte inibitória do SNC, desempenha um papel central na organização e sincronização das oscilações cerebrais, com especial participação dos interneurônios PV e SOM (BUZSÁKI; WANG, 2012; MANN; PAULSEN, 2007). Diversas alterações são encontradas na ELTm, mas a perda interneuronal, com conseqüente diminuição da modulação de rede pelo sistema GABAérgico, é apontada como uma das principais características relacionadas à epileptogênese (AVOLI; DE CURTIS; KÖHLING, 2013; DE LANEROLLE; LEE; SPENCER, 2012; GUAZZI; STRIANO, 2019; WANG et al., 2017). Tal característica é reproduzida no modelo animal de pilocarpina, o qual tem sido largamente utilizado

para estudar as modificações e possíveis tratamentos da ELT (CAVALHEIRO et al., 2006; LÉVESQUE; AVOLI; BERNARD, 2016).

Como é sabido que mudanças na integração dos interneurônios GABAérgicos na rede neural pode levar a alterações no padrão de oscilações (ALLEN; MONYER, 2014; BUZSÁKI; WANG, 2012; MÜLLER; REMY, 2018), nossa hipótese é que estas alterações podem ser preditores de ictogênese, mesmo em períodos interictais na ausência de descargas epiléticas, e que a reposição celular com integração de novos interneurônios na rede pode mudar os padrões de oscilações peri-ictais diminuindo a ictogênese.

Uma vez que as oscilações não são entidades isoladas e interagem entre si, as alterações podem ser avaliadas quanto à potência e coerência espectral, e quanto às modificações no PAC. Tais alterações ocorrem em regiões específicas, como as diferentes camadas de CA1, e podem estar presentes nas diferentes fases da ictogênese, tanto no período peri-ictal quanto interictal, sendo possíveis preditores de focos epileptogênicos. Uma análise mais específica e detalhada pode ajudar no entendimento de como os precursores da EGM estão modificando a rede na qual se integram, a fim de entender seu potencial terapêutico.

## **OBJETIVOS**

### **1 OBJETIVOS GERAIS**

Estudar através de análise de registros de EEG as alterações de potência, coerência espectral e PAC de oscilações corticais e hipocampais em modelo experimental de pilocarpina, submetido ou não ao transplante de células precursoras da EGM nos períodos inter, pré e pós-ictal.

## **2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.1 - Analisar a potência, coerência e PAC de oscilações em eletrodos de profundidade corticais e nas diferentes camadas de CA1 hipocampal no período interictal em modelo animal de epilepsia induzida por pilocarpina;

2.2 - Avaliar a atividade da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) em amostras de hipocampo de animais com epilepsia induzida por pilocarpina;

2.3 - Analisar a potência, coerência e PAC de oscilações no período peri-ictal de animais submetidos ao modelo de epilepsia induzida por pilocarpina com e sem o transplante de precursores da EGM no córtex e hipocampo.

## PARTE II – METODOLOGIA E RESULTADOS

O presente trabalho é dividido em dois capítulos.

O capítulo I apresenta o artigo “*Hippocampal CA1 and cortical interictal oscillations in the pilocarpine model of epilepsy*”, o qual é relacionado ao objetivo 2.1 e foi publicado na revista científica Brain Research. Além disso traz os resultados complementares da avaliação da atividade da GAD relacionado ao objetivo 2.2.

O capítulo II, relacionado ao objetivo 2.3, traz os resultados referentes à análise em animais com epilepsia submetidos ao transplante de precursores da EGM, obtidos em parceria com a Prof. Dra. Beatriz Monteiro da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), que serão submetidos para publicação em revista científica internacional.

## **CAPÍTULO I**

### **ARTIGO I**

#### **HIPPOCAMPAL CA1 AND CORTICAL INTERICTAL OSCILLATIONS IN THE PILOCARPINE MODEL OF EPILEPSY**

Mayara Vendramin Pasquetti, Leticia Meier, Joseane Righes Marafiga, Leticia Barbieri Caus, Adriano  
Bretanha Lopes Tort, Maria Elisa Calcagnotto

*Brain Research*

**Title: Hippocampal CA1 and cortical interictal oscillations in the pilocarpine model of epilepsy**

Mayara Vendramin Pasquetti<sup>1,2</sup>, Letícia Meier<sup>1,2,3</sup>, Joseane Righes Marafiga<sup>1,2</sup>,  
Letícia Barbieri Caus<sup>1</sup>, Adriano Bretanha Lopes Tort<sup>4</sup>, Maria Elisa Calcagnotto<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Neurophysiology and Neurochemistry of Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity

Laboratory, Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90035-003, RS, Brazil

<sup>2</sup>Graduate Program in Biological Science: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90035-003, RS, Brazil

<sup>3</sup>Present address: Biosciences and Mass Spectrometry Laboratory, Pharmaceutical Sciences Department, Health Sciences Sector, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80210-170, PR, Brazil

<sup>4</sup>Brain Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 59056-450, RN, Brazil

\*Correspondent author: Maria Elisa Calcagnotto, MD, PhD

Address: NNNESP Lab., Biochemistry Department, ICBS/UFRGS, R. Ramiro Barcelos 2600 Anexo 21111, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

Phone: +55 51 33085570

E-mail: elisa.calcagnotto@ufrgs.br

## ABSTRACT

Quantitative electroencephalogram analysis has been increasingly applied to study fine changes in brain oscillations in epilepsy. Here we aimed to evaluate interictal oscillations using pilocarpine model of epilepsy to identify changes in network synchronization. We analyzed the *in vivo* local field potential of two cortical layers (Ctx1, Ctx2) and hippocampal CA1 (*stratum oriens*-Ors, *pyramidale*-Pyr, *radiatum*-Rad and *lacunosum-moleculare*-LM) in rats, about 5 weeks after pilocarpine injection. Animals that had *status epilepticus* (SE) and later spontaneous recurrent seizures (SRS) (epileptic animals) exhibited higher delta power recorded in cortical and hippocampal Ors, Rad and LM electrodes. They also had lower power of theta in Ctx1, Ctx2, Ors and LM, lower slow gamma in Ctx1, Ctx2 and Ors, and lower middle and fast gamma power in Ors. NSE animals had higher delta and lower slow gamma power in Ctx1 only, and lower theta power in Ctx1, Ctx2 and LM. Essentially, epileptic animals had higher delta coherence between Ctx1-Ors, Ctx2-Ors, Ctx2-Pyr, Pyr-Ors and stronger phase-amplitude coupling (PAC) between delta and all frequencies in Rad. NSE animals, also had higher delta coherence between Ctx1-Ors and Ctx2-Ors with no changes in PAC, suggesting some cortical network reorganization. Our data suggest an increased synchrony in cortex and CA1 of epileptic animals, particularly for delta frequency with intense delta coupling in Rad, probably an important synchronization site. Understanding the rhythms organization at non-ictal state could provide insights about network connectivity involved in ictogenesis and seizure propagation.

Keywords: temporal lobe epilepsy, neuronal oscillations, spectral power, phase coherence, phase-amplitude coupling, interictal oscillations

## 1 INTRODUCTION

Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most common form of refractory epilepsy in adolescence and adulthood and the most frequently treated with surgical intervention (SCHEFFER et al., 2017; TÉLLEZ-ZENTENO; HERNÁNDEZ-ROQUILLO, 2012). Although tumors or malformations can be related to MTLE, hippocampal sclerosis is more prevalent (BLUMCKE et al., 2017).

Quantitative analysis of the electroencephalogram (EEG) has been increasingly applied to study fine changes in brain oscillations in epilepsy (FRAUSCHER et al., 2017; HÖLLER; HELMSTAEDTER; LEHNERTZ, 2018). Many quantitative EEG studies have shown changes in brain synchrony either during or just before the onset of epileptic seizures (GAGLIANO et al., 2018; JACOBS et al., 2018; NAFTULIN et al., 2018; NARIAI et al., 2011). However, neural connectivity is also notably altered during interictal states (LAGARDE et al., 2018).

Interictal epileptiform spikes (IES) and high-frequency oscillations (HFO > 80 Hz) are observed in patients with focal epilepsies (DEVINSKY et al., 2018; ZIJLMANS et al., 2012). IES are associated with transient hyperexcitability of neurons, followed by a slow synaptic inhibitory potential, which was proposed to protect against seizure generation (DE CURTIS; AVANZINI, 2001; SALAMI et al., 2014). The HFO in the epileptogenic regions appears to represent the firing of small groups of principal cells pathologically interconnected in the epileptic tissue, which causes abnormal responses to subthreshold stimuli and leave neurons spontaneously active (ZIJLMANS et al., 2012). Overall, interictal events represent pathologically rearranged cortical networks that might have different functions in ictogenesis, but their role in epileptogenesis is still debated (AVOLI; DE CURTIS; KÖHLING, 2013; DEVINSKY et al., 2018).



To study network synchrony, it is crucial to understand how brain oscillations interact and influence one another (BUZSÁKI, 2006; PESARAN et al., 2018). This analysis can be performed by evaluating the coupling between brain rhythms of different frequencies (cross-frequency coupling, CFC) such as the modulation of the amplitude of faster frequencies by the phase of slow oscillations (phase-amplitude coupling, PAC) (TORT et al., 2010). Although PAC is characteristic for different brain structures, there are also variations within the same region. For example, in the hippocampus, there are different PAC patterns in each layer (SCHEFFER-TEIXEIRA et al., 2012; SCHEFFER-TEIXEIRA; TORT, 2017; TORT et al., 2013). Many electrophysiological studies have shown an increase in PAC before seizure onset or during the ictal period, which may help to identify the epileptic zone during brain surgery (AMIRI; FRAUSCHER; GOTMAN, 2016; BROGGINI et al., 2016; COLIC et al., 2013; GAGLIANO et al., 2018; GU; ZHANG, 2017; SONG et al., 2017).

Atrophy in the CA1 hippocampal subfield is a marker of primary hippocampal epileptogenesis (MACCOTTA et al., 2015). Moreover, it is likely that the poor controlling mechanisms of neuronal excitability could increase the vulnerability of CA1 hippocampal pyramidal cells in MTLE to neuronal death (REYES-GARCIA et al., 2018). *In vitro* electrophysiology studies in the pilocarpine rat model of epilepsy indicated an increased excitability in the CA1 area, associated with changes in GABAergic connectivity and aberrant axonal sprouting in this region. This could lead to propagation of epileptiform-like activity via augmented backward excitation (EL-HASSAR et al., 2007; EL-HASSAR; ESCLAPEZ; BERNARD, 2007). Although an increase in excitability is evident in CA1, the role that this region plays in MTLE is still not fully understood.

As hippocampal CA1 subfield seems to be an important site of epileptogenesis in MTLE, we wanted to identify the changes in brain oscillations and synchronization in different hippocampal layers during interictal states. Understanding how brain rhythms organize in non-ictal periods can give us insights about connections among areas, exposing alterations in structures responsible for ictogenesis and seizure propagation.

In order to investigate the interictal network free of the classical markers of IES in MTLE, we evaluated in detail the local field potentials recorded in cortical and CA1 hippocampal layers of pilocarpine rat model of epilepsy.

## 2 RESULTS

Changes in connectivity were investigated through power and coherence spectral analysis, and PAC, using delta as phase modulator (1-4 Hz) and slow gamma to fast ripple bands as amplitude-modulated frequencies (30-400 Hz).

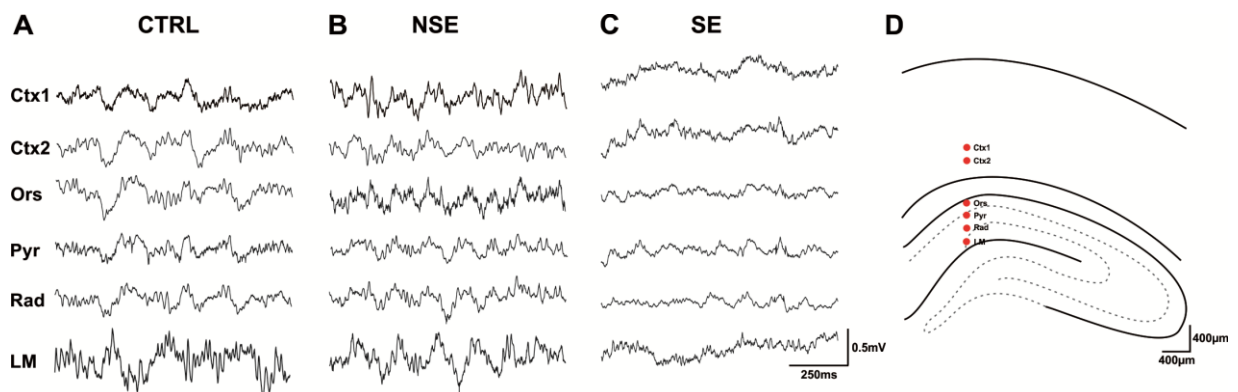


Figure 1 Representative in vivo LFP recordings of control (A), NSE (B) and E animals (C) from electrodes located at cortical layers IV-V (Ctx1) and V-VI (Ctx2), and in CA1 stratum oriens (Ors), pyramidale (Pyr), radiatum (Rad) and lacunosum-moleculare (LM). (D) Schematics of electrodes location. NSE: non-status epilepticus; E: epileptic animals.

## 2.1 Spectral power

In order to investigate the differences in brain oscillations between epileptic, NSE and control animals, we first quantified power spectral densities for the multisite LFP recordings. This analysis measures how much power the activity contains at each frequency (PESARAN et al., 2018).

The epileptic animals exhibited significantly higher delta power in several recorded regions. That is, in Ctx1, Ors and Rad when compared to controls, in Ctx2 and LM when compared to NSE animals and controls (Figure 2). Epileptic animals also had lower theta power in both cortical areas, Ors and LM compared to control (Figure 2).

Similar to epileptic animals, the NSE group exhibited significantly higher delta power in Ctx1 (Figure 2A) and lower theta power in both cortical electrodes (Figure 2 A, B) and in LM when compared to controls (Figure 2F and Table 1).

Table 1 – Frequency band power.

Electrode	Group	Delta	Theta	Slow Gamma	Middle Gamma	Fast Gamma	Ripples	Fast Ripples
Ctx 1	Control	62.93±6.7	20.71±1.4	1.54±0.6	0.29±0.1	0.048±0.01	0.015±0.005	0.0084±0.001
	NSE	96.26±8.1#	10.50±3.2#	0.18±0.2*	0.06±0.1	0.026±0.02	0.015±0.009	0.0083±0.004
	E	87.32±4.8*	12.39±1.2#	0.71±0.2*	0.24±0.1	0.082±0.02	0.030±0.009	0.0122±0.003
Ctx 2	Control	45.78±5.0	25.11±2.0	2.00±0.2	0.43±0.1	0.051±0.01	0.009±0.003	0.0043±0.001
	NSE	42.86±13.6	15.87±4.3*	1.39±0.7	0.30±0.1	0.047±0.01	0.012±0.006	0.0062±0.003
	E	75.66±4.3*#	17.10±1.7*	0.90±0.2*	0.25±0.03	0.066±0.01	0.023±0.006	0.0118±0.004
Ors	Control	56.38±6.6	21.00±1.7	1.76±0.4	0.36±0.1	0.060±0.004	0.012±0.003	0.0048±0.001
	NSE	64.21±12.4	17.36±1.7	1.14±0.5	0.25±0.1	0.042±0.011	0.009±0.005	0.0042±0.002
	E	82.60±4.1*	15.29±1.4*	0.68±0.1*	0.18±0.01*	0.042±0.002*	0.013±0.003	0.0073±0.002
Pyr	Control	61.23±8.6	16.83±2.7	1.94±0.5	0.42±0.1	0.077±0.02	0.021±0.006	0.0099±0.003
	NSE	69.78±11.7	15.07±5.5	0.76±0.5	0.20±0.1	0.038±0.02	0.019±0.007	0.0045±0.003
	E	74.04±5.8	17.11±2.2	1.01±0.1	0.30±0.05	0.091±0.03	0.028±0.010	0.0113±0.004
Rad	Control	43.17±2.7	19.04±3.6	2.39±0.5	0.53±0.1	0.064±0.004	0.009±0.004	0.0039±0.001
	NSE	66.36±9.2	16.47±2.7	0.81±0.3	0.20±0.1	0.044±0.03	0.012±0.009	0.0037±0.002
	E	73.40±7.5*	17.20±2.1	1.34±0.4	0.32±0.1	0.057±0.01	0.014±0.006	0.0055±0.002
LM	Control	40.72±2.3	24.84±1.6	2.51±0.2	0.68±0.1	0.092±0.02	0.009±0.002	0.0030±0.001
	NSE	31.54±14.2	12.48±6.4*	0.47±0.3	0.14±0.1	0.025±0.01	0.006±0.002	0.0036±0.001
	E	69.01±9.3##	15.07±1.7*	1.76±0.6	0.48±0.1	0.110±0.03	0.029±0.013	0.0106±0.004

NSE: non-*status epilepticus*; E: epileptic animals

\*p<0.05; \*difference from control group; \*\* difference from control and NSE groups.

#p<0.01; #difference from control group; ## difference from control and NSE groups.

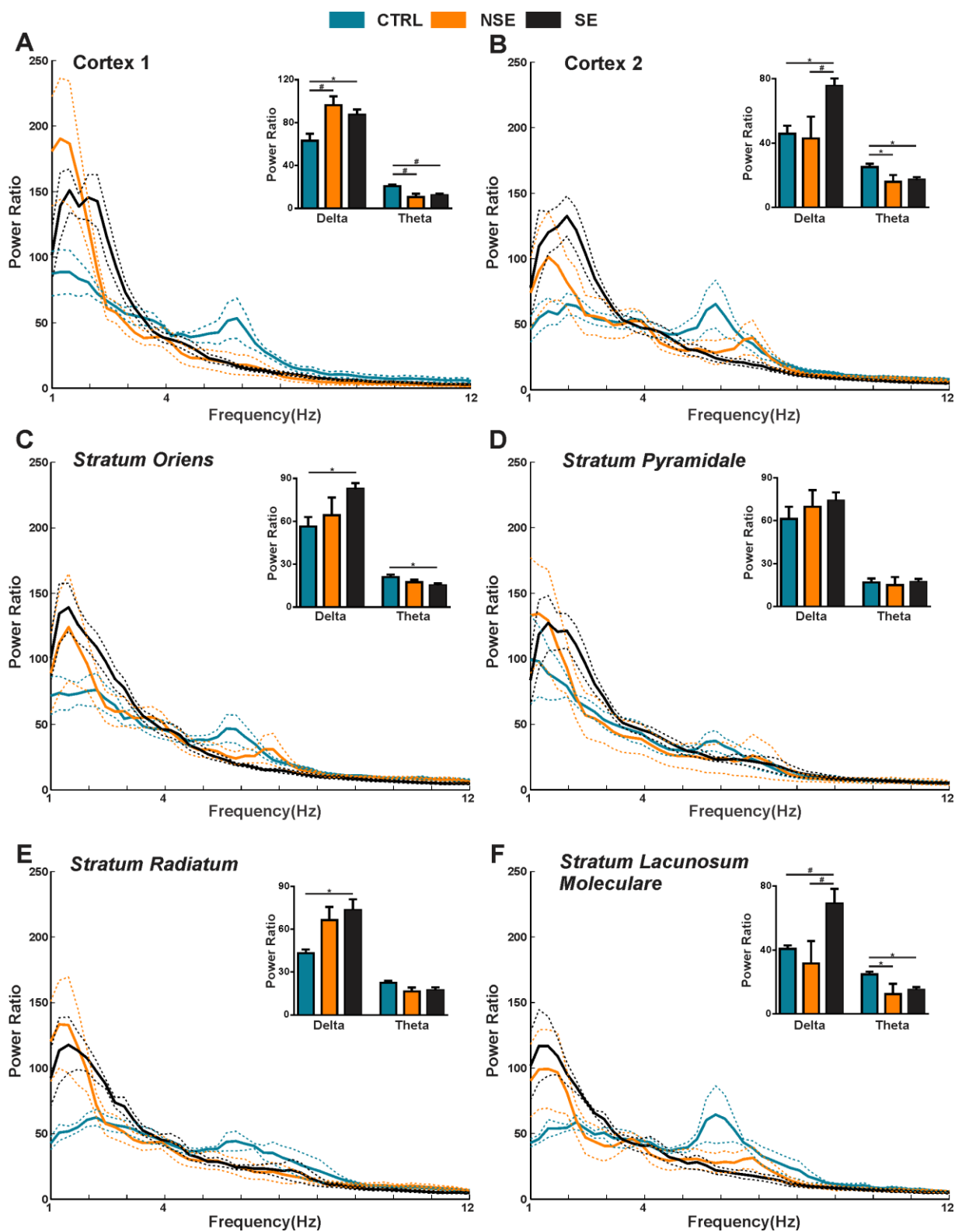
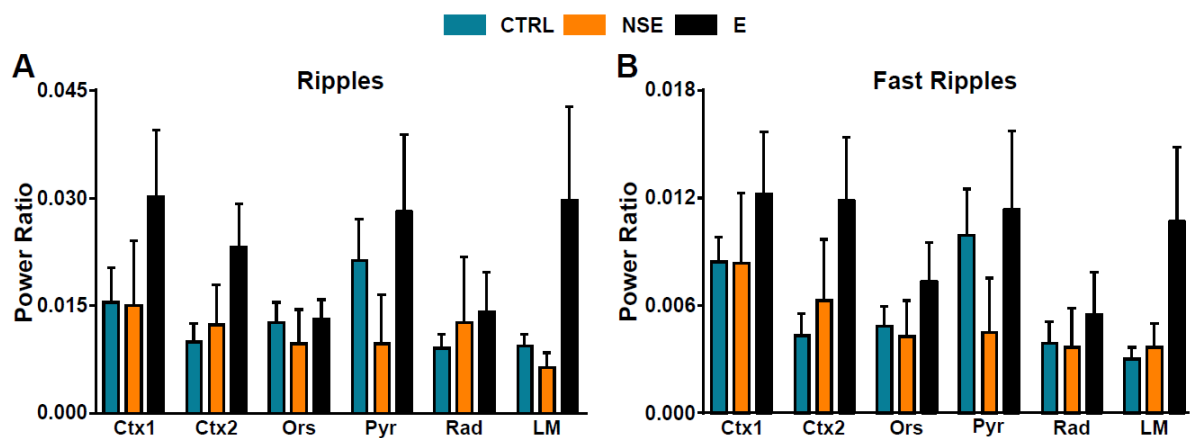


Figure 2 Power spectral densities showing differences in delta and theta frequency bands for control (blue), NSE (orange) and E (black) groups at (A) cortical layers IV-V (Cortex 1), (B) V-VI (Cortex 2), and CA1 (C) *stratum oriens*, (D) *pyramidale*, (E) *radiatum* and (F) *lacunosum-moleculare*. The continuous lines represent means and the dashed lines represent SEM. \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.01$  (One-Way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test). NSE: non-status epilepticus; E: epileptic animals

A significantly lower power of the slow gamma band was observed in Ctx1, Ctx2 and in Ors of epileptic animals (Figure 3B, C) and in Ctx1 of NSE (Figure 3A), when compared to control animals (Figure 3 and Table 1). Power of middle and fast gamma bands was lower in Ors of epileptic animals than controls (Figure 3C and Table 1). We did not find any significant differences in power levels of ripples and fast ripples between groups (Figure S1 and Table 1).



Supplementary Figure S1 - Power spectral alterations of ripples (A) and fast ripples (B) oscillations for control (blue), NSE (orange) and E (black) groups at cortical layers IV-V (Ctx1), V-VI (Ctx2), and CA1 *stratum oriens, pyramidale, radiatum* and *lacunosum-moleculare*. NSE: non-status epilepticus; E: epileptic animals.

Therefore, the most significant differences in spectral power were found in the cortical areas (Ctx 1 and Ctx2) and in the Ors of the hippocampus (Figures 2, 3 and Table 1).

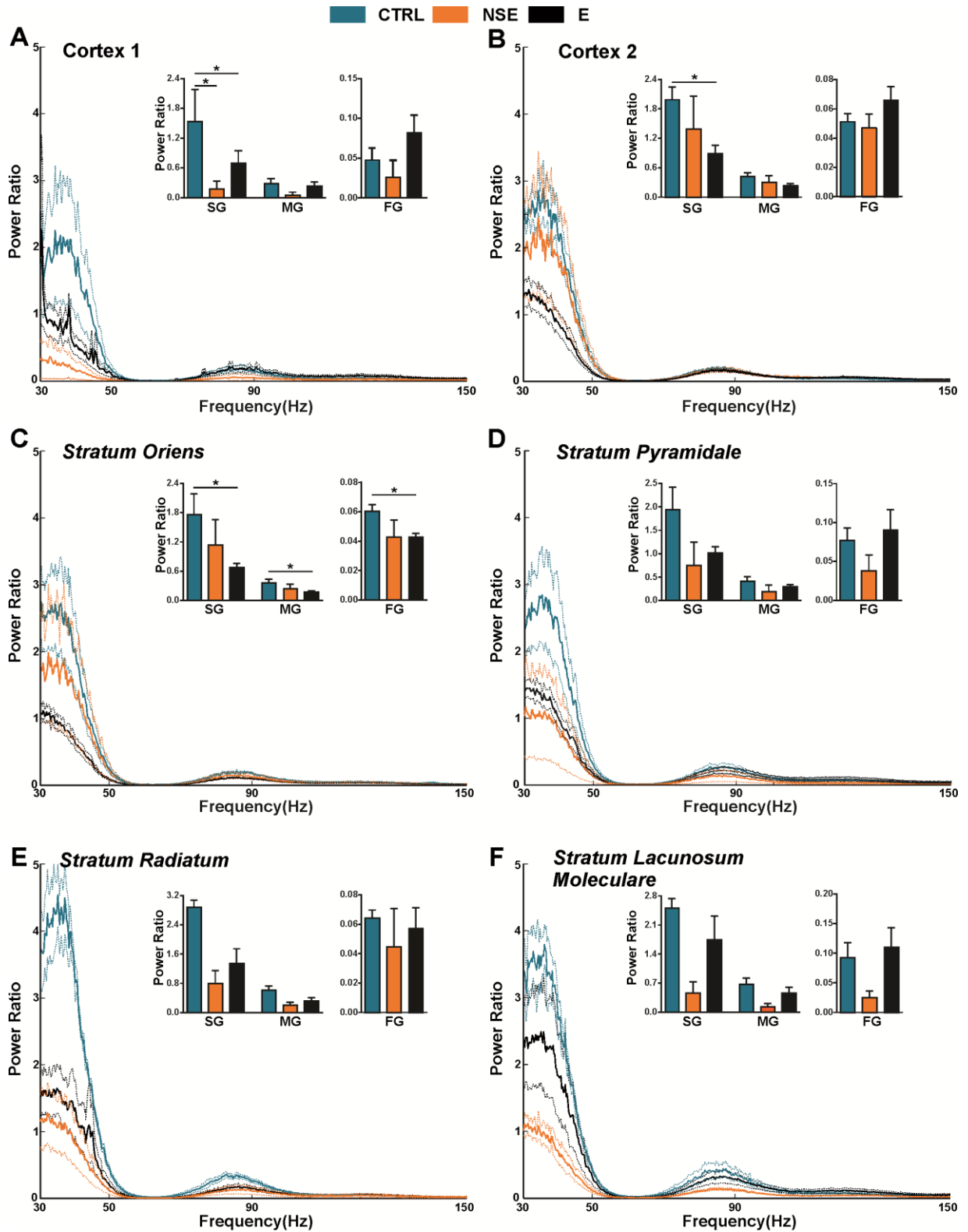


Figure 3 Power spectral densities showing differences in slow, middle and fast gamma frequency bands for control (blue), NSE (orange) and E (black) groups at (A) cortical layers IV-V (Cortex 1), (B) V-VI (Cortex 2), and CA1 (C) *stratum oriens*, (D) *pyramidale*, (E) *radiatum* and (F) *lacunosum-moleculare*. The continuous lines represent means and the dashed lines represent SEM. \* $p < 0.05$  #  $p < 0.01$  (One-Way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test). NSE: non-*status epilepticus*; E: epileptic animals.

## 2.2 Spectral coherence

Next, we investigated synchrony within recorded regions through the phase coherence analysis comparing all pairs of electrodes. Figure 4 shows coherence matrices, with x and y axis representing electrodes, and the colors representing the mean coherence in the analyzed frequency band. Warmer colors represent higher coherence. The mean coherence in each frequency band is shown in Table 2.

Epileptic animals had significantly higher delta coherence between Ctx1-Ors, Ctx2-Ors, Ctx2-Pyr, and Ors-Pyr, when compared to control animals (Figure 4A). NSE animals had significantly higher delta coherence only between both cortical regions and Ors (Ctx1-Ors and Ctx2-Ors) when compared to controls (Figure 4A).

Significantly lower phase coherence for theta, slow and middle gamma between Ctx1 and other electrodes (except Ors) was observed in epileptic animals (Figure 4B, C, D, E), and lower phase coherence in the fast gamma band in Ctx1-Ctx2 compared to control group. Meanwhile, NSE animals had lower phase coherence for slow and middle gamma bands between Ctx1-Rad and Ctx1-Ctx2 when compared to controls (Figure 4C, D and Table 2).

Table 2 – Mean coherence of different frequency bands.

Electrodes	Group	Delta	Theta	Slow Gamma	Middle Gamma	Fast Gamma	Ripples	Fast Ripples
Ctx1-Ctx2	Control	0.6±0.04	0.7±0.04	0.64±0.02	0.47±0.03	0.17±0.02	0.06±0.004	0.04±0.002
	NSE	0.62±0.1	0.67±0.07	0.41±0.1*	0.22±0.04*	0.1±0.03	0.06±0.01	0.04±0.008
	E	0.58±0.08	0.44±0.09*	0.23±0.06*	0.15±0.04*	0.08±0.02*	0.06±0.01	0.06±0.01
Ctx1-Ors	Control	0.23±0.02	0.3±0.01	0.13±0.005	0.08±0.004	0.04±0.001	0.04±0.001	0.05±0.01
	NSE	0.49±0.1*	0.51±0.1	0.15±0.05	0.09±0.01	0.04±0.003	0.06±0.01	0.07±0.01
	E	0.44±0.06*	0.3±0.05	0.1±0.02	0.06±0.01	0.04±0.002	0.04±0.003	0.06±0.008
Ctx1-Pyr	Control	0.40±0.04	0.47±0.03	0.21±0.02	0.11±0.01	0.04±0.002	0.04±0.001	0.04±0.001
	NSE	0.43±0.1	0.43±0.1	0.11±0.01	0.08±0.01	0.04±0.003	0.04±0.002	0.04±0.001
	E	0.51±0.08	0.28±0.04*	0.07±0.01*	0.05±0.006*	0.04±0.005	0.04±0.009	0.05±0.01
Ctx1-Rad	Control	0.32±0.03	0.44±0.02	0.18±0.01	0.11±0.007	0.04±0.002	0.04±0.001	0.04±0.001
	NSE	0.38±0.1	0.37±0.1	0.07±0.01*	0.06±0.006*	0.04±0.001	0.04±0.003	0.04±0.001
	E	0.39±0.07	0.24±0.03*	0.07±0.01*	0.05±0.004*	0.04±0.005	0.04±0.009	0.05±0.01
Ctx1-LM	Control	0.25±0.03	0.31±0.03	0.14±0.01	0.09±0.008	0.04±0.002	0.04±0.001	0.04±0.001
	NSE	0.37±0.1	0.35±0.08	0.09±0.01	0.08±0.01	0.04±0.004	0.04±0.003	0.04±0.001
	E	0.32±0.08	0.22±0.05*	0.07±0.01*	0.05±0.004*	0.04±0.005	0.04±0.007	0.05±0.01
Ctx2-Ors	Control	0.33±0.06	0.37±0.05	0.15±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	0.06±0.02	0.07±0.002
	NSE	0.61±0.1*	0.56±0.1	0.18±0.05	0.13±0.04	0.06±0.01	0.04±0.02	0.04±0.003
	E	0.59±0.03*	0.49±0.03	0.17±0.02	0.11±0.01	0.07±0.009	0.07±0.02	0.11±0.03
Ctx2-Pyr	Control	0.49±0.1	0.52±0.09	0.23±0.06	0.1±0.02	0.05±0.003	0.04±0.004	0.06±0.008
	NSE	0.43±0.1	0.41±0.1	0.13±0.02	0.09±0.01	0.05±0.007	0.05±0.002	0.06±0.005
	E	0.73±0.02*	0.53±0.04	0.15±0.02	0.09±0.01	0.07±0.01	0.08±0.02	0.13±0.04*
Ctx2-Rad	Control	0.45±0.1	0.5±0.1	0.2±0.05	0.1±0.02	0.05±0.004	0.05±0.01	0.06±0.02
	NSE	0.32±0.1	0.3±0.1	0.07±0.01	0.06±0.01	0.04±0.002	0.04±0.001	0.04±0.001
	E	0.53±0.1	0.42±0.08	0.12±0.03	0.08±0.02	0.06±0.01	0.07±0.03	0.11±0.04
Ctx2-LM	Control	0.38±0.1	0.43±0.1	0.17±0.04	0.1±0.01	0.05±0.004	0.05±0.01	0.06±0.02
	NSE	0.35±0.09	0.33±0.06	0.09±0.005	0.08±0.01	0.05±0.007	0.04±0.001	0.04±0.001
	E	0.42±0.09	0.35±0.07	0.12±0.03	0.07±0.02	0.05±0.01	0.07±0.03	0.1±0.04
Ors-Pyr	Control	0.3±0.1	0.38±0.09	0.35±0.1	0.25±0.1	0.11±0.04	0.08±0.03	0.08±0.04
	NSE	0.57±0.2	0.54±0.2	0.47±0.1	0.35±0.1	0.17±0.09	0.06±0.009	0.04±0.004
	E	0.69±0.08*	0.65±0.09	0.5±0.1	0.39±0.1	0.26±0.08	0.14±0.04	0.11±0.04
Ors-Rad	Control	0.32±0.1	0.37±0.1	0.32±0.09	0.26±0.1	0.15±0.05	0.13±0.08	0.13±0.09
	NSE	0.46±0.1	0.39±0.1	0.3±0.1	0.24±0.1	0.14±0.09	0.05±0.008	0.04±0.002
	E	0.55±0.1	0.5±0.1	0.42±0.1	0.32±0.1	0.17±0.05	0.1±0.03	0.11±0.04
Ors-LM	Control	0.25±0.09	0.27±0.05	0.2±0.08	0.17±0.08	0.14±0.06	0.13±0.08	0.14±0.09
	NSE	0.43±0.1	0.34±0.08	0.22±0.05	0.17±0.03	0.09±0.03	0.05±0.009	0.04±0.005
	E	0.44±0.1	0.36±0.1	0.36±0.08	0.26±0.06	0.15±0.03	0.09±0.02	0.1±0.04
Pyr-Rad	Control	0.59±0.1	0.62±0.1	0.57±0.1	0.53±0.1	0.29±0.1	0.11±0.02	0.08±0.04
	NSE	0.52±0.1	0.58±0.1	0.39±0.1	0.34±0.1	0.19±0.07	0.06±0.007	0.04±0.002
	E	0.64±0.1	0.59±0.1	0.47±0.1	0.33±0.09	0.16±0.04	0.1±0.04	0.11±0.05
Pyr-LM	Control	0.43±0.09	0.44±0.09	0.43±0.1	0.43±0.1	0.24±0.08	0.09±0.02	0.08±0.04
	NSE	0.46±0.1	0.39±0.1	0.28±0.08	0.24±0.06	0.12±0.06	0.05±0.07	0.04±0.001
	E	0.5±0.1	0.43±0.1	0.4±0.09	0.27±0.07	0.15±0.03	0.09±0.03	0.1±0.04
Rad-LM	Control	0.59±0.1	0.58±0.1	0.51±0.1	0.53±0.1	0.37±0.1	0.19±0.09	0.15±0.1
	NSE	0.47±0.1	0.41±0.1	0.27±0.1	0.21±0.06	0.1±0.04	0.05±0.005	0.04±0.001
	E	0.61±0.1	0.59±0.1	0.55±0.1	0.42±0.1	0.26±0.08	0.15±0.05	0.11±0.05

NSE: non-status epilepticus; E: epileptic animals

\*p&lt;0.05; \*difference from control group; \*\* difference from control and NSE groups.



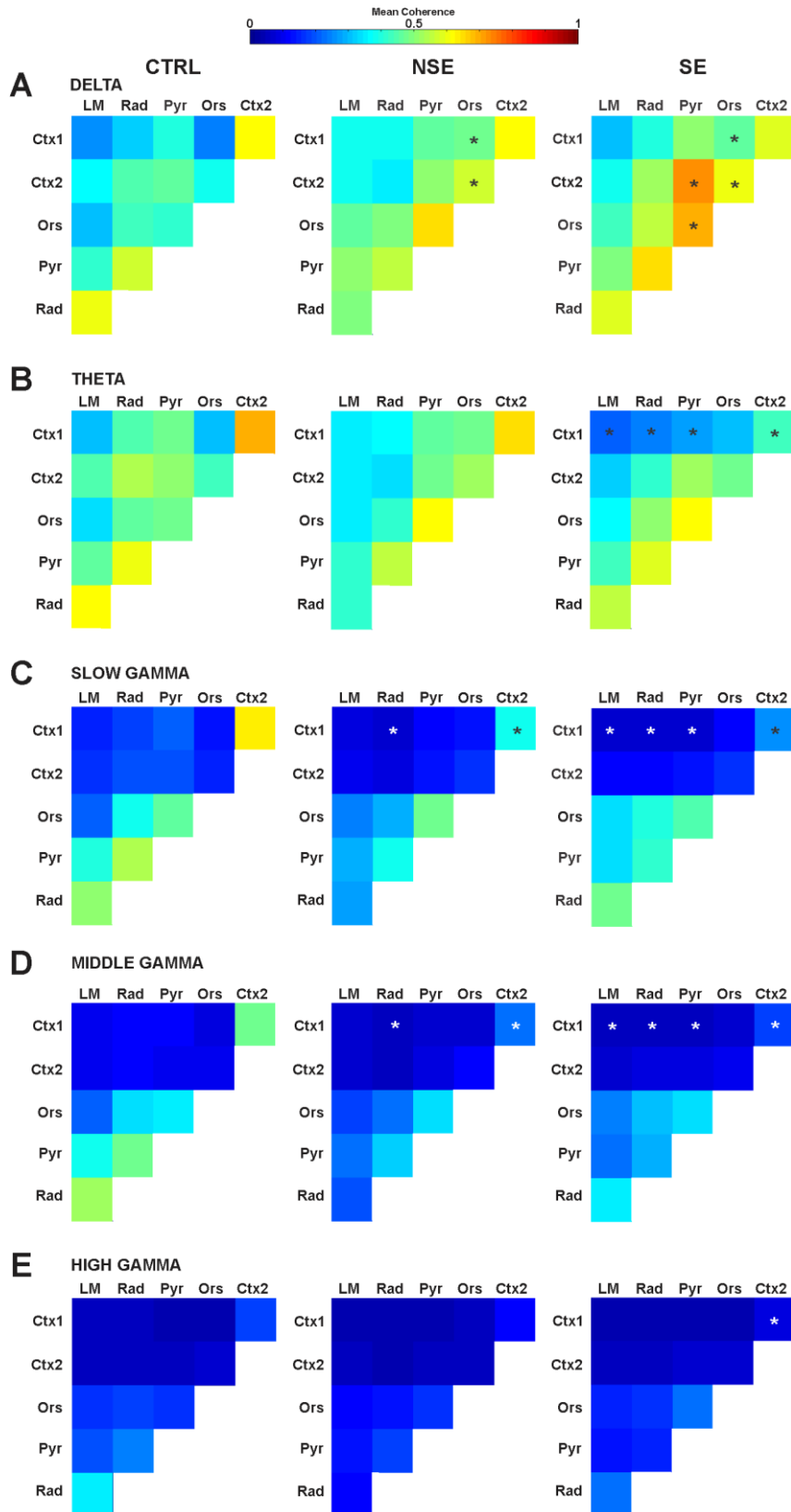


Figure 4 Phase coherence matrices from control, NSE and E groups. The x and y axis represent the electrodes, and the colors represent the mean coherence in the analyzed frequency band. Warmer colors represent higher coherence. (A) Delta (1-4 Hz), (B) theta (4-12 Hz), (C) slow gamma (30-50 Hz), (D) middle gamma (50-90 Hz) and (E) fast gamma (90-150 Hz). \*Differences from control group,  $p < 0.05$  (One-Way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test). NSE: non-status epilepticus; E: epileptic animals.

### 2.3 Cross-frequency coupling

Another way to characterize synchrony states in neuronal networks is to measure the phase-amplitude coupling between oscillations of different frequencies. We next evaluated the coupling strength between the phase of delta and the amplitude of higher frequencies (30-400 Hz), as assessed by the modulation index (MI) (Tort et al., 2010). Epileptic animals presented a stronger coupling in Rad (Figures 5A, C), when compared to control and NSE groups. The mean MI for each group and recorded layer is shown in Table 3.

Analyzing delta frequency as the phase modulator, we found an increase in the MI (i.e., stronger coupling) in Ctx2 of epileptic animals when compared to other groups, with delta phase significantly modulating the amplitude of slow gamma (Table 3). Epileptic animals had higher delta-fast gamma coupling in LM compared to control group (Figure 5B, D).

In the Rad, epileptic animals had higher delta-slow gamma coupling compared to control group and stronger delta-middle gamma and delta-fast gamma coupling than NSE and controls (Figure 5A, C and Table 3).

The MI of delta-ripples and delta-fast ripples coupling were higher in Ctx2, Ors, Rad and LM of epileptic when compared to NSE and control animals. In the Pyr electrode, only delta-ripples coupling was higher in the epileptic group (Table 3).

Taking together, the data suggest an increase in synchrony, particularly in *stratum radiatum*, where epileptic animals had a stronger delta coupling with all other frequencies.

Table 3 – PAC between delta and faster oscillations.

Electrode	Group	Delta-Slow Gamma	Delta -Middle Gamma	Delta -High Gamma	Delta -Ripples	Delta -Fast Ripples
Ctx 1	Control	$3.6 \times 10^{-04} \pm 3.41 \times 10^{-05}$	$3.1 \times 10^{-04} \pm 8.1 \times 10^{-05}$	$3.0 \times 10^{-04} \pm 5.9 \times 10^{-05}$	$1.7 \times 10^{-04} \pm 7.4 \times 10^{-06}$	$8.6 \times 10^{-05} \pm 7.4 \times 10^{-06}$
	NSE	$4.4 \times 10^{-04} \pm 5.6 \times 10^{-05}$	$1.8 \times 10^{-04} \pm 1.1 \times 10^{-04}$	$2.3 \times 10^{-04} \pm 3.1 \times 10^{-05}$	$1.9 \times 10^{-04} \pm 1.7 \times 10^{-05}$	$1.1 \times 10^{-04} \pm 7.9 \times 10^{-06}$
	E	$3.5 \times 10^{-04} \pm 2.6 \times 10^{-05}$	$3.3 \times 10^{-04} \pm 7.6 \times 10^{-05}$	$2.9 \times 10^{-04} \pm 3.3 \times 10^{-05}$	$1.8 \times 10^{-04} \pm 1.0 \times 10^{-05}$	$8.4 \times 10^{-05} \pm 7.5 \times 10^{-06}$
Ctx 2	Control	$3.7 \times 10^{-04} \pm 1.5 \times 10^{-05}$	$4.4 \times 10^{-04} \pm 2.6 \times 10^{-05}$	$4.6 \times 10^{-04} \pm 6.3 \times 10^{-05}$	$2.1 \times 10^{-04} \pm 2.1 \times 10^{-05}$	$9.4 \times 10^{-05} \pm 8.8 \times 10^{-06}$
	NSE	$3.5 \times 10^{-04} \pm 2.9 \times 10^{-05}$	$2.0 \times 10^{-04} \pm 7.4 \times 10^{-05}$	$2.8 \times 10^{-04} \pm 3.9 \times 10^{-05}$	$2.0 \times 10^{-04} \pm 9.8 \times 10^{-06}$	$7.3 \times 10^{-05} \pm 2.0 \times 10^{-06}$
	E	$5.2 \times 10^{-04} \pm 5.1 \times 10^{-05}^{**}$	$4.8 \times 10^{-04} \pm 9.5 \times 10^{-05}$	$4.3 \times 10^{-04} \pm 1.1 \times 10^{-04}$	$3.5 \times 10^{-04} \pm 6.4 \times 10^{-05}^{**}$	$1.8 \times 10^{-04} \pm 4.5 \times 10^{-05}^{**}$
Ors	Control	$4.5 \times 10^{-04} \pm 5.5 \times 10^{-05}$	$4.5 \times 10^{-04} \pm 9.2 \times 10^{-05}$	$4.2 \times 10^{-04} \pm 1.0 \times 10^{-04}$	$2.0 \times 10^{-04} \pm 5.1 \times 10^{-06}$	$9.0 \times 10^{-05} \pm 1.1 \times 10^{-05}$
	NSE	$4.2 \times 10^{-04} \pm 8.7 \times 10^{-05}$	$2.7 \times 10^{-04} \pm 6.3 \times 10^{-05}$	$6.5 \times 10^{-04} \pm 2.6 \times 10^{-04}$	$2.1 \times 10^{-04} \pm 2.7 \times 10^{-05}$	$8.6 \times 10^{-05} \pm 7.6 \times 10^{-06}$
	E	$5.1 \times 10^{-04} \pm 7.0 \times 10^{-05}$	$6.1 \times 10^{-04} \pm 8.8 \times 10^{-05}$	$4.4 \times 10^{-04} \pm 8.2 \times 10^{-05}$	$3.1 \times 10^{-04} \pm 4.7 \times 10^{-05}^{**}$	$1.8 \times 10^{-04} \pm 5.5 \times 10^{-05}^{**}$
Pyr	Control	$4.2 \times 10^{-04} \pm 6.9 \times 10^{-05}$	$4.3 \times 10^{-04} \pm 1.4 \times 10^{-04}$	$4.8 \times 10^{-04} \pm 1.1 \times 10^{-04}$	$1.9 \times 10^{-04} \pm 1.9 \times 10^{-05}$	$9.6 \times 10^{-05} \pm 1.2 \times 10^{-05}$
	NSE	$4.9 \times 10^{-04} \pm 6.8 \times 10^{-05}$	$2.6 \times 10^{-04} \pm 1.1 \times 10^{-04}$	$6.0 \times 10^{-04} \pm 2.3 \times 10^{-04}$	$1.9 \times 10^{-04} \pm 1.7 \times 10^{-05}$	$8.5 \times 10^{-05} \pm 7.3 \times 10^{-06}$
	E	$4.0 \times 10^{-04} \pm 2.7 \times 10^{-05}$	$5.5 \times 10^{-04} \pm 9.1 \times 10^{-05}$	$5.1 \times 10^{-04} \pm 1.0 \times 10^{-04}$	$2.9 \times 10^{-04} \pm 3.9 \times 10^{-05}^{**}$	$1.3 \times 10^{-04} \pm 2.6 \times 10^{-05}$
Rad	Control	$4 \times 10^{-04} \pm 2.5 \times 10^{-05}$	$4.4 \times 10^{-04} \pm 1.3 \times 10^{-04}$	$4.7 \times 10^{-04} \pm 1.3 \times 10^{-04}$	$2.0 \times 10^{-04} \pm 1.5 \times 10^{-05}$	$9.3 \times 10^{-05} \pm 1.9 \times 10^{-05}$
	NSE	$5.7 \times 10^{-04} \pm 1.2 \times 10^{-04}$	$3.0 \times 10^{-04} \pm 9.4 \times 10^{-05}$	$7.0 \times 10^{-04} \pm 2.9 \times 10^{-04}$	$1.8 \times 10^{-04} \pm 1.5 \times 10^{-05}$	$8.1 \times 10^{-05} \pm 8.3 \times 10^{-06}$
	E	$6.6 \times 10^{-04} \pm 8.1 \times 10^{-05}^*$	$1.4 \times 10^{-03} \pm 2.1 \times 10^{-04}^{##}$	$9.7 \times 10^{-04} \pm 2.3 \times 10^{-04}^{**}$	$4.2 \times 10^{-04} \pm 6.0 \times 10^{-05}^{##}$	$1.8 \times 10^{-04} \pm 3.4 \times 10^{-05}^{**}$
LM	Control	$6 \times 10^{-04} \pm 1.2 \times 10^{-04}$	$4.8 \times 10^{-04} \pm 1.1 \times 10^{-04}$	$3.6 \times 10^{-04} \pm 6.9 \times 10^{-05}$	$2.4 \times 10^{-04} \pm 2.8 \times 10^{-05}$	$9.4 \times 10^{-05} \pm 8.3 \times 10^{-06}$
	NSE	$5.4 \times 10^{-04} \pm 1.5 \times 10^{-04}$	$2.5 \times 10^{-04} \pm 1.5 \times 10^{-04}$	$6.2 \times 10^{-04} \pm 3.5 \times 10^{-04}$	$1.9 \times 10^{-04} \pm 3.8 \times 10^{-05}$	$8.5 \times 10^{-05} \pm 6.4 \times 10^{-06}$
	E	$4.9 \times 10^{-04} \pm 4.6 \times 10^{-05}$	$6.9 \times 10^{-04} \pm 1.3 \times 10^{-04}$	$7.7 \times 10^{-04} \pm 2.1 \times 10^{-04}^*$	$3.3 \times 10^{-04} \pm 8.6 \times 10^{-05}^{**}$	$1.8 \times 10^{-04} \pm 5.8 \times 10^{-05}^{**}$

NSE: non-status epilepticus; E: epileptic animals

\* $p < 0.05$ ; \*difference from control group; \*\* difference from control and NSE groups.

# $p < 0.005$ ; #difference from control group; ## difference from control and NSE groups.

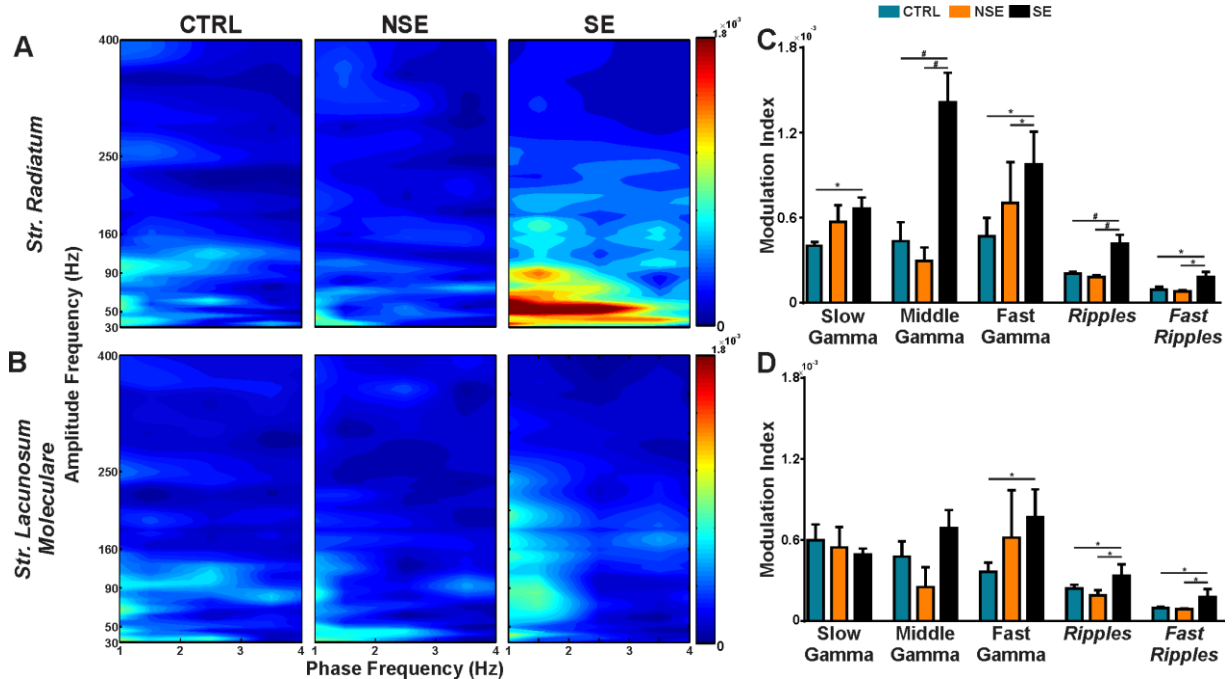


Figure 5 Representative phase-amplitude comodulograms calculated for CA1 *stratum radiatum* (A) and *lacunosum-moleculare* (B). Warmer colors indicate higher Modulation Index (MI). (C) Mean MI for the coupling of delta phase and the amplitude of different higher-frequencies in CA1 *stratum radiatum* and (D) *lacunosum-moleculare*, as labeled. Data in (C) and (D) is presented as mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.005$  (One-Way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test). NSE: non-status epilepticus; E: epileptic animals.

### 3 DISCUSSION

In this work, we demonstrate that cortical and hippocampal oscillations recorded during interictal periods without IES in SE animals with SRS (epileptic animals), or during basal periods in NSE animals without SRS, display characteristic modifications in power, coherence and cross-frequency coupling.

Focal intermittent delta activity is a common EEG finding in focal epilepsies (BRIGO, 2011; VECCHIO et al., 2016), and the increment in delta power on EEG has been reported at the seizure onset zone (AMIRI; FRAUSCHER; GOTMAN, 2016) and in the extra focus sites at the beginning of focal seizures in humans (NAFTULIN et al., 2018; PELLEGRINO et al., 2017). These features of increased delta activity has been pointed out as a useful biomarker of the epileptogenic zone, and could be used to predict the seizure onset zone by computational models (NISSEN et al., 2018). Likewise, here we show that during the interictal period, epileptic animals exhibited increased delta power in cortical (Ctx1 and Ctx2) and CA1 layers (Ors, Rad and LM). However, it has been reported significant decrease in neuronal connectivity in animals injected with pilocarpine even prior to the onset of SE (WANG et al., 2012), and studies have been demonstrated that NSE after pilocarpine injection have late onset and low frequency of spontaneous recurrent seizures (NAVARRO MORA et al., 2009). Here we were unable to detect SRS in the NSE animals. That observation could be attributed to the short period of follow-up of 1 month after pilocarpine. However, it is important to mention that the NSE animals in our study also exhibited increased delta power but only at the most superficial layers of the cortex (Ctx1), suggesting a certain degree of cortical alterations leading to cortical network reorganization in these animals. Unfortunately, we did not have access to late long-term video-EEG monitoring

equipment for the study. Thus, these findings reinforce the importance of including NSE animals in the study of epileptogenesis in pilocarpine-induced epilepsy.

Theta power is shown to be decreased in CA1 area immediately after IES in the pilocarpine rat model of epilepsy, during both the latent and chronic stages (FU et al., 2018). This effect may be sustained during prolonged in between-spike periods. Indeed, this was observed in the anterior hippocampus and entorhinal cortex of patients with MTLE during quiet wakefulness (FU et al., 2018). In our work, cortical and CA1 theta power was reduced in both epileptic and NSE animals. Interestingly, in the epileptic animals, theta power was significantly lower in the Ors. The theta rhythm is known to be correlated to cognitive processes (CHAUVIERE et al., 2009) and the decrease in theta power in the hippocampus could be related to the cognitive impairment reported in MTLE (CHAUVIERE et al., 2009; INOSTROZA et al., 2013; KRALIK et al., 2018). The decreased theta power in Ors could be related with changes in synaptic and firing properties of dendrite-inhibiting lacunosum-moleculare interneurons, leading to loss of theta activity in the hippocampus as previously reported in animal model of MTLE (DUGLADZE et al., 2007).

Parvalbumin (PV) expressing interneurons are essential to coordinate gamma oscillations (CARDIN et al., 2009), and specific stimulation of PV interneurons increases oscillatory activity only at the gamma frequency (SOHAL et al., 2009). It has been shown that the firing rate of PV-expressing interneurons at CA1 pyramidal cell layer decreases prior to seizure initiation (TOYODA et al., 2015), indicating that these cells may have different firing pattern in this layer in epilepsy. This could be pointed as the basis of the rhythmopathy and network modification in MTLE (JIANG; LACHANCE; ROSSIGNOL, 2016; LOPEZ-PIGOZZI et al., 2016). Here we show that the epileptic animals, exhibited decreased power of gamma oscillations in the cortical layers and

Ors. Therefore this reduction could be related to the known altered firing pattern of PV-expressing interneurons in MTLE (LOPEZ-PIGOZZI et al., 2016).

We were unable to detect significant differences in HFOs in the epileptic animals when compared with other groups. It is important to mention that HFOs are usually associated with IES (SALAMI et al., 2014), and our analyses focused on interictal activity in the absence of IES. In addition, a recent study shown that the power of HFOs varies during the epileptogenic process, with a reduction around 5 weeks after SE (LI et al., 2018), with coincides with the time of our analysis.

Next, we investigated the phase coherence, a measure that reflects synchronized activity between electrodes in distinct brain regions in specific frequency bands (HORWITZ, 2003). The epileptic animals had significantly increased delta coherence between cortical and CA1 hippocampal layers, and decreased theta and gamma phase coherence between Ctx1 and other areas (except Ors). NSE animals had increased delta coherence but only between both cortical regions (Ctx1/Ctx2) and Ors, and decreased slow and middle gamma phase coherence between both cortical regions and Ctx1-Rad. An decrease in gamma coherence has also been reported to be related to epileptiform events in the kainic model of MTLE (MEIER et al., 2007). Moreover, reduced coordination of theta oscillations had been reported in other hippocampal areas such as between CA1 and dentate gyrus in animal model of MTLE, and it was pointed as a potential substrate for episodic-like memory dysfunction in this type of epilepsy (INOSTROZA et al., 2013).

Although we and others (TEJADA et al., 2010) reported altered coherence between cortical and hippocampal layers in animal model MTLE model, the mechanisms leading to phase coherence alterations in epilepsy are not fully understood. Since we observed an increase in power and phase coherence only in

the delta band, our findings suggest that delta frequencies could play an important role in the increased synchronization during the interictal periods of epileptic animals. Phase-amplitude coupling (PAC) is related to the dynamics of network excitability in neuronal assemblies in gamma ranges (BUZSÁKI; WANG, 2012). Using slow waves as phase modulators, increased PAC between slow waves (<1Hz) and the gamma-ripples band (50–180 Hz) was reported in CA3 (SAMIEE et al., 2018b) and in deep sleep in the seizure onset zones of patients with focal epilepsies (AMIRI; FRAUSCHER; GOTMAN, 2016). PAC between the phase of low frequencies (<10Hz) and the amplitude of higher frequencies (>10Hz) is shown to be increased at the onset of the seizure, being maximum at the mid-seizure period and gradually weakened as seizure ends in patients with MTLE (ZHANG et al., 2017). In addition, delta-modulated HFOs can be used to identify epileptic zones, helping to choose the sites of surgical resection in patients with extra temporal lobe epilepsies (GUIRGIS et al., 2015). However, there is no information about PAC in different cortical and hippocampal layers during the interictal period. Here, the analyses of delta frequency as the phase modulator revealed an increase in MI for delta-slow gamma, ripples and fast ripples in Ctx2 of epileptic animals. However, in CA1 the most significant differences were observed in *stratum radiatum* (Rad), where the epileptic animals displayed significantly higher coupling between delta phase and the amplitude of all analyzed frequencies. Although we found a significant increase in MI in epileptic animals compared to control and NSE groups, especially in CA1 *stratum radiatum*, the values are too small and need to be interpreted with caution. Yet, it is undeniable that epileptic animals presented higher delta coupling with slow, middle and fast gamma bands, while NSE animals had no changes in PAC. Therefore, this finding strengthens the hypothesis

that PAC could be related to the epileptogenic process, reflecting an increased synchronized state seen in CA1 *stratum radiatum*.

## 4 CONCLUSIONS

Taking together, our data suggest an increase in synchrony in the cortex and CA1 in epileptic animals, particularly in delta frequency in cortical areas, as shown by higher delta power and coherence and stronger delta coupling with all other frequencies in CA1 *stratum radiatum*. Such alterations suggest that the *stratum radiatum* could be an important site of synchronization in the hippocampus, and future studies should draw the attention to the cellular and molecular mechanisms involved in this interictal synchronicity to understand better the epileptogenesis processes.

## 5 EXPERIMENTAL PROCEDURE

### 5.1 Animals

Adult male Wistar rats (40-50 days old; 150-200 g) were obtained from the Animal Facility of the Biochemistry Department at UFRGS. Animals were housed in 65x25x15 cm Plexyglass cages (2-3 animals per cage before surgery and one per cage after electrode implantation), in an acclimatized room (22–26°C), with a 12-h light/dark cycle. The animals had access to water and food *ad libitum*.

All efforts were made to reduce the number of animals and to minimize their suffering. Animal procedures were performed in strict accordance with the Brazilian Society for Neurosciences (SBNeC) and the Brazilian Law on the Use of Animals (Federal Law 11.794/2008) recommendations and were approved by the Institutional Ethical Committee (CEUA UFRGS protocol no. 2727-2).



## 5.2 Status epilepticus induction

To induce *status epilepticus* (SE), the animals were injected with pilocarpine hydrochloride (360 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) 20 min after methyl scopolamine administration (1 mg/kg i.p.; Sigma-Aldrich) and then each animal was observed for 90 minutes, and the seizure behavior was scored according to the Racine scale (RACINE; GARTNER; MCINTYRE BURNHAM, 1972). SE was defined as continuous seizures with Racine score 3 to 5, with no return to lower scores for at least 5 min. The SE was ended after 90 min using diazepam (10 mg/kg, i.p; Teuto). Control animals received methyl scopolamine injection followed by a similar volume of saline (control group).

Previous studies show that 30 days after pilocarpine administration animals that had SE presented SRS, with a mean latent period to develop of 14.8 days (CURIA et al., 2008), so as we observed clinically a consisted occurrence of SRS at the period after 30 post-SE we chose this time point for the EEG analysis. SRS occurred in all animals that had SE and survived until 30 days after pilocarpine administration. We detected the later presence of SRS in the SE animals by clinical manifestation and video prior to electrode implantation. Unfortunately, we did not have access to continuous video monitoring equipment for the study for all animals before electrode implantation and continuous video-EEG monitoring equipment for the study for all animals after electrodes implantation, therefore, we could only carry out limited periods of observation. However, underestimation of the number of seizures would not influence our findings.

We divided pilocarpine-injected animals into two groups: rats that presented SE and developed SRS (epileptic group) and rats without SE and without SRS (NSE group). Animals were considered epileptic (epileptic group) when at least two spontaneous recurrent seizures (SRS) were visually observed during a period of one

month after the SE induction. The NSE did not developed SRS during at least one month after pilocarpine administration.

### 5.3 Surgery

One month (30 days) after SE induction, control (n=5), NSE (n=4), and SE animals with SRS (epileptic animals) (n=6) were anesthetized with ketamine/xylazine (100 mg/kg/10 mg/kg, i.p.) for electrodes implantation. The electrode matrix was handmade with a wall magnifying glass, printed guides and Omnetics connectors. Eight electrodes (platinum 10% iridium, 20  $\mu$ m, California Fine Wire Co.) were implanted in the left hemisphere. Electrodes were aligned and vertically spaced by 200  $\mu$ m, spanning from parietal associative cortex (layer IV) to CA1 *stratum lacunosum moleculare* (deepest electrode in AP: -3.8 mm, ML: -1.5 mm, DV: -3.0 mm). A silver wire electrode placed in the subdural frontal area was used as reference and two screws were placed in the parietal bone for fixation. After surgery, each animal was placed in an individual Plexiglass cage for recovery and received analgesics and anti-inflammatory (Meloxicam, 1 mg/kg i.p) every 24 hours for 5 days.

### 5.4 Local field potential recordings

Seven days after electrode implantation (37 days – about 5 weeks- after pilocarpine or saline administration), each animal (from Control, epileptic and NSE groups) was transferred to the observation box (50 cm x 50 cm) and the electrodes were connected to a video-EEG system (MAP-32, Plexon, Inc.). We recorded local field potentials (LFPs) in freely moving animals during 3-6 days/1-6 h per day. LFP signals were filtered at 0.01-500 Hz followed by digitalization at 1 kHz for posterior analysis. Representative traces and the position of 6 electrodes are shown in Figure

1. Unfortunately, we did not have access to continuous video-EEG monitoring equipment for the study, and could only carry out limited periods of observation. However, underestimation of the number of seizures would not influence our findings.

## 5.5 Histology

At the end of the experiments, histology was made only to confirm the position of electrodes. Each animal was anesthetized with ketamine/xylazine (100 mg/kg/10 mg/kg, i.p.), the brain was removed, left overnight in PFA 4 % and then stored in 30% sucrose solution. Brain sections (200  $\mu$ m) were cut in vibratome (VTS-1000, Leica), stained with hematoxylin-eosin and mounted in slides. Electrode position was confirmed by light microscopy.

## 5.6 Data Analysis

We used custom-written and built-in routines in MATLAB (MathWorks) for all analysis. We analyzed the signal from 6 of 8 implanted electrodes due to technical issues (2 cortical electrodes, cortical layers IV (Ctx1) and V-VI (Ctx2), and four in the CA1 region of hippocampus: *stratum oriens* (Ors), *pyramidale* (Pyr), *radiatum* (Rad) and *lacunosum-moleculare* (LM); Figure 1). For each animal, we analyzed 1 min epochs separated by at least 30 min. In all epochs, the animals were in awake immobility, confirmed by video analysis. For the epileptic group, the data was selected at least 2 hours away from an epileptic seizure and with no interictal spikes. Besides that, we used epochs from different recording days, to ensure that the alterations were persistent and really presented differences between groups. NSE and control animals did not exhibit any seizure at all. We used on average 10 epochs per animal for the control group, 10 for the NSE group and 15 for the epileptic group, in order to have a

better sampling of the interictal period. The mean off all epochs of each animal was obtained and then, comparisons were made using each animal as a sample, with 5 animals in Control group, 4 animals in NSE group and 6 animals in the epileptic group.

## 5.7 Spectral Analysis

We computed power spectral densities (PSD) using the *pwelch.m* function (Signal Processing Toolbox). Phase coherence was computed using *mscohere.m* (Signal Processing Toolbox). Both calculations were carried out using 4-s Hamming windows with 50% overlap. The frequency bands were separated in: delta (1-4 Hz), theta (4-12 Hz), slow gamma (30-50 Hz), middle gamma (50-90 Hz), and HFO including fast gamma (90-150 Hz), ripples (160-250 Hz) and fast ripples (250-400 Hz). For each epoch, we normalized the PSD by dividing the mean power in each frequency band by the mean power of all frequency bands in each epoch, what was called Power Ratio (Figures 2 and 3).

## 5.8 Phase-amplitude coupling and comodulation maps

Phase-amplitude coupling (PAC) was calculated using the Modulation Index (MI) (TORT et al., 2008). This index measures coupling strength between two frequency ranges of interest: a phase-modulating (in our case delta or theta) and an amplitude-modulated frequency (slow, middle and fast gamma, ripples and fast ripples). The comodulation map was obtained by computing the MI of several frequency band pairs and expressing the results in a two-dimensional pseudocolor plot: the x-axis represents phase-modulating bands and the y-axis the amplitude-modulated frequency bands. The color represents the intensity of coupling, with red denoting stronger coupling.

## **5.9 Statistics**

Data were confirmed as normal by the Kolmogorov-Smirnov test, and we thus used One-Way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test. Differences between groups were considered significant if  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Brazilian Agency CNPq (Brazilian Ministry of Science, Technology, Innovation and Communication) no. 465671/2014-4.

## **Declaration of interest**

None

## RESULTADOS COMPLEMENTARES

### 1 ATIVIDADE DA ENZIMA DESCARBOXILASE DO ÁCIDO GLUTÂMICO (GAD)

Como alterações GABAérgicas vistas na ELT podem estar relacionadas com a síntese e liberação de GABA (LILLEKER; BISWAS; MOHANRAJ, 2014; SALAZAR; TAPIA, 2015; SOUKUPOVÁ et al., 2014), realizamos a quantificação da atividade da enzima GAD para verificar se a produção do neurotransmissor GABA estaria comprometida.

#### 1.1.11.1 Métodos

A indução do modelo de pilocarpina foi realizada conforme descrito no

CAPÍTULO I Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências (SBNeC) e com a Lei Federal 11.794/2008, O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA UFRGS protocolo nº 2727-2).

A atividade da GAD foi determinada pela quantificação de GABA, produto da reação da enzima GAD com seu substrato glutamato, usando a técnica de HPLC (PASQUETTI et al., 2014). Utilizando a D-penicilamina, um inibidor da GAD, podemos obter a sua atividade através da razão entre a quantidade de GABA em uma amostra sem inibidor (atividade total) e a amostra com inibidor. Os animais foram sacrificados 30 dias após a indução por pilocarpina, como descrito no Capítulo I, o encéfalo removido e o hipocampo dissecado. O hipocampo foi homogeneizado com uma solução de fosfato de potássio 50mM, pH 6.4, com um *potter* de vidro. Nas alíquotas homogeneizadas foram adicionados glutamato 1M com ou sem a adição do inibidor

de GAD D-penicilamina 10mM (Merck, P4875). As amostras foram incubadas 2 h a 37 ° C e 0,25 mL de ácido tricloroacético 7% foi adicionado para parar a reação, seguido por centrifugação (5min, 1000 g, 4 °C). O sobrenadante foi recolhido e, em seguida, 0,1 ml de hidróxido de sódio 1 M foram adicionados para neutralizar as amostras. As amostras foram desproteinizadas com metanol 1:5, centrifugadas a 3000rpm por 10min e o sobrenadante coletado. Na técnica de HPLC, as amostras foram derivatizadas com o-ftalaldeído e a separação foi realizada através de uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC-18, 250mm×4,6mm, Supelco) em um cromatógrafo líquido Shimadzu (válvula de injeção em laço 50µL). A fase móvel fluiu a taxa de 1,4mL/min e a temperatura da coluna foi de 22°C. As composições dos tampões foram A: tampão fosfato de sódio monoidratado 0,04 mol/L, pH 5.5, contendo 20% de metanol; B: tampão fosfato de sódio monoidratado 0.01 mols/L, pH 5.5, contendo 80% de metanol. O padrão do gradiente foi modificado de acordo com o tampão B na fase móvel: 0% a 0.00 min, 25% a 13.75 min, 100% a 15.00–20.00 min, 0% a 20.01–25.00 min. A absorbância foi lida a 360nm (excitação) e 455nm (emissão) em um detector de fluorescência Shimadzu. Foram utilizados 25µL de amostra e a concentração expressa em µM/µg de proteína.

#### 2.1.11.2 Resultados e Conclusão

A atividade da GAD é estimada pela divisão entre a quantidade de GABA com e sem o inibidor D-penicilamina. Não foram encontradas diferenças significativas na atividade da GAD comparando-se animais com epilepsia induzida por pilocarpina (Grupo E:  $1,25 \pm 0,10$ ,  $n=7$ ) com os animais que não desenvolveram SE (Grupo NSE:  $1,26 \pm 0,53$ ,  $n=2$ ) e animais controle (CTRL:  $1,18 \pm 0,08$ ,  $n=6$ ) (Figura 1). Também não encontramos diferença na quantidade bruta de GABA (E:  $346,6 \pm 75$  µM/µg; NSE:

149,8±6,3  $\mu\text{M}/\mu\text{g}$  CTRL: 392,4±80  $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ ) ou glutamato (E: 65284±6478  $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ ; NSE: 44690±8843  $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ ; CTRL: 59976±5299  $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ ). Estes resultados sugerem uma possível mudança adaptativa na neurotransmissão GABAérgica mesmo com a perda de interneurônios e que as alterações do sistema inibitório estão mais relacionadas com a diminuição da população ou com alterações de conectividade dos interneurônios GABAérgicos independente da síntese de GABA.

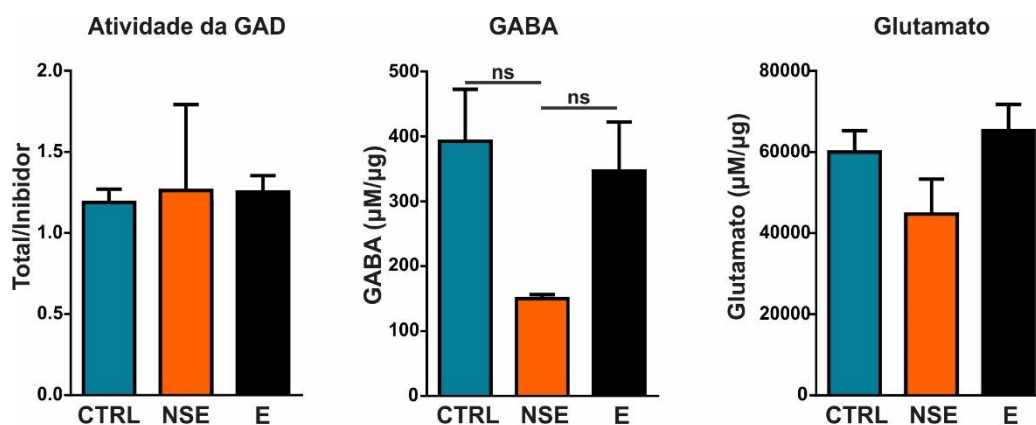


Figura 7 Atividade da GAD e quantificação de GABA e Glutamato medida por HPLC. ns: não significativo. Dados expressos como média±EPM.



## **CAPÍTULO II**

### Artigo II

#### **PERI-ICTAL OSCILLATIONS AND SEIZURE FREQUENCY MODIFIED BY GABAERGIC PRECURSOR CELLS GRAFTED INTO THE PILOCARPINE MODEL OF EPILEPSY**

O presente artigo traz os resultados referentes a análise em animais com epilepsia submetidos ao transplante de precursores da EGM, obtidos em parceria com a Prof. Dra. Beatriz Monteiro da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), que serão submetidos para publicação em revista científica internacional.

## 1 INTRODUCTION

The GABAergic system is the main inhibitory drive in the central nervous system and it is crucial for synchronization of neuronal network activity (BUZSÁKI, 2006; BUZSÁKI; WANG, 2012). Most GABAergic interneurons in the cerebral cortex and hippocampus originate from caudal and medial ganglionic eminences (MGE, CGE), and preoptic area (POA) (GELMAN; MARÍN, 2010; PELKEY et al., 2017). The temporal dynamics of GABAergic inputs are essential for oscillation patterns in the cortex and hippocampus, such as gamma rhythms (CARDIN et al., 2009; HU; GAN; JONAS, 2014; VEIT et al., 2017), which are involved in behavior and cognition processes (WOMELSDORF et al., 2007). Abnormalities in the GABAergic system lead to changes in brain oscillations and have a close relation with epileptogenesis and epileptiform activity (KHAZIPOV, 2016).

For many years, cell replacement therapies have been developed in order to restore inhibition in different type of disease based-models, such as epilepsy, by grafting interneuronal precursor cells (HSIEH; BARABAN, 2017; UPADHYA et al., 2019; ZHU; NAEGELE; CHUNG, 2018). Cell replacement studies using MGE precursors (source of parvalbumin (PV) and somatostatin (SOM)-expressing interneurons) showed that these cells are able to survive, differentiate in mature interneurons, migrate and functionally integrate within the host neuronal network, rescuing inhibition (ALVAREZ-DOLADO et al., 2006; CASALIA; HOWARD; BARABAN, 2017; UPADHYA et al., 2019; ZIPANCIC et al., 2010).

When MGE-derived GABAergic precursors are grafted into animal models of epilepsy, seizure threshold increases, frequency and duration of epileptic seizures reduce, and GABA-mediated inhibition is rescued and gamma oscillations are restored (CASALIA; HOWARD; BARABAN, 2017; HSIEH; BARABAN, 2017; PAIVA et al.,

2017). However, how MGE-grafted cells affect the abnormal neuronal network, and consequently brain oscillations, to modify seizure activity besides restoring inhibition is still unknown.

Quantitative analysis of the electroencephalogram (EEG) is a valuable tool to study fine changes in brain oscillations in epilepsy, and it has been used to understand brain synchrony alterations, either during seizures or just before the seizure onset (GAGLIANO et al., 2018; JACOBS et al., 2018; NAFTULIN et al., 2018; SAMIEE et al., 2018a). The quantitative analysis of EEG in animal models of epilepsy, such as the pilocarpine model, revealed the presence of oscillations during the pre-ictal and ictal events, characterized by low amplitude and high frequency (15–30 Hz or 30-80 Hz) oscillations, which are often found in the pre-ictal period in humans (LAGARDE et al., 2019).

Interneuronal activity is involved in the transition from the interictal to ictal state (MIRI et al., 2018; WEISS et al., 2019) and synaptic inhibition dominates synaptic excitation during this low amplitude and high frequency onset pattern (ELAHIAN et al., 2018). In addition, the post-ictal period has been associated with increased delta power, reduced spike rate and altered activity of interneurons (KRISHNAN et al., 2014; TOMLINSON et al., 2018).

Since grafted MGE cells are able to integrate in the network, recover the inhibitory system and decrease the seizure frequency in epilepsy models (GUPTA et al., 2019; HSIEH; BARABAN, 2017; ROMARIZ et al., 2017; UPADHYA et al., 2019), here we aimed to evaluate the dynamics of peri-ictal oscillations in the pilocarpine model of epilepsy grafted with MGE-derived precursors. Characterizing the peri-ictal changes in oscillations could help to understand how replacement of interneurons modifies the neural network and seizure behavior.

## 2 METHODS

### 2.1 Animals

Sprague Dawley rat embryos (E14.5) expressing enhanced green fluorescent protein (SD-Tg (GFP) 2BaIRrrc) were used to obtain the MGE cell. Grafted hosts were 8–10 weeks old, male Sprague Dawley rats. All the procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council). All protocols were approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of São Paulo (CEP 0024/12).

### 2.2 Status Epilepticus induction

Rats received methyl scopolamine (Research Biochemical International, 1 mg/kg, i.p.), followed by pilocarpine 30 min later (320 mg/kg, i.p., Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda). Only rats that developed *status epilepticus* (SE), that is, had continuous seizures stage IV or V of Racine scale (RACINE, 1972) during 90 min after pilocarpine injection, were included in the experiments. The SE was stopped 90 min after seizure onset with an injection of Tionembutal (Cristalia, 25 mg/kg, i.p.). After this procedure, the rats were transferred to their home cage. To reduce the mortality rate, the rats received daily s.c. injections of saline during 3 consecutive days.

### 2.3 Cell dissociation and transplantation

The MGE region was dissected from E14.5 GFP rat embryos and mechanically dissociated to obtain a suspension of single cells (ALVAREZ-DOLADO et al., 2006; ZIPANCIC et al., 2010). Cells were washed with DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) containing DNase I (10 mg/mL), centrifuged and resuspended in the same medium.

About 7–10 days after *SE*, the host rats were anesthetized with xylazine (10 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg). A suspension of either  $4 \times 10^5$  fresh cells in 4  $\mu$ L of DMEM–F12 (Pilo+MGE group; n=7) or 4  $\mu$ L of vehicle DMEM–F12 (Pilo group; n=7) were bilaterally injected into the hippocampal dentate gyrus of each animal (-4.0 mm AP,  $\pm$ 3.0 mm ML, -3.5 mm DV) (PAXINOS; WATSON, 2014).

## **2.4 Electrodes implantation**

Three months after transplantation, rats (from Pilo+MGE and Pilo groups) were anesthetized with xylazine (10 mg/kg) and ketamine (80 mg/kg). Rats were placed in a stereotaxic, and two pairs of EEG electrodes were implanted. The cortical EEG recordings were obtained by a pair of stainless steel screws (1.4 mm diameter) that were threaded in small burr holes in the skull, located at + 2.5 mm AP and  $\pm$  3.0 mm ML (PAXINOS; WATSON, 2014). For hippocampal LFP (local field potential) recordings, we used two stainless steel wires of 76- $\mu$ m diameter, coated with Teflon except for a 1 mm tip (304, California Fine Wire). The wires were glued together with cyanoacrylate glue. A 1 mm hole was made in the skull and the set was implanted at - 3.3 mm AP, + 2.5 mm ML, and -3.5 mm DV (PAXINOS; WATSON, 2014) and fixed again with cyanoacrylate glue. All electrodes were connected to a socket, which was fixed to the skull with dental acrylic cement. Rats received a long-acting antibiotic (2mg/kg, i.p., Pentabiotic, Fort Dodge) and an analgesic (1 mg/kg s.c., Meloxicam DCB 05619, Eurofarma, Medley Pharmaceutical) and let recover for 2 h in a warm environment. The animal care continued for approximately one week and after the recovery period, the EEG recordings were started.

## 2.5 Video EEG recording

EEG leads protected by a metal spring were connected to a slip ring that allowed free rotation to the rat. EEG pre-amplifiers were adapted from Dobrev et al. (2008). Signals were filtered (0.1 – 300 Hz band pass, 60 Hz notch filter, and an adaptive main filter) and digitized at 1000 Hz with a PowerLab data recorder and LabChart 7 software (AD Instruments, Melbourne, Australia). The EEG was recorded for 7 days, 24 h/day. During this period, an infrared camera video recording was made to permit visual confirmation of seizure behavior.

To identify potential seizures, the hippocampal recording was analyzed with sequential Fourier transformations of 1 s segments and a Hann window. Segments that fulfilled the following criteria of band of frequency at 1) 5 - 20 Hz with amplitude above 2  $\mu$ V; 2) 20 - 40 Hz band above 2  $\mu$ V; and 3) 1 – 20 Hz band above 7 Hz, were marked as a potential seizure. Additionally, potential seizures were analyzed visually to reject artifacts and seizure-like events lasting less than 5 seconds.

## 2.6 Quantitative EEG Analysis

We analyzed both cortical and hippocampal recordings of all rats that had seizures. Traces with artefacts and traces with poorly defined seizure onset or termination were excluded from the analysis. As a result, seizures were analyzed from 5 animals from the Pilo group, and 3 animals from the Pilo+MGE group.

We used custom-written and built-in routines in MATLAB (MathWorks) for all analysis. Seizure onset was determined by a persistent change in frequency and amplitude oscillation that developed into clear seizure activity; and seizure ending was determined by the abrupt cessation of large-amplitude recordings, as described previously (SAMIEE et al., 2018a; TOYODA et al., 2015). For pre-ictal analysis, we

analyzed 20 s epochs that started 5 min and 20 s prior to seizure onset. For post-ictal analysis, we analyzed 20 s epochs that started 20 s and 5 min after seizure termination. We analyzed the pre-ictal periods of 105 seizures from the Pilo group and 24 seizures from the Pilo+MGE group. We analyzed the post-ictal period of 100 seizures from the Pilo group and 23 seizures from the Pilo+MGE group.

We computed power spectral densities (PSD) using the *pwelch.m* function (Signal Processing Toolbox). Phase coherence was computed using *mscohere.m* (Signal Processing Toolbox). Both calculations were carried out using 4 s Hamming windows with 50% overlap. The analyzed frequency bands were delta (1-4 Hz), theta (4-12 Hz), slow gamma (30-50 Hz), middle gamma (50-90 Hz), fast gamma (90-150 Hz) and ripples (160-250 Hz) (VENDRAMIN PASQUETTI et al., 2019).

Phase-amplitude coupling (PAC) was calculated with the Modulation Index (TORT et al., 2010). This index measures coupling strength between two frequency ranges: a phase modulating (in our case delta or theta), and an amplitude-modulated frequency (slow, middle and fast gamma and ripples). The comodulation map was obtained by computing the modulation index of several frequency band pairs and expressing the results in a two-dimensional pseudocolor plot: the x-axis represents phase-modulating bands and the y-axis the amplitude-modulated frequency bands. The color represents the intensity of coupling, with red denoting stronger coupling.

## **2.7 Detection of GFP-expressing inhibitory interneurons**

After EEG recordings, rats were deeply anesthetized (Thioembutal 150 mg/kg i.p.) and perfused through the heart with PBS, followed by 4% paraformaldehyde. Brains were removed, dehydrated and cut with a cryostat in 30  $\mu$ m thick coronal sections. Inhibitory interneurons were identified with anti-PV antibody (P3088, Sigma-

Aldrich, 1:1000), anti-NPY (Neuropeptide Y, Sigma-Aldrich, 1:1000), and anti-CR (Calretinin, Milipore, Darmstadt, Germany, 1:1000). GFP was identified with anti-GFP antibody (A21311, Invitrogen, 1:600). Sections were washed in PBS and incubated overnight with the primary antibodies diluted in PBS. The next day, sections were washed in PBS, incubated for 2 h with fluorochrome-conjugated secondary antibodies (Alexa 488 and Alexa 546, Invitrogen), and washed again in PBS. Sections were mounted on slides and sealed with DPX. Sections were analyzed with a fluorescence microscope and capture software (Neurolucida, MBF Bioscience).

## **2.8 Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6.0.

The number of seizures between the two groups was compared with Mann Whitney's test. The percentage of animals who presented seizures was analyzed using Fisher's exact test. Differences between groups were rated significant at  $p < 0.05$ .

For EEG quantitative analysis, the Kolmogorov-Smirnov test showed that the data were not normally distributed. Therefore, differences between two EEG epochs in the same subject were compared with the Wilcoxon's matched-pairs signed rank test. Differences between two different groups at the same time were compared with Mann Whitney's test. Differences between groups were considered significant if  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

## **3 RESULTS**

### **3.1 Identification of MGE-derived cells in the host brain**

Figure 1 shows brain sections at 3 months after injection of GFP-expressing MGE cells in rats treated with pilocarpine. GFP-expressing cells were found in the CA1 and



dentate gyrus of the hippocampus co-localized with CR, PV and NPY, suggesting that transplanted cells migrated and differentiated into inhibitory interneurons in the host tissue.

Previous research from our group (ROMARIZ et al., 2017) reported that the MGE-GFP-expressing cells showed a percentage of 25.28% of inhibitory interneurons labeled by specific markers. The percentages of CR+/GFP+, PV+/GFP+ and NPY+/GFP+ cells was 5.94%, 6.96% and 12.38%, respectively.

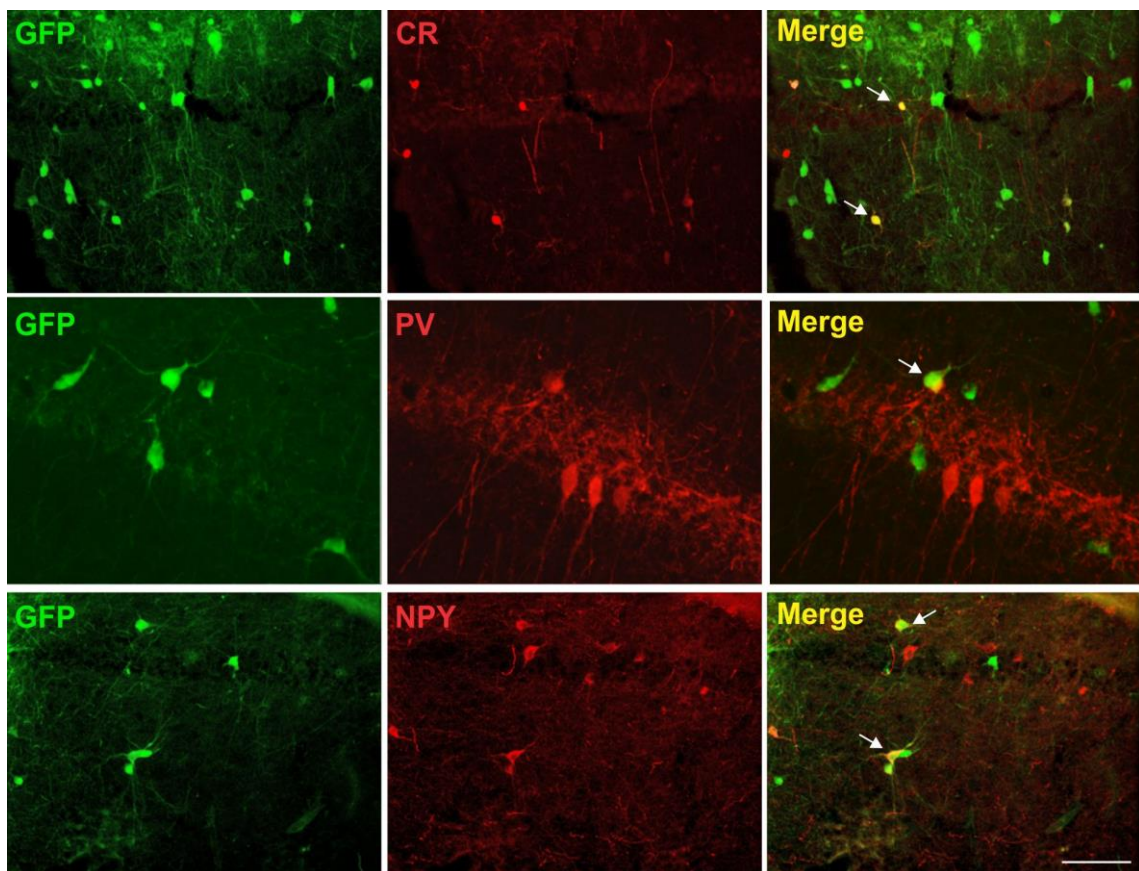


Figure 1. Fate of transplanted MGE cells, 3 months after injection into the hippocampus of rats treated with pilocarpine. MGE cells were marked with an antibody against GFP (green immunofluorescence). Inhibitory interneurons were marked with an antibody against PV, NPY and CR (red immunofluorescence). Figures at the right show co-localization of GFP and parvalbumin (yellow, indicated by arrow). Top figures show CA1 (20x), bottom figures show dentate gyrus (40x). Scale bar = 100  $\mu$ m.

### 3.2 Seizure frequency

Analysis of the EEG showed that seizure frequency was reduced in Pilo+MGE group ( $p < 0.05$ , Figure 2A). The Pilo group had  $30 \pm 10$  (mean  $\pm$  SEM) seizures in a

period of 7 days recording and the Pilo+MGE group had  $5 \pm 3$  seizures in 7 days, representing a reduction in 17% of seizure compared to Pilo group. While 86% (6 out of 7) of animals from the Pilo group presented seizures during the 7 days of EEG recording, only 43% (3 out of 7) of animals from the Pilo+MGE had seizures (Figure 2B).

EEG patterns of seizures of Pilo and Pilo+MGE were similar, with high frequency oscillations lasting more than 10 seconds (Figure 2C-D).

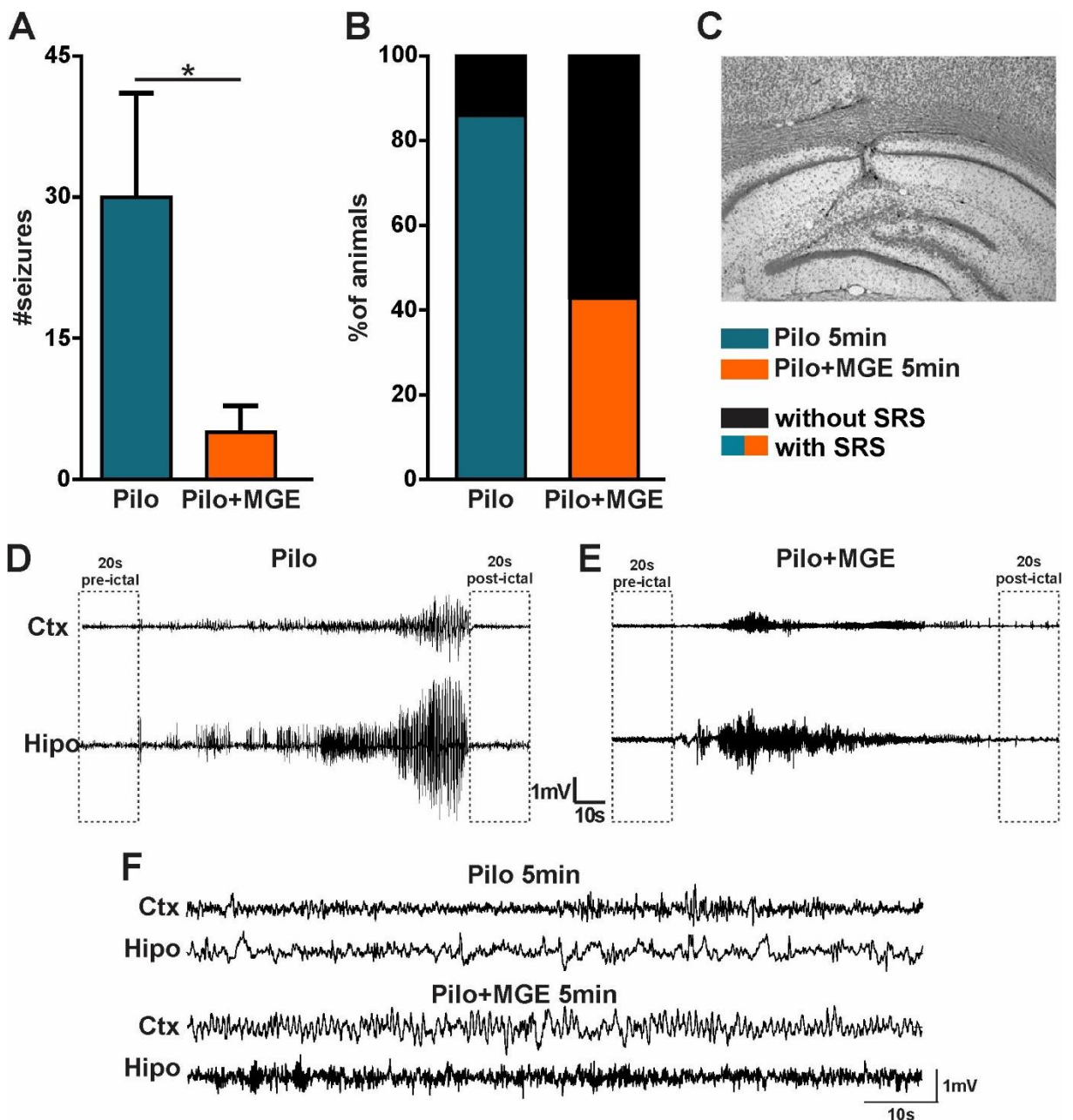


Figure 2. Effect of MGE cell transplantation on the EEG of rats treated with pilocarpine. A) Seizure frequency. Error bars indicate SEM. Both groups: n = 7. \* p < 0.05, Mann Whitney Test. B) Percentage of animals with spontaneous seizures C) Coronal section showing location of the EEG electrode in the hippocampus D) Typical seizure of Pilo group E) Typical seizure of Pilo+MGE group F) Typical interictal recording.

### 3.3 Pre-ictal EEG

In order to understand the range of variation in different frequency bands between groups, we used power spectral analysis.

In the cortex, Pilo animals presented a significant reduction in delta, theta, slow and middle gamma and ripples bands at 20s when compared to 5 min before seizure onset. The Pilo+MGE group exhibited a similar reduction of power in delta, theta and slow gamma, but an increase in the power of fast gamma and ripples (Table 1 and Figure 3). Pilo+MGE animals had lower delta, theta and fast gamma power at 5min before the seizure onset and significantly higher ripples power at 20s of seizure onset, when compared to Pilo group (Table1 and Figure 3).

Table 1 – Pre-ictal power in EEG bands

Electrode	Group	Delta	Theta	Slow Gamma
Cortex 5min	Pilo	$5.6 \times 10^{-10} \pm 9.9 \times 10^{-11} \#$	$2.9 \times 10^{-10} \pm 4.9 \times 10^{-11} \#$	$7.6 \times 10^{-12} \pm 6.7 \times 10^{-13}$
	Pilo+MGE	$3.7 \times 10^{-10} \pm 9.0 \times 10^{-11}$	$1.4 \times 10^{-10} \pm 1.4 \times 10^{-11}$	$5.9 \times 10^{-12} \pm 9.6 \times 10^{-13}$
Cortex 20s	Pilo	$4.1 \times 10^{-10} \pm 8.6 \times 10^{-11} *$	$1.7 \times 10^{-10} \pm 3.5 \times 10^{-11} *$	$3.2 \times 10^{-12} \pm 3.1 \times 10^{-13} *$
	Pilo+MGE	$1.6 \times 10^{-10} \pm 3.4 \times 10^{-11} *$	$3.7 \times 10^{-11} \pm 5.5 \times 10^{-12} *$	$3.0 \times 10^{-12} \pm 2.8 \times 10^{-13} *$
Hippo 5min	Pilo	$2.9 \times 10^{-09} \pm 3.5 \times 10^{-10} \#$	$1.2 \times 10^{-09} \pm 1.8 \times 10^{-10} \#$	$1.4 \times 10^{-11} \pm 1.9 \times 10^{-12} \#$
	Pilo+MGE	$1.8 \times 10^{-09} \pm 3.5 \times 10^{-10}$	$3.5 \times 10^{-10} \pm 5.4 \times 10^{-11}$	$4.1 \times 10^{-12} \pm 8.5 \times 10^{-13}$
Hippo 20s	Pilo	$1.5 \times 10^{-09} \pm 1.9 \times 10^{-10} *$	$4.7 \times 10^{-10} \pm 7.0 \times 10^{-11} *$	$9.6 \times 10^{-12} \pm 1.3 \times 10^{-12} *$
	Pilo+MGE	$1.3 \times 10^{-09} \pm 4.3 \times 10^{-10}$	$2.3 \times 10^{-10} \pm 5.2 \times 10^{-11}$	$4.4 \times 10^{-12} \pm 7.7 \times 10^{-13}$
Electrode	Group	Middle Gamma	Fast Gamma	Ripples
Cortex 5min	Pilo	$6.2 \times 10^{-13} \pm 3.6 \times 10^{-14}$	$8.1 \times 10^{-14} \pm 5.4 \times 10^{-15} \#$	$4.7 \times 10^{-15} \pm 5.4 \times 10^{-16}$
	Pilo+MGE	$4.9 \times 10^{-13} \pm 7.1 \times 10^{-14}$	$5.2 \times 10^{-14} \pm 5.9 \times 10^{-15}$	$3.2 \times 10^{-16} \pm 4.2 \times 10^{-17} \#$
Cortex 20s	Pilo	$4.2 \times 10^{-13} \pm 2.4 \times 10^{-14} *$	$7.6 \times 10^{-14} \pm 5.6 \times 10^{-15}$	$3.9 \times 10^{-15} \pm 4.3 \times 10^{-16} *$
	Pilo+MGE	$5.7 \times 10^{-13} \pm 7.2 \times 10^{-14}$	$1.0 \times 10^{-13} \pm 1.5 \times 10^{-14} *$	$9.7 \times 10^{-16} \pm 1.8 \times 10^{-16} *$
Hippo 5min	Pilo	$8.6 \times 10^{-13} \pm 1.5 \times 10^{-13}$	$4.8 \times 10^{-14} \pm 1.0 \times 10^{-14}$	$1.0 \times 10^{-15} \pm 1.8 \times 10^{-16}$
	Pilo+MGE	$3.5 \times 10^{-13} \pm 7.6 \times 10^{-14}$	$7.6 \times 10^{-14} \pm 1.5 \times 10^{-14}$	$3.5 \times 10^{-16} \pm 5.3 \times 10^{-17}$
Hippo 20s	Pilo	$8.2 \times 10^{-13} \pm 1.3 \times 10^{-13}$	$8.7 \times 10^{-14} \pm 1.6 \times 10^{-14}$	$1.0 \times 10^{-15} \pm 2.0 \times 10^{-16}$
	Pilo+MGE	$5.0 \times 10^{-13} \pm 1.0 \times 10^{-13} *$	$7.7 \times 10^{-14} \pm 1.8 \times 10^{-14} *$	$5.0 \times 10^{-16} \pm 9.1 \times 10^{-17} *$

#Difference between treatments at the same time; \*difference between 5 min and 20 s.

## Cortex

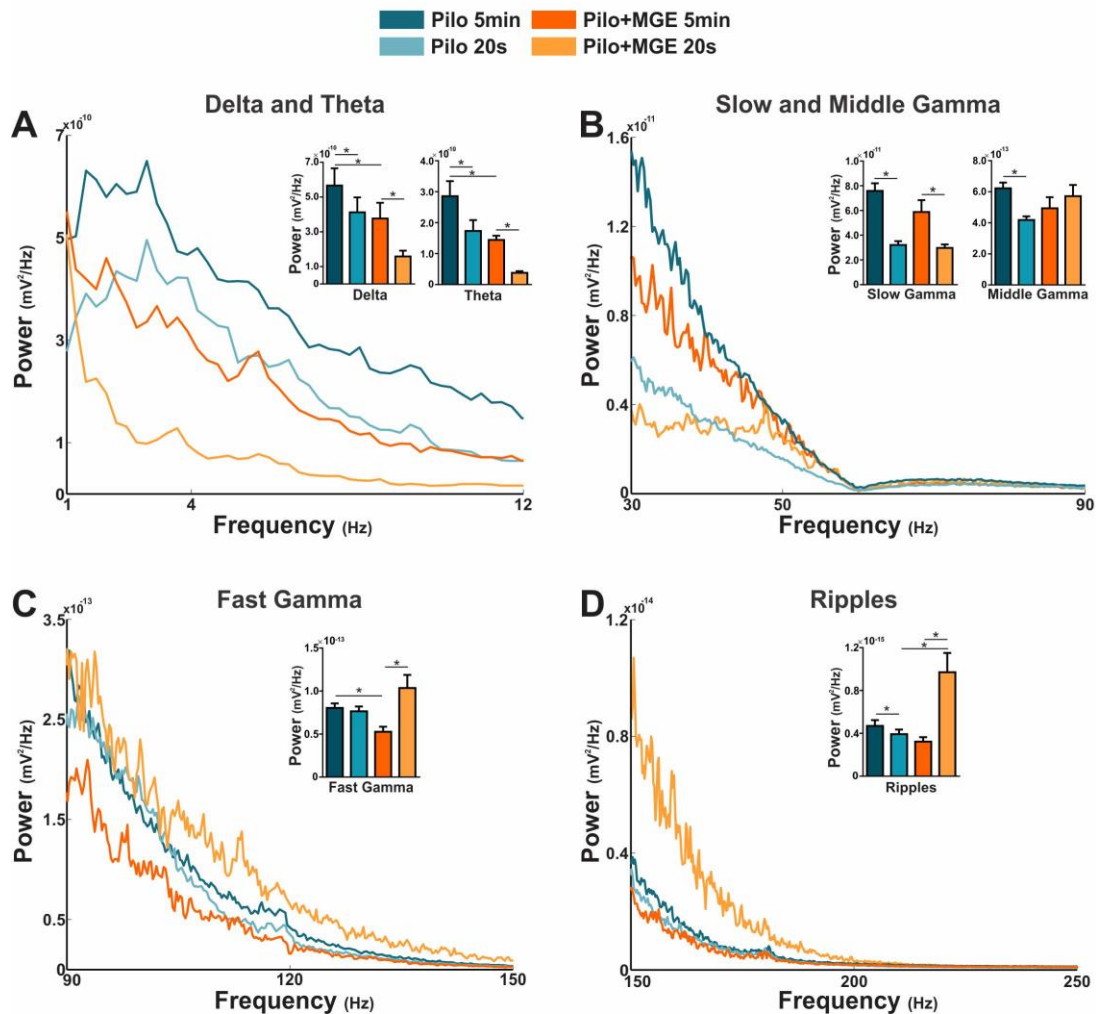


Figure 3. Power spectral densities of cortical electrode at the pre-ictal period showing differences in (A) delta and theta, (B) slow and middle gamma, (C) fast gamma and (D) ripples frequency bands. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs signed rank test, comparing 5min and 20s before seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

In the hippocampus, the Pilo group had significant reduction in power of low frequency bands (delta, theta, and slow gamma) at 20s when compared to the 5 min before seizure onset, and no significant changes in high frequency bands (middle and fast gamma and ripples). On the other hand, the Pilo+MGE group had no significant changes in delta, theta and slow gamma power, but the power of middle and fast gamma and ripples significantly increased (Table 1 and Figure 4). In addition, the

Pilo+MGE animals had lower delta, theta and slow gamma power when compared to Pilo animals at the 5 min period (Table 1 and Figure 4).

## Hippocampus

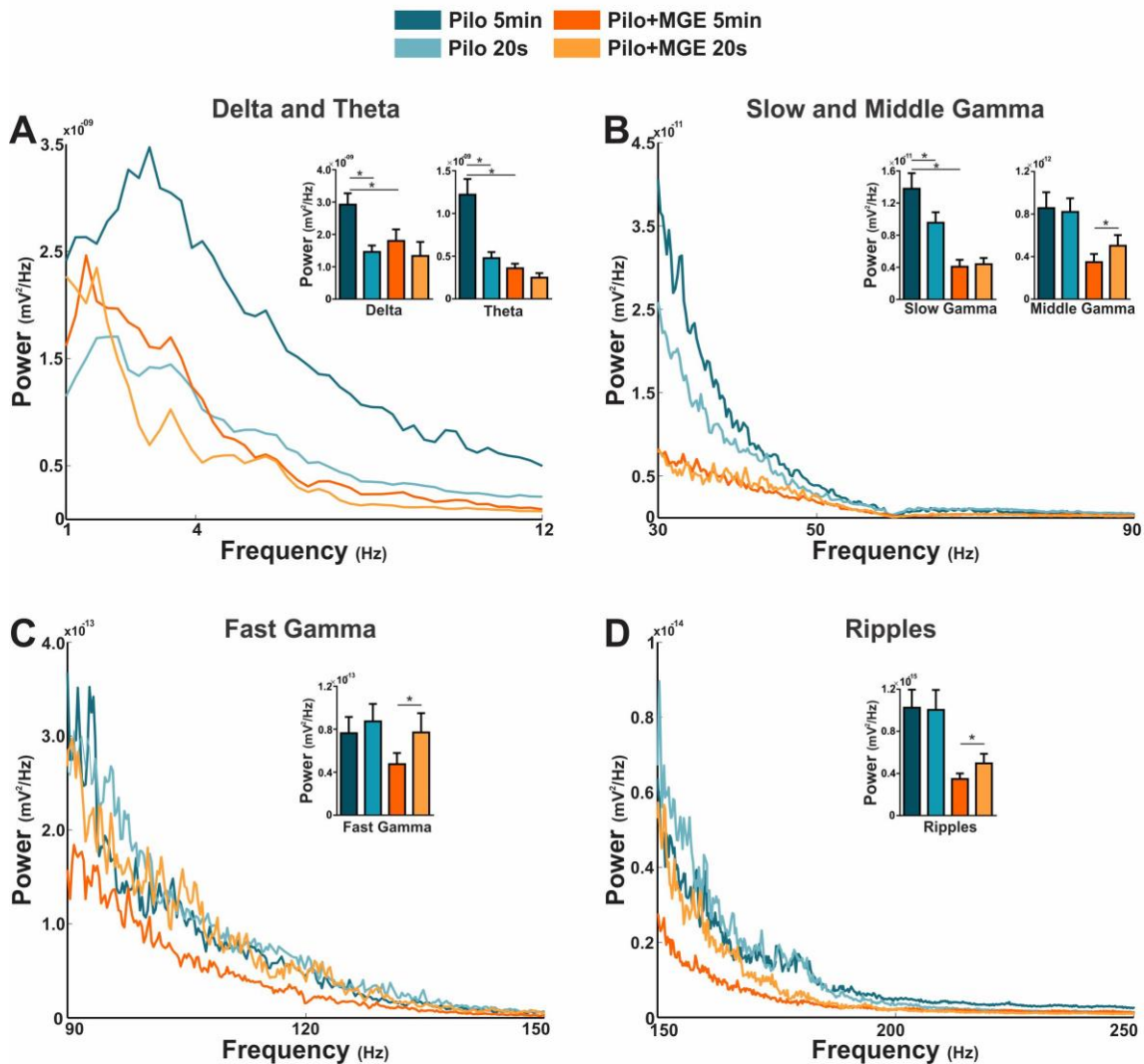


Figure 4. Power spectral densities of hippocampal electrode in pre-ictal period showing differences in (A) delta and theta, (B) slow and middle gamma, (C) fast gamma and (D) ripples frequency bands. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs signed rank test, comparing 5min and 20s before seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

Next, to examine synchronized activity between cortex and hippocampus, we performed the phase coherence analysis (HORWITZ, 2003) of specific frequency bands between these areas at 20s pre-ictal compared to 5min before seizure onset. Pilo animals presented a significant phase coherence reduction in theta band and

increase in slow gamma band. Meanwhile, Pilo+MGE animals had a significant reduction in delta and theta coherences, and an increase in slow gamma phase coherence. Comparing the 5min periods between groups, Pilo+MGE presented significant higher cortical-hippocampal phase coherence than Pilo animals in delta and theta band. No differences were found for ripples, middle and fast gamma bands (Table 2 and Figure 5).

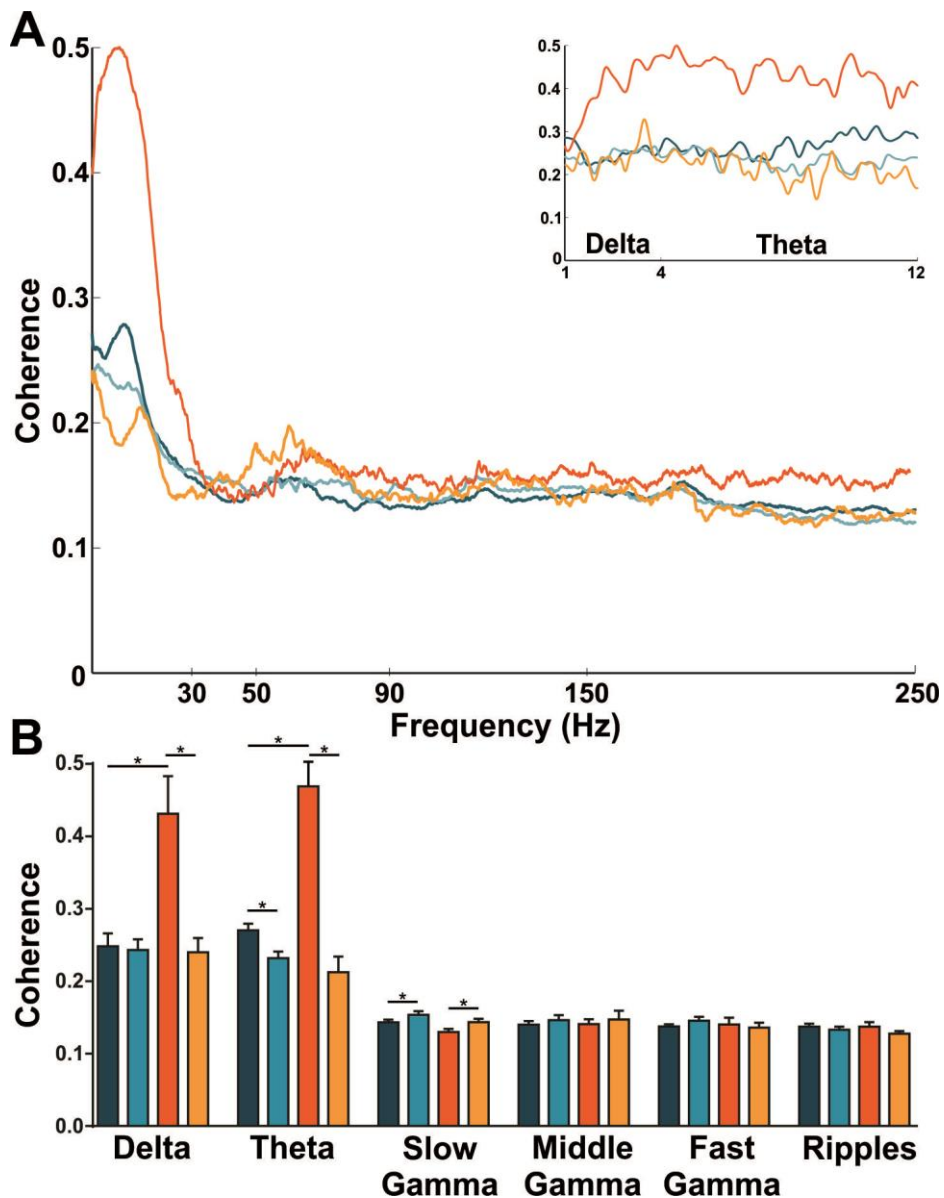


Figure 5. Phase coherence between cortical and hippocampal areas in pre-ictal period. (A) Coherence spectra from delta and theta frequency band; (B) Phase coherence in delta, theta, slow, middle and fast gamma and ripples band presented as mean  $\pm$ SEM. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs signed rank test, comparing the same seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

Table 2 – Pre-ictal phase coherence in EEG bands

Period	Group	Delta	Theta	Slow Gamma	Middle Gamma	Fast Gamma	Ripples
5min	Pilo	0.24±0.02#	0.27±0.01#	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01
	Pilo+MGE	0.43±0.05	0.46±0.05	0.13±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01
20s	Pilo	0.24±0.01	0.23±0.01*	0.15±0.01*	0.15±0.01	0.15±0.01	0.13±0.01
	Pilo+MGE	0.24±0.02*	0.21±0.02*	0.14±0.01*	0.14±0.01	0.14±0.01	0.13±0.01

#Difference between groups in the same time; \*difference between 5min and 20s.

Synchrony states in neuronal networks can also be quantified by the coupling strength between the phase of signals in a low frequency band and the amplitude of higher frequencies, the so-called phase amplitude coupling (PAC) which is quantified by the modulation index (MI) (TORT et al., 2010). Here we evaluated the coupling strength between the phase of delta or theta bands and the amplitude of higher frequencies (30-250 Hz) and report the data as MI in the tables and respective figures.

In the cortex, at 20s before seizure onset when compared to the 5min epochs, the Pilo animals had a significant weaker delta-slow, middle and fast gamma coupling. The Pilo+MGE animals had a weaker coupling for all frequencies. Therefore, synchronicity decreased just before the onset of the seizure in both Pilo and Pilo+MGE groups, since they exhibited a reduction in the MI (Figure 6A). Pilo+MGE group presented weaker coupling in delta-fast gamma and ripples 20s before seizure onset. (Table 3 and Figure 6). The MI of theta band with other frequency bands was decreased in both Pilo and Pilo+MGE groups at 20s before seizure onset when compared to the previous 5min epochs. However, Pilo animals had stronger coupling in theta-ripples band compared to the Pilo+MGE group at 20s previous to seizure onset (Table 3 and Figure 6A).

In the hippocampus, at 20s before seizure when compared to the 5min epochs, Pilo animals had a significant stronger coupling in delta-fast gamma band. The Pilo+MGE animals had a weaker coupling in delta-slow and middle gamma bands. At

the 5min epochs, Pilo+MGE had stronger coupling than Pilo in delta-fast gamma band, while at the 20s epochs, Pilo+MGE presented a weaker coupling in delta-slow and middle gamma compared to Pilo (Table 3 and Figure 6B).

Table 3 – Pre-ictal PAC between delta and faster oscillations

Electrode	Group	Delta-Slow Gamma	Delta -Middle Gamma	Delta -High Gamma	Delta -Ripples
<b>Cortex 5min</b>	<b>Pilo</b>	0.0037±0.0003	0.0034±0.0002	0.0029±0.0002	0.0018±0.0001
	<b>Pilo+MGE</b>	0.0046±0.0007	0.0039±0.0006	0.0029±0.0004	0.0019±0.0002
<b>Cortex 20s</b>	<b>Pilo</b>	0.0023±0.0003*	0.0019±0.0002*	0.0016±0.0001*#	0.0016±0.0001#
	<b>Pilo+MGE</b>	0.0012±0.0001*	0.0016±0.0001*	0.0010±0.0001*	0.0008±0.0001*
<b>Hippo 5min</b>	<b>Pilo</b>	0.0045±0.0003	0.0032±0.0002	0.0014±0.0001#	0.0013±0.0001
	<b>Pilo+MGE</b>	0.0056±0.0007	0.0045±0.0008	0.0023±0.0004	0.0013±0.0002
<b>Hippo 20s</b>	<b>Pilo</b>	0.0051±0.0004#	0.0041±0.0004#	0.0021±0.0002*	0.0014±0.0001
	<b>Pilo+MGE</b>	0.0023±0.0004*	0.0019±0.0003*	0.0016±0.0003	0.0012±0.0002

#Difference between groups in the same time; \*difference between 5min and 20s.



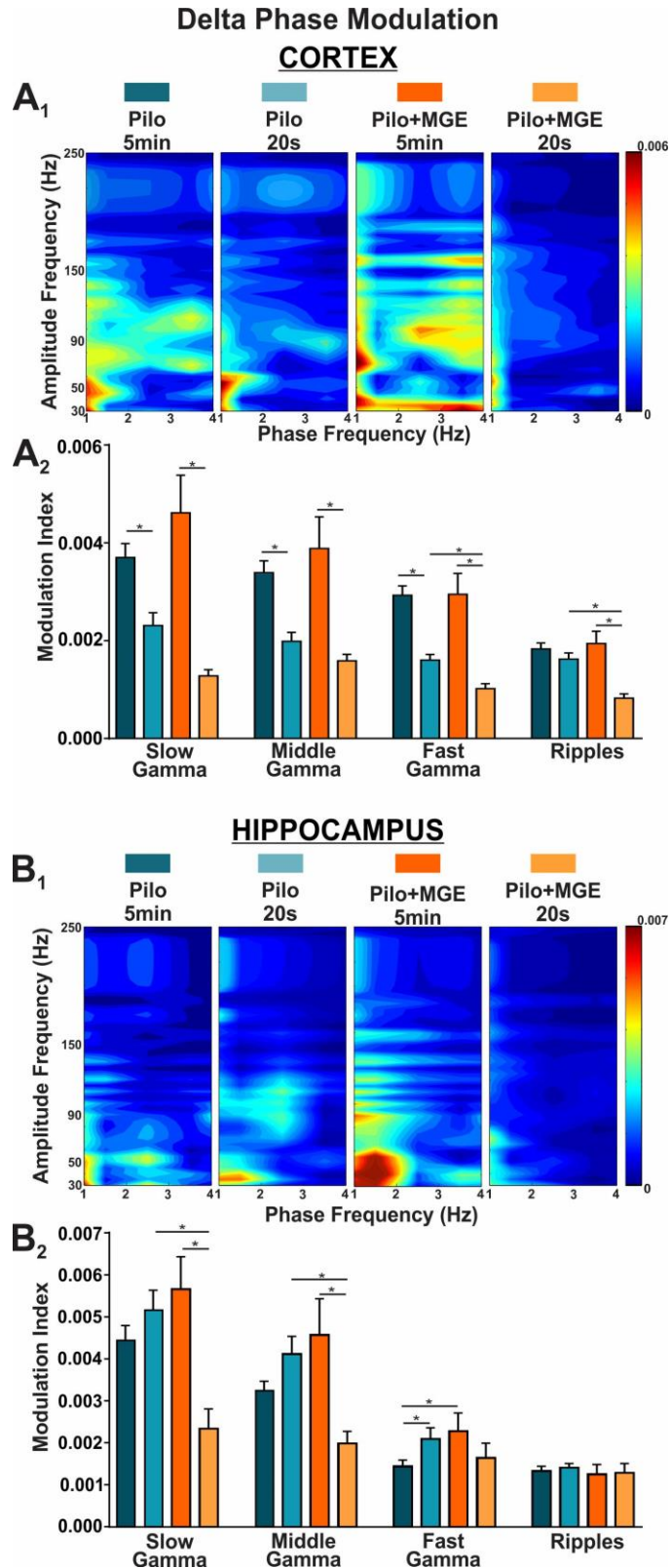


Figure 6. PAC analysis with delta as the phase modulator in pre-ictal period. Representative phase-amplitude comodulograms calculated for cortical (A<sub>1</sub>) and hippocampal (B<sub>1</sub>) electrodes. Warmer colors indicate higher Modulation Index (MI). Mean MI for the coupling of delta phase and the amplitude of different higher-frequencies in cortex (A<sub>2</sub>) and hippocampus (B<sub>2</sub>). Data in (A<sub>2</sub>) and (B<sub>2</sub>) is presented as mean  $\pm$  SE. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs

signed rank test, comparing the same seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

Next, we analyzed PAC using the theta band as the phase modulator. In cortex, at 20s before seizure when compared to 5 min epochs, Pilo and Pilo+MGE animals had significant weaker coupling in all frequencies. At the 20s before seizure onset, the Pilo+MGE group had significant weaker coupling in theta-ripples band compared to the Pilo group (Table 4 and Figure 7A). In the hippocampus, at 20s before seizure when compared to 5 min epochs, the Pilo group had a significant weaker coupling in theta-slow and middle gamma band, and a significant stronger coupling in theta-fast gamma. Pilo+MGE animals had a weaker coupling in theta-slow, middle and fast gamma band. At the 5min before seizure, the Pilo+MGE animals had a significant stronger theta-fast gamma coupling than the Pilo group, and at the 20s epochs, the Pilo+MGE animals had a significant weaker theta-slow and middle gamma coupling than Pilo group (Table 4 and Figure 7B).

Table 4 – Pre-ictal PAC between theta and faster oscillations

Electrode	Group	Theta-Slow Gamma	Theta -Middle Gamma	Theta -High Gamma	Theta -Ripples
Cortex 5min	Pilo	0.0028±0.0002	0.0020±0.0001	0.0027±0.0002	0.0013±0.0001
	Pilo+MGE	0.0033±0.0005	0.0020±0.0003	0.0020±0.0003	0.0010±0.0001
Cortex 20s	Pilo	0.0011±0.0001*	0.0008±0.0001*	0.0009±0.0001*	0.0007±0.0001*#
	Pilo+MGE	0.0005±0.0001*	0.0005±0.0001*	0.0004±0.0001*	0.0003±0.0001*
Hippo 5min	Pilo	0.0030±0.0002	0.0016±0.0001	0.0008±0.0001#	0.0003±0.0001
	Pilo+MGE	0.0021±0.0003	0.0014±0.0001	0.0009±0.0001	0.0002±0.0001
Hippo 20s	Pilo	0.0021±0.0002*#	0.0010±0.0001*#	0.0008±0.0001*	0.0004±0.0001
	Pilo+MGE	0.0007±0.0001*	0.0005±0.0001*	0.0005±0.0001*	0.0002±0.0001

#Difference between groups in the same time; \*difference between 5min and 20s.

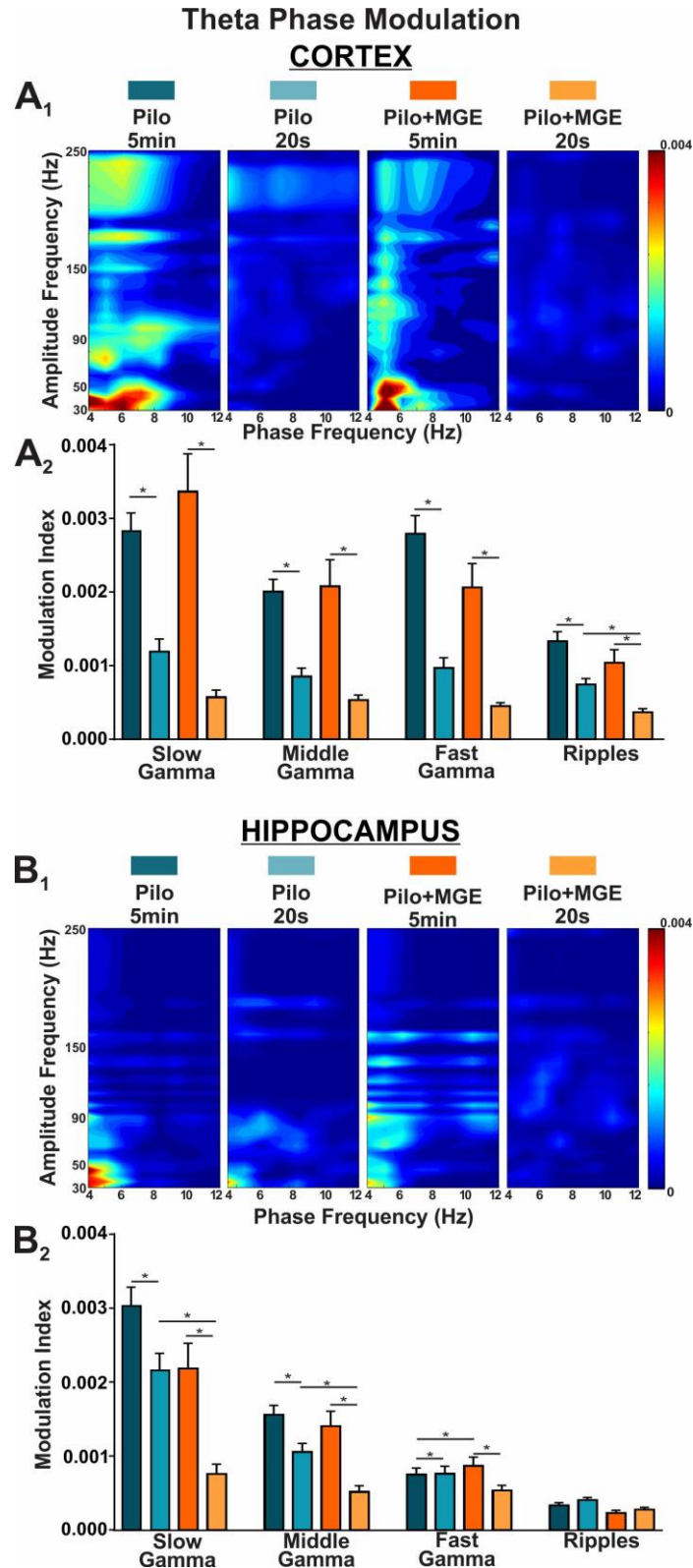


Figure 7. PAC analysis with theta as the phase modulator in pre-ictal period. Representative phase-amplitude comodulograms calculated for cortical (A<sub>1</sub>) and hippocampal (B<sub>1</sub>) electrodes. Warmer colors indicate higher Modulation Index (MI). Mean MI for the coupling of delta phase and the amplitude of different higher-frequencies in cortex (A<sub>2</sub>) and hippocampus (B<sub>2</sub>). Data in (A<sub>2</sub>) and (B<sub>2</sub>) is presented as mean  $\pm$  SE. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE+ 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs signed rank test, comparing the same seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

### 3.4 Post-ictal EEG

The post-ictal period was also analyzed using spectral power, phase coherence and phase-amplitude coupling.

In the cortex, at 20s after seizure termination when compared to 5 min epochs, the power of theta, slow and middle gamma bands were reduced in Pilo animals and the power of all frequencies were reduced in Pilo+MGE animals (Table 5 and Figure 8). Pilo+MGE animals had lower delta and theta power, and higher ripples power at 5min period and lower delta power 20s after seizure termination when compared with Pilo group (Table 5 and Figure 8).

Table 5 – Frequency band power.

Electrode	Group	Delta	Theta	Slow Gamma
Cortex 5min	Pilo	$1.4 \times 10^{-09} \pm 2.6 \times 10^{-10}$ #	$4.8 \times 10^{-10} \pm 7.1 \times 10^{-11}$ #	$7.6 \times 10^{-12} \pm 7.7 \times 10^{-13}$
	Pilo+MGE	$1.0 \times 10^{-09} \pm 2.2 \times 10^{-10}$	$2.3 \times 10^{-10} \pm 2.9 \times 10^{-11}$	$9.6 \times 10^{-12} \pm 2.4 \times 10^{-12}$
Cortex 20s	Pilo	$1.4 \times 10^{-09} \pm 2.9 \times 10^{-10}$ #	$3.7 \times 10^{-10} \pm 8.8 \times 10^{-11}$ *	$4.8 \times 10^{-12} \pm 7.5 \times 10^{-13}$ *
	Pilo+MGE	$5.1 \times 10^{-10} \pm 1.1 \times 10^{-10}$ *	$1.3 \times 10^{-10} \pm 2.4 \times 10^{-11}$ *	$5.1 \times 10^{-12} \pm 8.5 \times 10^{-13}$ *
Hippo 5min	Pilo	$1.7 \times 10^{-09} \pm 1.9 \times 10^{-10}$	$5.7 \times 10^{-10} \pm 9.4 \times 10^{-11}$	$9.4 \times 10^{-12} \pm 1.5 \times 10^{-12}$
	Pilo+MGE	$1.9 \times 10^{-09} \pm 4.8 \times 10^{-10}$	$5.0 \times 10^{-10} \pm 1.7 \times 10^{-10}$	$1.5 \times 10^{-11} \pm 5.0 \times 10^{-12}$
Hippo 20s	Pilo	$1.4 \times 10^{-09} \pm 1.7 \times 10^{-10}$	$3.7 \times 10^{-10} \pm 5.2 \times 10^{-11}$ *	$8.7 \times 10^{-12} \pm 1.6 \times 10^{-12}$
	Pilo+MGE	$1.3 \times 10^{-09} \pm 3.0 \times 10^{-10}$ *	$1.7 \times 10^{-10} \pm 2.7 \times 10^{-11}$ *	$5.4 \times 10^{-12} \pm 9.0 \times 10^{-13}$
Electrode	Group	Middle Gamma	Fast Gamma	Ripples
Cortex 5min	Pilo	$1.1 \times 10^{-12} \pm 3.4 \times 10^{-13}$	$1.0 \times 10^{-13} \pm 1.2 \times 10^{-14}$	$7.8 \times 10^{-16} \pm 1.2 \times 10^{-16}$ #
	Pilo+MGE	$2.0 \times 10^{-12} \pm 9.4 \times 10^{-13}$	$2.4 \times 10^{-13} \pm 1.0 \times 10^{-13}$	$1.8 \times 10^{-15} \pm 8.1 \times 10^{-16}$
Cortex 20s	Pilo	$9.8 \times 10^{-13} \pm 2.4 \times 10^{-13}$ *	$1.1 \times 10^{-13} \pm 1.5 \times 10^{-14}$	$1.1 \times 10^{-15} \pm 1.9 \times 10^{-16}$
	Pilo+MGE	$7.0 \times 10^{-13} \pm 1.7 \times 10^{-13}$ *	$7.9 \times 10^{-14} \pm 1.4 \times 10^{-14}$	$7.2 \times 10^{-16} \pm 1.7 \times 10^{-16}$
Hippo 5min	Pilo	$7.7 \times 10^{-13} \pm 1.3 \times 10^{-13}$	$9.4 \times 10^{-14} \pm 1.8 \times 10^{-14}$	$8.0 \times 10^{-16} \pm 1.3 \times 10^{-16}$
	Pilo+MGE	$1.5 \times 10^{-12} \pm 4.4 \times 10^{-13}$	$1.9 \times 10^{-13} \pm 7.8 \times 10^{-14}$	$1.2 \times 10^{-15} \pm 5.5 \times 10^{-16}$
Hippo 20s	Pilo	$1.7 \times 10^{-12} \pm 4.5 \times 10^{-13}$	$1.6 \times 10^{-13} \pm 2.9 \times 10^{-14}$ *	$1.0 \times 10^{-15} \pm 1.4 \times 10^{-16}$
	Pilo+MGE	$6.1 \times 10^{-13} \pm 1.0 \times 10^{-13}$	$1.2 \times 10^{-13} \pm 2.9 \times 10^{-14}$	$9.9 \times 10^{-16} \pm 2.4 \times 10^{-16}$

#Difference between groups in the same time; \*difference between 5min and 20s.

## Cortex

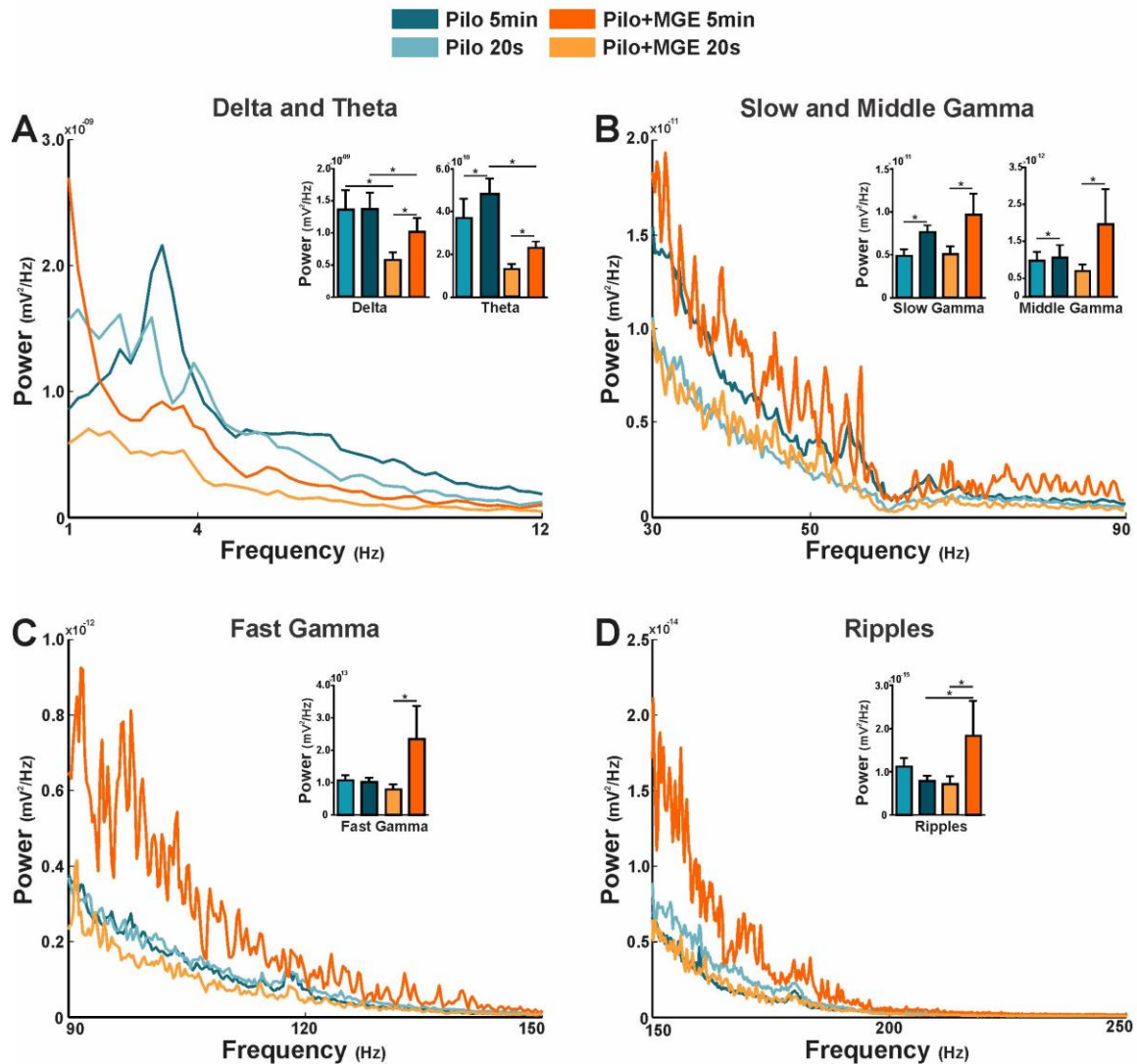


Figure 8. Power spectral densities of cortical electrode in post-ictal period showing differences in (A) delta and theta, (B) slow and middle gamma, (C) fast gamma and (D) ripples frequency bands. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs signed rank test, comparing 5min and 20s before seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

In the hippocampus, the power of delta and theta were reduced at 20s after seizure termination when compared to 5 min epochs, and the power of middle and fast gamma were increased in Pilo animals. In Pilo+MGE animals, the power of theta, slow and middle gamma were reduced (Table 5 and Figure 9). We did not find any differences between groups in hippocampal post-ictal periods.

# Hippocampus

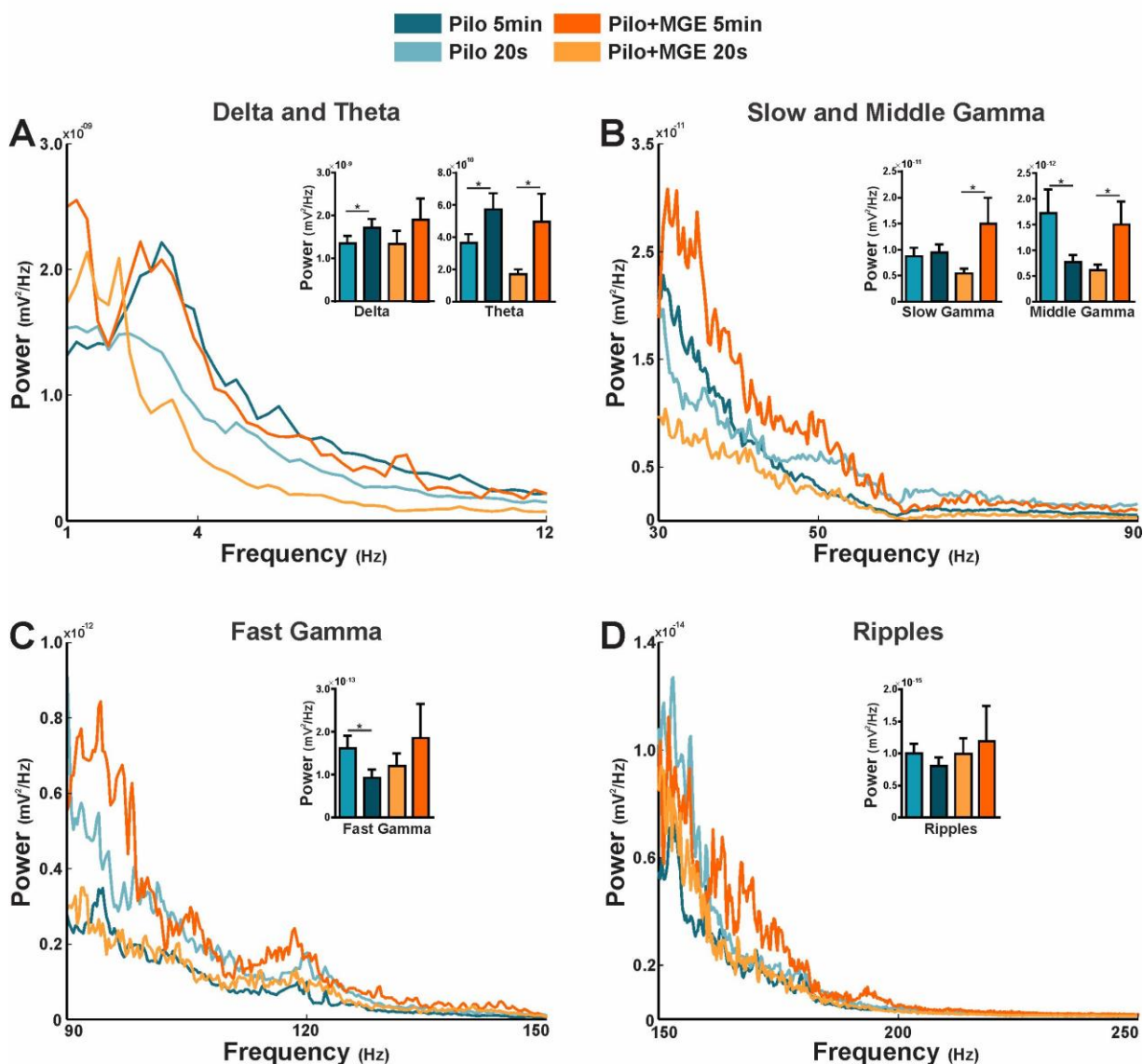


Figure 9. Power spectral densities of hippocampal electrode in post-ictal period showing differences in (A) delta and theta, (B) slow and middle gamma, (C) fast gamma and (D) ripples frequency bands. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs signed rank test, comparing 5min and 20s before seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

Phase coherence analysis between cortex and hippocampus at 20s after seizure termination when compared to 5min epochs showed that Pilo animals had significant lower cortical-hippocampal coherence in delta and theta bands, and significant higher coherence in slow, middle and fast gamma and ripples frequencies. There were no significant differences in phase coherence for the Pilo+MGE group from 20s to 5min

after seizure. However, when compared to the Pilo group, Pilo+MGE animals showed higher delta coherence at the 20s after seizure (Table 6 and Figure 10).

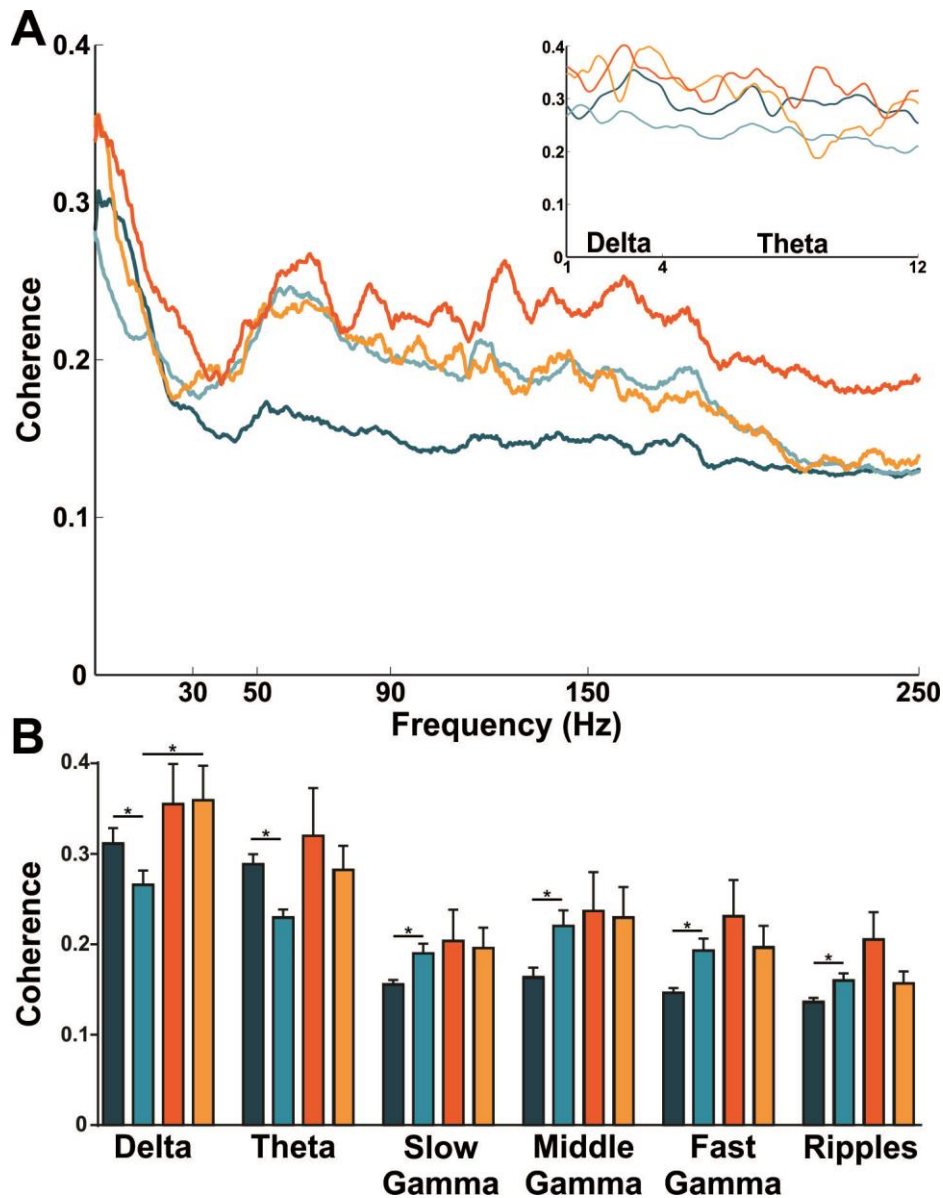


Figure 10. Phase coherence between cortical and hippocampal areas in post-ictal period. (A) Coherence spectra from delta and theta frequency band; (B) Phase coherence in delta, theta, slow, middle and fast gamma and ripples band presented as mean  $\pm$  SEM. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs signed rank test, comparing the same seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

Table 6 – Mean coherence of different frequency bands.

Period	Group	Delta	Theta	Slow Gamma	Middle Gamma	Fast Gamma	Ripples
5min	Pilo	0.31±0.02	0.29±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01	0.15±0.01	0.14±0.01
	Pilo+MGE	0.35±0.04	0.32±0.05	0.20±0.03	0.23±0.04	0.23±0.04	0.21±0.03
20s	Pilo	0.27±0.01*#	0.23±0.01*	0.19±0.01*	0.22±0.02*	0.19±0.01*	0.16±0.01*
	Pilo+MGE	0.36±0.04	0.28±0.03	0.20±0.02	0.23±0.03	0.19±0.02	0.16±0.01

#Difference between groups in the same time; \*difference between 5min and 20s.

The PAC analysis at 20s after seizure termination when compared to the 5min epochs, using delta phase as the modulator, showed that, in the cortex Pilo+MGE animals had significant stronger delta-slow gamma coupling and Pilo animals had significant stronger delta-ripples coupling. The Pilo+MGE animals had significant stronger coupling in delta-slow and middle gamma bands than the Pilo group 20s post seizure (Table 7 and Figure 11A). In the hippocampal area, only Pilo animals had significantly stronger delta-ripples, middle and fast gamma coupling (Table 7 and Figure 11B).

Table 7 – PAC between delta and faster oscillations.

Electrode	Group	Delta-Slow Gamma	Delta -Middle Gamma	Delta -High Gamma	Delta -Ripples
Cortex 5min	Pilo	0.0042±0.0003#	0.0036±0.0003	0.0028±0.0002	0.0019±0.0001
	Pilo+MGE	0.0062±0.0009	0.0050±0.0009	0.0051±0.0011	0.0025±0.0004
Cortex 20s	Pilo	0.0048±0.0006#	0.0038±0.0004#	0.0034±0.0004	0.0029±0.0003*
	Pilo+MGE	0.0096±0.0017*	0.0051±0.0007	0.0035±0.0005	0.0037±0.0007
Hippo 5min	Pilo	0.0059±0.0005	0.0049±0.0006	0.0030±0.0004	0.0015±0.0001
	Pilo+MGE	0.0066±0.0011	0.0051±0.0008	0.0032±0.0009	0.0013±0.0002
Hippo 20s	Pilo	0.0074±0.0008	0.0068±0.0007*	0.0050±0.0007*	0.0024±0.0002*
	Pilo+MGE	0.0071±0.0016	0.0062±0.0014	0.0055±0.0013	0.0018±0.0003

#Difference between groups in the same time; \*difference between 5min and 20s.



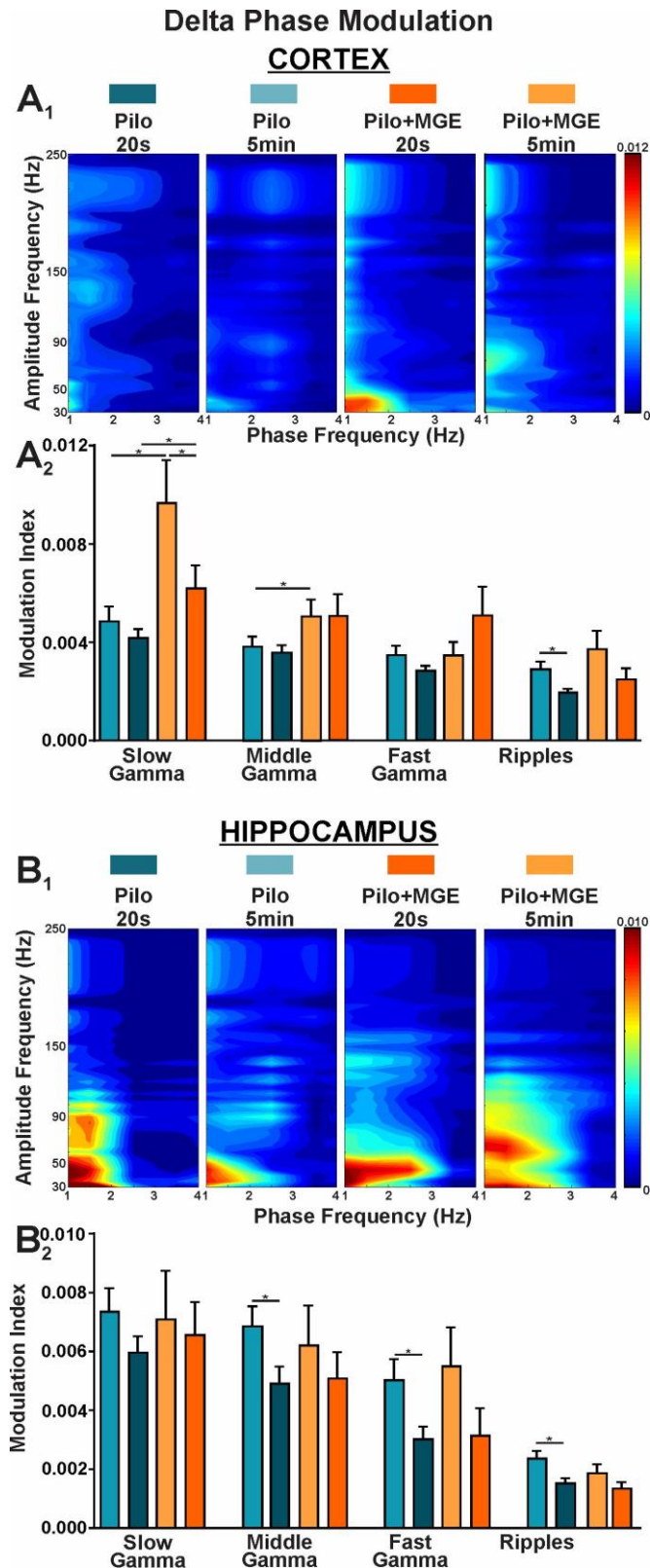


Figure 11. PAC analysis with delta as the phase modulator in post-ictal period. Representative phase-amplitude comodulograms calculated for cortical (A<sub>1</sub>) and hippocampal (B<sub>1</sub>) electrodes. Warmer colors indicate higher Modulation Index (MI). Mean MI for the coupling of delta phase and the amplitude of different higher-frequencies in cortex (A<sub>2</sub>) and hippocampus (B<sub>2</sub>). Data in (A<sub>2</sub>) and (B<sub>2</sub>) is presented as mean  $\pm$  SE. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs

signed rank test, comparing the same seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

The PAC analysis using theta band as the phase modulator showed that, in the cortical area, Pilo animals had a significant weaker coupling for all frequencies at 20s after seizure termination when compared to the 5min. However, Pilo+MGE animals had only a significantly weaker theta-fast gamma coupling. Comparing the 20 s after seizure termination, Pilo+MGE animals had significantly stronger theta-slow and middle gamma coupling than Pilo group (Table 8 and Figure 12A). In the hippocampal area, both Pilo and Pilo+MGE animals had weaker theta-slow gamma coupling (Table 8 and Figure 12B).

Table 8 – PAC between theta and faster oscillations.

Electrode	Group	Theta-Slow Gamma	Theta -Middle Gamma	Theta -High Gamma	Theta -Ripples
Cortex 5min	Pilo	0.0024±0.0002	0.0016±0.0001	0.0019±0.0001	0.0011±0.0001
	Pilo+MGE	0.0023±0.0002	0.0013±0.0001	0.0011±0.0002	0.0004±0.0001
Cortex 20s	Pilo	0.0013±0.0001*#	0.0009±0.0001*#	0.0012±0.0001*	0.0007±0.0001*
	Pilo+MGE	0.0017±0.0002	0.0015±0.0002	0.0011±0.0001*	0.0004±0.00004
Hippo 5min	Pilo	0.0032±0.0005	0.0018±0.0003	0.0023±0.0004	0.0011±0.0002
	Pilo+MGE	0.0026±0.0005	0.0016±0.0003	0.0012±0.0002	0.0003±0.0001
Hippo 20s	Pilo	0.0023±0.0004*	0.0013±0.0002	0.0011±0.0002	0.0007±0.0002
	Pilo+MGE	0.0012±0.0002*	0.0012±0.0002	0.0018±0.0005	0.0005±0.0001

#Difference between groups in the same time; \*difference between 5min and 20s.

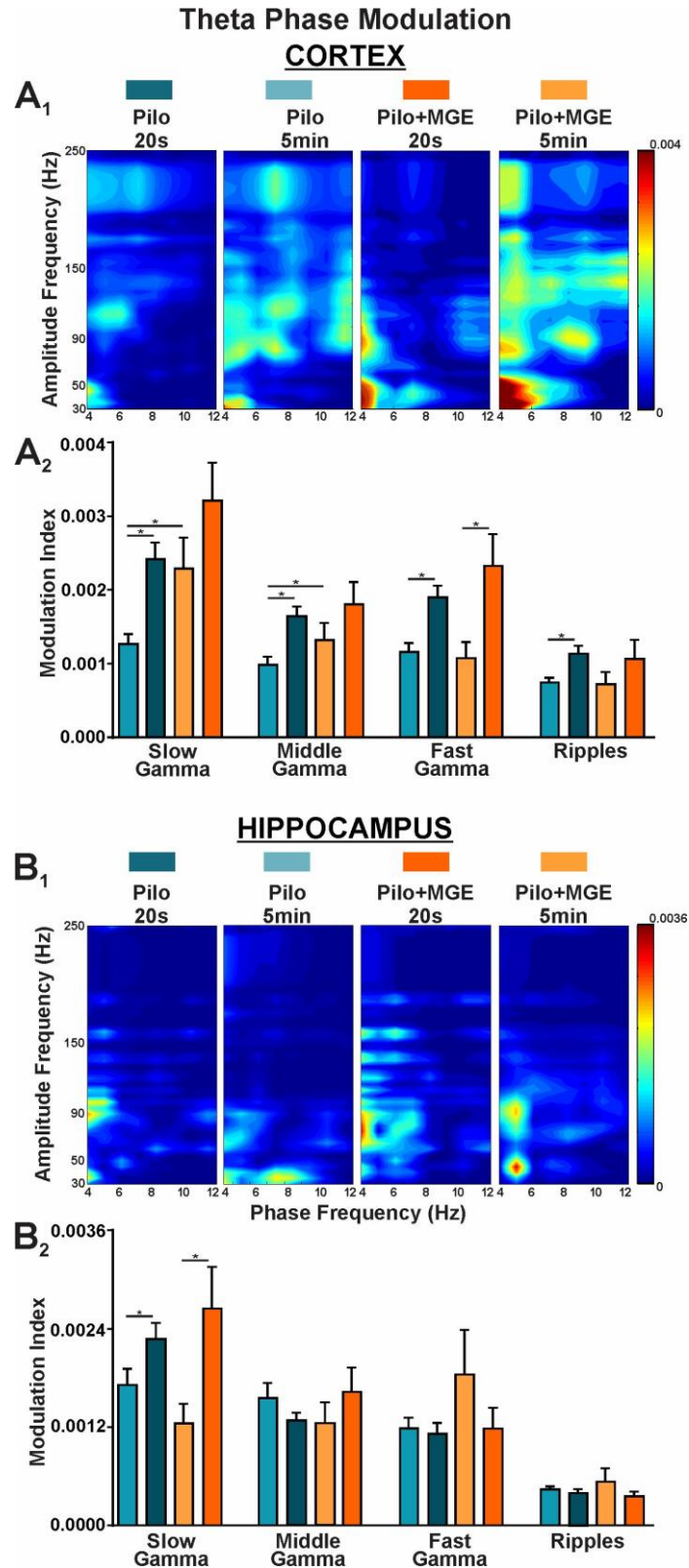


Figure 12. PAC analysis with theta as the phase modulator in post-ictal period. Representative phase-amplitude comodulograms calculated for cortical (A<sub>1</sub>) and hippocampal (B<sub>1</sub>) electrodes. Warmer colors indicate higher Modulation Index (MI). Mean MI for the coupling of delta phase and the amplitude of different higher-frequencies in cortex (A<sub>2</sub>) and hippocampus (B<sub>2</sub>). Data in (A<sub>2</sub>) and (B<sub>2</sub>) is presented as mean  $\pm$  SE. Dark blue: Pilo 5min; Light Blue: Pilo 20s; Dark Orange: Pilo+MGE 5min; Light Orange: Pilo+MGE 20s. \* $p < 0.05$  - Wilcoxon's matched-pairs

signed rank test, comparing the same seizure, and Mann Whitney's test comparing two different groups at the same time.

#### **4 DISCUSSION**

In this work, we demonstrated that epileptic animals transplanted with MGE precursor cells had a reduction of seizure and modifications of oscillation pattern in cortex and hippocampus during the pre and post-ictal periods.

MGE cell transplantation has the ability to differentiate into inhibitory interneurons expressing PV, NPY, and SOM (BARABAN et al., 2009; CALCAGNOTTO et al., 2010a, 2010b; CASALIA; HOWARD; BARABAN, 2017; HOWARD; BARABAN, 2016; WICHTERLE et al., 2001; ZIPANCIC et al., 2010). In addition, electrophysiological recordings have shown that cells from MGE integrate into the host circuit and increase inhibitory tone (BARABAN et al., 2009; CALCAGNOTTO et al., 2010a, 2010b; CASALIA; HOWARD; BARABAN, 2017; HOWARD; BARABAN, 2016; ZIPANCIC et al., 2010). Our study showed that MGE cells transplanted in the hippocampus of epileptic rats differentiated into inhibitory interneurons expressing mainly PV, NPY and probably enhanced the inhibitory tonus, as shown by the decrease in the total number of seizures and in animals that presented seizures. Some interneurons expressed CR and could be attribute to the CGE remaining during the extraction procedure once this type of interneurons in the hippocampus are generated from the CGE (PELKEY et al., 2017). Over the past few years, several studies investigated the ability of MGE cells to control and reduce seizure in different animal models of epilepsy, supporting our results (HSIEH; BARABAN, 2017; HUNT; BARABAN, 2015; ROMARIZ et al., 2017; TYSON; ANDERSON, 2014).

Modifications in brain oscillations had been reported before an animal model with epilepsy treated with intra hippocampal MGE grafts, however with no correlation with peri-ictal events (UPADHYA et al., 2019). With the power density analysis of the pre

ictal EEG, we observed a reduction in power of low frequency bands (delta, theta, slow gamma) in cortex and hippocampus and high frequency bands (middle gamma, and ripples) in the cortical area but not in the hippocampus at 20s of the seizure onset in the Pilo group. The MGE-treated animals presented a reduction in power for low frequency bands (delta, theta and slow gamma) only in the cortical area, but an increased power of high frequency bands (fast gamma and ripples) in cortical and hippocampal areas. The same pattern appears in the hippocampus, where Pilo+MGE animals presented an increase in middle and fast gamma and ripples power prior to seizure onset. Studies analyzing intracranial recordings in humans and animal models had identified different focal seizure-onset patterns (LEVESQUE et al., 2012; PERUCCA; DUBEAU; GOTMAN, 2014). Specifically, in mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) two seizure onset have specific high frequency oscillation (HFO) patterns: low-voltage fast activity (LVF) and hypersynchronous-seizure onset (HYP) (LEVESQUE et al., 2012). The LVF was characterized mainly by increment of ripples and fast ripples bands. Here we were not able to quantify fast ripples activity because the EEG signals were filtered at 0.1 – 300 Hz. However, the increased power of ripples band in the Pilo+MGE animals was clear, characterizing a distinct seizure onset for this group. The main generators of the ripples oscillations (up to 200 Hz) are the synchronously firing pyramidal cells and synchronous inhibitory postsynaptic events generated by synchronously active fast-spiking PV-expressing basket cells (BUZSÁKI; SILVA, 2012). Not only ripples but also gamma oscillations are also strongly dependent on fast spiking interneuron activity (CARDIN et al., 2009). Gamma oscillations are also regulated by SOM-expressing neurons activity in visual cortex and in basal forebrain areas (ESPINOSA et al., 2019; VEIT et al., 2017). As MGE grafted precursors give rise to different types of interneurons, specifically PV and SOM expressing-cells

(ALVAREZ-DOLADO et al., 2006; CALCAGNOTTO et al., 2010a; HSIEH; BARABAN, 2017; PAIVA et al., 2017; ROMARIZ et al., 2017), the increased power of HFOs prior to seizure onset in transplanted animals could indicate the participation of the MGE-derived interneurons integrated in the host network.

A recent study has shown high values of delta power in the interictal period in cortical and depth hippocampal areas of recordings in the pilocarpine model of epilepsy (VENDRAMIN PASQUETTI et al., 2019). Comparing the baseline period, we found that Pilo+MGE animals have less delta power compared with Pilo in both cortical and hippocampal areas. Once local delta activity is an important epileptogenic biomarker and relate with brain injury and focal epilepsies (Brigo, 2011, (NAFTULIN et al., 2018; NISSEN et al., 2018; PELLEGRINO et al., 2017), such reduction could be related with integration of the new interneurons into the network host, reducing or repairing the damaged circuitry. Accordingly, a recent publication showed that MGE-derived cells grafted in mice with pilocarpine-induced epilepsy were able to form synapses with distal dendrites in dentate gyrus granular cells, partially restoring the inhibition (GUPTA et al., 2019).

Pilo+MGE animals also presented lower theta power than Pilo group at the baseline (5 min) pre-ictal and post-ictal periods in the cortical electrodes and at baseline post-ictal period in the hippocampal electrode. Theta power was reduced at the seizure onset and termination in both groups. Reduced theta rhythm associated with interictal spikes has been found in the anterior hippocampus and entorhinal cortex of patients with MTLE (FU et al., 2018). Also, lower theta power was observed in hippocampal area of a mouse model of MTLE, where the discharge frequency of the dendrite-inhibiting oriens-lacunosum-moleculare (O-LM) interneuron changed from the theta to the gamma band (DUGLADZE et al., 2007). Although Pilo+MGE animals had

an important reduction in seizure frequency, they are still epileptic, and maybe the mechanisms of persistent seizures can be related with fine inhibitory tune inside the hippocampus.

The phase coherence for delta and theta frequencies is higher at the pre-ictal baseline period (5min) of Pilo+MGE when compared to Pilo animals, and decreases at seizure onset, returning to the previous values at 5 min after seizure has ended. Reduction in theta band phase coherence in the hippocampal formation is implicated in episodic-like memory dysfunction in MTLE (INOSTROZA et al., 2013). We have not performed memory tasks in our animals, but a previous study using MGE cells transplants into septo-hippocampal lesioned mice has shown recovery of short-term learning and memory deficits and integration of grafted interneurons into the circuit (LIU et al., 2013). Interneuron precursor grafts also restored learning and memory in models of Alzheimer disease (TONG et al., 2014). Although an increase in coherence appears to be related to hyperexcitable networks, this mechanism could be involved with memory improvement in grafted animals. Also, studies showed that the activity of PV-expressing interneurons distant from the epileptogenic focus can block the ictal event to spread, contributing to reduce the generalization of seizures (SESSOLO et al., 2015).

Phase-amplitude coupling (PAC) is an important mechanism related to the dynamics of network excitability in neuronal assemblies (BUZSÁKI; WANG, 2012). Overall, in the cortical pre-ictal recordings from both groups, we found a decrease in PAC, both with delta and theta as the phase modulators, with a stronger reduction in fast gamma and ripples PAC in the Pilo+MGE animals. Therefore, albeit we observed higher power in HFOs, these oscillations appear less synchronized at seizure initiation in the Pilo+MGE group, indicating a decrease in intra-structure synchrony. On the other

hand, in the hippocampus, only Pilo+MGE animals had a weaker PAC for delta-slow and middle gamma bands and a weaker PAC at seizure onset of Pilo and Pilo+MGE in the theta-slow and middle gamma bands. Stronger PAC in different areas has been shown in epilepsy models, for example, PAC between slow waves (<1Hz) and the gamma-ripples band (50–180 Hz) is higher in the CA3 area from pilocarpine treated animals and positively correlated with the daily number of seizures (SAMIEE et al., 2018b). Besides, PAC between the phase of low frequencies (<10Hz) and the amplitude of higher frequencies (>10Hz) increases, being at maximum during the seizure and gradually weakened as seizure ends in patients with MTLE (ZHANG et al., 2017). In depth LFP recordings from interictal period, PAC between delta and higher frequencies (30-400Hz) is shown to be stronger in epileptic animals compared to healthy controls in *stratum radiatum* of hippocampus (VENDRAMIN PASQUETTI et al., 2019). In this way, such reduction in PAC seen in the Pilo+MGE animals, especially in the hippocampal area, could be related to the reduction in seizure frequency since the area appears less synchronized.

Curiously, in the post-ictal period, the delta-slow gamma and theta-slow gamma PAC of Pilo+MGE animals were stronger in the cortical electrodes. There are few studies addressing post-ictal period alterations with depletion of the network activity (SUBOTA et al., 2019). Since interneurons, especially PV-expressing cells, are strongly related to phase-amplitude coupling (CAIXETA et al., 2013), the increase in number and connectivity of GABAergic system in Pilo+MGE animals could be the source of increased coupling at the post-ictal period, and suggest a boost activity rather than a network activity depletion in these animals.

Overall, Pilo+MGE animals appear to have different oscillation patterns compared to Pilo animals, with weaker coupling especially in the hippocampus. These



results provide evidence of synaptic reorganization induced by the new interneurons in the circuitry, possibly helping to prevent and reduce epileptogenesis.

## **5 CONCLUSIONS**

MGE precursors cells grafted into an environment of ongoing epileptogenesis possibly induce a network reorganization that could be responsible for seizure reduction. Particularly, the decrease in delta power, increase in interictal coherence in delta and theta bands and the reduction in delta-HFOs PAC in the hippocampal area can be pointed as indicators of network rewiring with consequent reduction of epileptogenesis. The increased power and decreased coherence of HFOs at the seizure onset was probably induced by integration of an inhibitory system in the network that was partially restored by transplantation. The evaluation of the role of these new interneurons on the reorganized network could help us to understand the mechanisms behind seizure control that clearly go beyond a simple increase in inhibition.

## PARTE III – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstramos que animais que receberam pilocarpina apresentaram modificações nas oscilações cerebrais corticais e hipocampais no período interictal, mesmo sem a presença de IES. Alterações foram vistas mesmo nos animais NSE, indicando que a administração de pilocarpina, ainda que sem a geração de SE, causa modificações da rede neuronal. A atividade da GAD, assim como a quantificação dos neurotransmissores GABA e Glutamato não foi diferente entre os grupos, indicando que as alterações são muito provavelmente decorrentes de reorganização e da integração dos interneurônios na rede neuronal e não de alterações moleculares relacionadas à quantidade de neurotransmissores disponível. Além disso, animais epiléticos transplantados com células precursoras da EGM (Pilo+MGE, conforme o Capítulo II) apresentaram redução de crises epiléticas espontâneas e alterações no padrão oscilatório nos períodos pré e pós-ictal, corroborando a importância dos interneurônios GABAérgicos na epileptogênese e nas oscilações cerebrais.

#### 1 ANÁLISE DA POTÊNCIA ESPECTRAL

Alterações em oscilações cerebrais têm sido relacionadas a diversas patologias. Atividade intermitente na frequência delta (1-4Hz) é um achado frequente em exames eletroencefalográficos de pacientes com epilepsia (BRIGO, 2011; VECCHIO et al., 2016) e tal predomínio de oscilações delta tem sido apontado como um indicador de zonas de início de crises epiléticas, podendo ser um possível

marcador de focos epileptogênicos (AMIRI; FRAUSCHER; GOTMAN, 2016; NAFTULIN et al., 2018; PELLEGRINO et al., 2017). A análise de potência espectral dos traçados interictais demonstrou que animais epiléticos possuem maior potência de delta nas camadas IV, V e VI do córtex (Ctx1 e Ctx2) e no hipocampo (Ors, Rad e LM) comparado com animais controle. Os animais NSE, que receberam pilocarpina, mas não tiveram SE e não apresentaram crises espontâneas durante o período de análise, possuíram maior potência de delta comparado com os animais controle apenas na camada IV (Ctx1). Tal dado indica que, mesmo nos animais não apresentando crises espontâneas, ocorre reorganização da rede, ao menos a nível cortical. Este dado é importante pois existem evidências de que animais NSE podem apresentar crises espontâneas cerca de 8 meses após a administração de pilocarpina, possuindo portanto alterações muito mais tardias (NAVARRO MORA et al., 2009). Ao analisarmos a potência espectral das oscilações cerebrais nos animais que foram transplantados com precursores da EGM (Pilo+MGE), identificamos que estes animais tiveram uma menor potência de delta comparado aos animais Pilo (que não receberam o transplante) 5min antes da crise (período basal) no córtex e no hipocampo e uma menor potência de delta no córtex 5min após a crise epilética. Além disso, comparando os 20s pós-ictais, animais Pilo+MGE possuem menor potência de delta no final da crise comparando com animais Pilo. Considerando que aumento de oscilações delta é relacionado com diferentes injúrias cerebrais (BRIGO, 2011), uma diminuição dessa oscilação pode estar relacionada com a redução da incidência de crises vista nesses animais. Provavelmente esta diminuição pode estar relacionada com a integração do novos interneurônios na rede neuronal do hospedeiro, aumentando a atividade inibitória (GUPTA et al., 2019).

A potência na faixa teta é reduzido após as *IES*, e tal efeito é sustentado mesmo após um período prolongado, entre as pontas interictais (FU et al., 2018). A potência do teta também aparece reduzido no eixo CA1-DG de animais epiléticos e está associado com déficits cognitivos vistos nesses animais (INOSTROZA et al., 2013). Alterações na oscilação teta estão diretamente relacionadas ao declínio cognitivo visto na ELT em humanos (KRALIK et al., 2018). O pico das oscilações teta em animais modelo de pilocarpina também aparece em frequência mais lenta em CA3 quando comparado a animais controle, mesmo nos períodos interictais (KARUNAKARAN; GRASSE; MOXON, 2016). Novamente, animais NSE apresentaram redução de teta somente na área cortical, região na qual parece ser a mais afetada nesses animais.

Por outro lado, os animais Pilo+MGE apresentaram menor potência de teta no córtex e hipocampo, comparando os 5min pré-ictais, e menor potência de teta no córtex nos 5min pós-ictais em relação aos animais controle. Nós não realizamos testes comportamentais para avaliar alterações de memória nos animais, porém, estudos prévios com transplantes com células EGM mostraram recuperação de déficits cognitivos em camundongos com lesão na região septo hipocampal (LIU et al., 2013) e em modelos animais da doença de Alzheimer (TONG et al., 2014). Estudos mostram que variações no padrão de disparos de interneurônios são relacionadas com modificações de potência e sincronia de oscilações teta (ALLEN; MONYER, 2014; MOXON et al., 2019). Por exemplo, interneurônios oriens-lacunosomolecular (OLM) alteram seu padrão de disparo para a faixa de oscilações gama, gerando uma redução da potência de teta em modelo de ELTm (DUGLADZE et al., 2007). Mais estudos relacionando alterações nas propriedades dos interneurônios transplantados e as modificações nas oscilações seriam interessantes para entender a redução de teta verificada nesses animais.

Interneurônios PV e SOM são essenciais no controle de oscilações gama em diversas regiões do cérebro (CARDIN et al., 2009; ESPINOSA et al., 2019; SOHAL et al., 2009). A atividade desses interneurônios é alterada em epilepsias, com diminuição da frequência de disparos de potencial de ação no início das crises epiléticas (TOYODA et al., 2015). Nas análises do período interictal encontramos uma redução de gama lento nos animais epiléticos no córtex e no Ors, e também nas faixas de gama médio e rápido no Ors. Essa redução pode estar relacionada, por exemplo, com a diminuição dos disparos de interneurônios PV vista em epilepsias (LOPEZ-PIGOZZI et al., 2016).

De acordo com essa linha de raciocínio, nossos resultados analisando o período pré-ictal mostram que animais Pilo+MGE possuem um substancial aumento de oscilações gama rápido e ripples comparando com 5min antes da crise. Além de serem importantes na geração de oscilações gama, os principais geradores de oscilações ripples (>200Hz) são a atividade sincrônica de células piramidais e interneurônios PV de disparo rápido (BUZSÁKI; SILVA, 2012). Ademais, oscilações gama são reguladas por interneurônios SOM no córtex visual e no prosencéfalo (ESPINOSA et al., 2019; VEIT et al., 2017). E, indo mais além, para que ocorram oscilações gama no início de atividades ictais, é possível que seja necessária uma complexa rede de interneurônios de toda a via septo-hipocampal (QUILICHINI et al., 2012). Os transplantes de precursores da EGM dão origem especialmente a interneurônios PV e SOM, os quais sabidamente se integram na rede e recuperam o tônus inibitório prejudicado na epilepsia (HSIEH; BARABAN, 2017; PAIVA et al., 2017; ROMARIZ et al., 2017; ZIPANCIC et al., 2010). Desse modo, o aumento de HFOs visto no início da crise pode indicar uma grande participação desses interneurônios novos, que estariam integrados na rede hospedeira.

Estudos analisando registros intracerebrais em modelos animais e humanos identificaram padrões principais de início de crise, sendo os mais reportados na ELT os iniciados por oscilações de baixa voltagem e atividade rápida, chamadas de LVF (do inglês, *low voltage frequency*), e o com baixa frequência e pontas periódicas de alta amplitude, chamados de HYP (do inglês, *hypersynchronous-onset*) (LEVESQUE et al., 2012; PERUCCA; DUBEAU; GOTMAN, 2014). Nas crises do tipo LVF predominariam oscilações ripples, e nas do tipo HYP fast ripples. Nós infelizmente não fomos capazes de quantificar oscilações na faixa de fast ripples nesta parte do trabalho, uma vez que o amplificador utilizado para aquisição dos registros possui filtro na faixa de 0,1-300Hz. Contudo, os animais Pilo+MGE apresentam muito mais ripples no período 20s pré-ictal do que animais Pilo, o que poderia indicar que as crises persistentes nestes animais são de um tipo de início específico, relacionado com o maior número de interneurônios PV e SOM.

Embora HFOs sejam encontradas em diversos modelos de epilepsia (HÖLLER; TRINKA; HÖLLER, 2018; SHIBATA; KOBAYASHI, 2018; THOMSCHEWSKI; HINCAPIÉ; FRAUSCHER, 2019), nós não detectamos alterações significativas na quantidade de HFOs no período interictal dos animais epiléticos. Uma possível explicação é o fato de HFOs serem associadas com IES (SALAMI et al., 2014), enquanto nossa análise focou em períodos de registro sem qualquer presença de pontas ou salvas de atividade epileptiformes. Além disso, estudos mostram que a potência das HFOs é variável ao longo do processo epileptogênico, com uma redução cerca de 5 semanas após a indução de SE (LI et al., 2018), o que coincide com o tempo em que nossos registros foram analisados.

## 2 ANÁLISE DA COERÊNCIA DE FASE

Coerência de fase é uma medida que reflete a sincronia em frequências específicas entre dois eletrodos localizados em diferentes regiões (HORWITZ, 2003).

Analisando os registros interictais, observamos que os animais epiléticos tiveram maior coerência de delta entre Córtex-Ors, Ctx2-Pyr e Ors-Pyr, e menor coerência nas oscilações teta e gamas (lento, médio e rápido) entre Ctx1 (camada IV) e as outras áreas (exceto em Ors) comparado com animais controle (que não receberam pilocarpina). Animais NSE apresentaram uma maior coerência entre córtex e Ors na faixa delta, e menor coerência Ctx1-Ctx2 e Ctx1-Rad nos gamas baixo e médio. Diminuição de coerência na frequência gama entre hipocampus antes de eventos epileptiformes tem sido demonstrada em modelo de ELTm induzida por cainato (MEIER et al., 2007), e alterações de coerência de oscilações lentas e HFOs podem ser consideradas como um marcador de locais de foco epileptogênico (COTIC et al., 2016).

Já nas análises dos registros pré-ictais, nos 5min antes da crise os animais Pilo+MGE apresentaram coerência córtico-hipocampal nas frequências delta e teta maior comparado com animais Pilo. A coerência diminui nos 20s pré-ictais e tornou a aumentar nos 20s pós-ictais, mantendo-se no mesmo nível nos 5min pós-ictais. Esta dinâmica aponta que animais Pilo+MGE possuem valores basais de coerência aumentados nas faixas delta e teta. Redução de coerência na frequência teta na formação hipocampal (entre CA1 e GD) está relacionada com as disfunções de memória vistas em modelo animal de ELTm (INOSTROZA et al., 2013). Embora aumentos de coerência sejam relacionados com a hiperexcitabilidade de redes, talvez neste caso o que vemos é um dos mecanismos envolvidos na melhora de memória vista em animais de outros modelos transplantados com precursores da EGM. Além

disso, estudos apontam que um aumento de atividade de interneurônios PV distante do foco epileptogênico pode ajudar no bloqueio da propagação do evento ictal, reduzindo assim a generalização das crises epiléticas (SESSOLO et al., 2015). Mais estudos sobre alterações de coerência e do papel destes novos interneurônios fora do foco epilético podem ser úteis para entendermos de que modo o transplante das células precursoras da EGM atua para reduzir as crises epiléticas.

### **3 ANÁLISE DO ACOPLAMENTO FASE-AMPLITUDE**

Outra maneira de caracterizar sincronia entre oscilações cerebrais é através do PAC, um importante mecanismo relacionado a dinâmicas de excitabilidade de assembleias neuronais, no qual a amplitude de uma oscilação rápida é modulada pela fase de uma oscilação lenta (BUZSÁKI; WANG, 2012). Aumento do acoplamento de oscilações lentas e HFOs (50-180Hz) tem sido observado em CA3 em modelos de ELTm, e tal aumento é correlacionado com uma maior frequência de crises (SAMIEE et al., 2018a). Aumento de PAC ocorre também em zonas relacionadas ao início das crises epiléticas em pacientes com epilepsias focais, sendo apontado como um marcador útil na escolha de locais de ressecção cirúrgica (AMIRI; FRAUSCHER; GOTMAN, 2016; ZHANG et al., 2017).

Analisando o acoplamento da fase de delta com as oscilações mais rápidas nos traçados interictais, verificamos um maior índice de modulação (MI, do inglês *Modulation Index*) ou seja, um acoplamento mais robusto, entre delta-gama lento, ripples e fast ripples em Ctx2 (camadas V e VI) de animais epiléticos. Contudo, as principais diferenças foram observadas em Rad, onde animais epiléticos mostraram um maior MI entre a fase delta e a amplitude de todas as frequências. Neste caso, além de encontrarmos uma diferença entre animais epiléticos e controle, também



houve diferença com animais NSE, demonstrando que tal achado é muito provavelmente relacionado com o aparecimento das crises epiléticas espontâneas. Embora a diferença entre grupos seja bastante robusta, cabe ressaltar que os valores são baixos comparados com outros trabalhos que descrevem acoplamentos (SCHEFFER-TEIXEIRA; TORT, 2017; TORT; BRANKAČK; DRAGUHN, 2018), então devem ser avaliados com cuidado.

Na análise dos registros pré-ictais corticais, no geral verificamos uma diminuição do acoplamento tanto delta-HFOs quanto teta-HFOs comparando 20s e 5min, tanto nos animais Pilo quanto Pilo+MGE. O resultado que parece ser mais relevante é os animais Pilo+MGE apresentarem uma maior redução do acoplamento delta-gama rápido e delta ripples no córtex, e também teta-ripples no córtex. Estas foram as oscilações em que mais verificamos diferença na quantificação de potência espectral, onde animais Pilo+MGE apresentaram um aumento de gama rápido e ripples nos 20s pré-ictais. Logo, embora a quantidade destas oscilações aumente nos animais transplantados, parece haver uma diminuição de sincronia intra-hipocampal nestas frequências. Já no hipocampo, somente animais Pilo+MGE tiveram um PAC delta-gama baixo e delta-gama médio mais baixo próximo ao início da crise. Além disso, comparando os 20s pré-ictais entre grupos, os animais Pilo+MGE tiveram menor acoplamento delta/teta-gama baixo e delta/teta-gama médio, o que pode novamente ser um indicativo de uma menor sincronia dentro do hipocampo. Considerando que um aumento de acoplamento entre oscilações lentas e rápidas em CA3 em modelos de epilepsia está relacionado com aumento de crises epiléticas (SAMIEE et al., 2018a), a redução do PAC vista nos animais Pilo+MGE pode estar relacionada com a diminuição de crises epiléticas.

## CONCLUSÕES

Verificamos diversas alterações nas oscilações cerebrais na epilepsia e em decorrência do transplante de células precursoras derivadas da EGM. Nossos dados sugerem um aumento de sincronia entre o córtex e CA1 em animais epiléticos, com um aumento de potência de delta e um maior acoplamento delta-HFOs no *stratum radiatum* (Rad). Esta camada parece ser um importante local de sincronia do hipocampo em ELTm e apresenta alterações podem ser preditores de ictiogênese.

A reposição celular com transplante de precursores de interneurônios derivados da EGM, que sabidamente se integram na rede neuronal, provocou mudanças nos padrões de oscilações peri-ictais diminuindo a ictiogênese. Assim como nos registros interictais, as oscilações delta merecem especial atenção, uma vez que animais Pilo+MGE apresentaram uma diminuição na potência de delta e maior coerência de fase córtico-hipocampal nas frequências delta e teta e menor PAC delta-HFOs no hipocampo comparado a animais não transplantados. Os animais Pilo+MGE também apresentaram menor potência e menor PAC de oscilações gama rápido e ripples, o que pode estar relacionado com maior número e provável maior ativação de interneurônios GABAérgicos.

A reorganização dos circuitos neurais leva a mudanças nos padrões oscilatórios cerebrais. Entender estes circuitos envolvidos na sincronia interictal é importante para entender o processo de geração das crises epiléticas. Desvendar o papel destes interneurônios na geração, modulação e propagação de crises epiléticas pode auxiliar no entendimento dos mecanismos capazes de reduzir e/ou controlar o processo epileptogênico, que vão além de um simples aumento da inibição.

## FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, Kevin; MONYER, Hannah. Interneuron control of hippocampal oscillations. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 31, p. 81–87, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2014.08.016>>
- ALVAREZ-DOLADO, M. et al. Cortical Inhibition Modified by Embryonic Neural Precursors Grafted into the Postnatal Brain. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 28, p. 7380–7389, 2006. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1540-06.2006>>
- AMIRI, Mina; FRAUSCHER, Birgit; GOTMAN, Jean. Phase-Amplitude Coupling Is Elevated in Deep Sleep and in the Onset Zone of Focal Epileptic Seizures. **Frontiers in Human Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. August, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnhum.2016.00387/abstract>>
- ANDERSON, Stewart A.; BARABAN, Scott C. Cell Therapy Using GABAergic Neural Progenitors. In: NOEBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, Et al. (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). p. 1122–1128.
- AVOLI, Massimo; DE CURTIS, Marco; KÖHLING, Rüdiger. Does interictal synchronization influence ictogenesis? **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 69, p. 37–44, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390812003024>>
- BACKOFEN-WEHRHAHN, Bianca et al. Anticonvulsant effects after grafting of rat, porcine, and human mesencephalic neural progenitor cells into the rat subthalamic nucleus. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 310, n. May, p. 70–83, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488618304485>>
- BARABAN, S. C. et al. Reduction of seizures by transplantation of cortical GABAergic interneuron precursors into Kv1.1 mutant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 36, p. 15472–15477, 2009.
- BARABAN, Scott C. Emerging epilepsy models: Insights from mice, flies, worms and fish. **Current Opinion in Neurology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 164–168, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17351486>>
- BARTOS, Marlene; VIDA, Imre; JONAS, Peter. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 45–56, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn2044>>
- BAŞAR, E. et al. What does the broken brain say to the neuroscientist? Oscillations and connectivity in schizophrenia, Alzheimer's disease, and bipolar disorder. **International Journal of Psychophysiology**, [s. l.], v. 103, p. 135–148, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167876015000343>>

- BAULAC, M. MTLTLE with hippocampal sclerosis in adult as a syndrome. **Revue Neurologique**, [s. l.], v. 171, n. 3, p. 259–266, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2015.02.004>>
- BLUMCKE, Ingmar et al. Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 377, n. 17, p. 1648–1656, 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1703784>>
- BLÜMCKE, Ingmar et al. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 235–244, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00401-006-0187-0>>
- BLÜMCKE, Ingmar et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. **Epilepsia**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 1315–1329, 2013.
- BRIGO, Francesco. Intermittent rhythmic delta activity patterns. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 254–256, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.11.009>>
- BROGGINI, Ana Clara Silveira et al. Pre-ictal increase in theta synchrony between the hippocampus and prefrontal cortex in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 279, p. 232–242, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.03.007>>
- BUCKMASTER, Paul S. Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus. In: NOEBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, Et al. (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). p. 1–29.
- BUZSÁKI, György. **Rhythms of the Brain**. [s.l.] : Oxford University Press, 2006. Disponível em: <<http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195301069.001.0001/acprof-9780195301069>>
- BUZSÁKI, György; ANASTASSIOU, Costas A.; KOCH, Christof. The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 407–420, 2012.
- BUZSÁKI, György; SILVA, Fernando Lopes Da. High frequency oscillations in the intact brain. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 241–249, 2012.
- BUZSÁKI, György; WANG, Xiao-Jing. Mechanisms of Gamma Oscillations. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 203–225, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-062111-150444>>
- CAIXETA, Fábio V. et al. Ketamine alters oscillatory coupling in the hippocampus. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 3, p. 1–10, 2013.
- CALCAGNOTTO, Maria E. et al. Grafting of GABAergic precursors rescues deficits in hippocampal inhibition. **Epilepsia**, [s. l.], v. 51, n. SUPPL. 3, p. 66–70, 2010. a.
- CALCAGNOTTO, Maria E. et al. Effect of neuronal precursor cells derived from medial ganglionic eminence in an acute epileptic seizure model. **Epilepsia**, [s. l.], v. 51, n. SUPPL. 3, p. 71–75, 2010. b.
- CALCAGNOTTO, Maria Elisa. Interneurons: Role in maintaining and restoring synaptic plasticity. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 7, n. MAY, p. 1–4, 2016.
- CARDIN, Jessica A. et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. **Nature**, [s. l.], v. 459, n. 7247, p. 663–667, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761310004966>>
- CASALIA, Mariana L.; HOWARD, MacKenzie A.; BARABAN, Scott C. Persistent seizure control in epileptic mice transplanted with gamma-aminobutyric acid progenitors. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 530–542, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.25021>>
- CAVALHEIRO, Esper A. et al. The Pilocarpine Model of Seizures. In: **Models of Seizures and Epilepsy**. [s.l.: s.n.]. p. 433–448.

CHAUVIÈRE, L. et al. Early Deficits in Spatial Memory and Theta Rhythm in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 17, p. 5402–5410, 2009. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4699-08.2009>>

CHENG, Sen. The CRISP theory of hippocampal function in episodic memory. **Frontiers in Neural Circuits**, [s. l.], v. 7, n. June, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2013.00088/abstract>>

COBOS, Inma et al. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1059–1068, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007083>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

COLIC, Sinisa et al. Low frequency-modulated high frequency oscillations in seizure-like events recorded from in-vivo MeCP2-deficient mice. In: PROCEEDINGS OF THE ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, EMBS 2013, **Anais...** [s.l: s.n.]

COPPOLA, ANTONIETTA; MOSHE, SOLOMON L. Animal Models. In: **Encyclopedia of Toxicology: Third Edition**. [s.l: s.n.]. v. 107p. 243–245.

COTIC, Marija et al. Spatial coherence profiles of ictal high-frequency oscillations correspond to those of interictal low-frequency oscillations in the ECoG of epileptic patients. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 76–85, 2016.

CURIA, Giulia et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 143–157, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>>

CYMERBLIT-SABBA, A.; SCHILLER, Y. Network Dynamics during Development of Pharmacologically Induced Epileptic Seizures in Rats In Vivo. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1619–1630, 2010. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5078-09.2010>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

DE CURTIS, Marco; AVANZINI, Giuliano. Interictal spikes in focal epileptogenesis. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 541–567, 2001.

DE LANEROLLE, Nihal C.; LEE, Tih Shih; SPENCER, Dennis D. Histopathology of human epilepsy. In: NOBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, Et al. (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). v. 51p. 37.

DENG, Wei; AIMONE, James B.; GAGE, Fred H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 339–350, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn2822>>

DEPAULIS, A.; HAMELIN, S. Animal models for mesiotemporal lobe epilepsy: The end of a misunderstanding? **Revue Neurologique**, [s. l.], v. 171, n. 3, p. 217–226, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2015.01.558>>

DEVINSKY, Orrin et al. Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. May, p. 18024, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201824>>

DI CRISTO, Graziella. Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. **Clinical Genetics**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 1–8, 2007.

DUGLADZE, T. et al. Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 104, n. 44, p. 17530–17535, 2007. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0708301104>>

EL-HASSAR, Lynda et al. Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 578, n. 1, p. 193–211, 2007.

- EL-HASSAR, Lynda; ESCLAPEZ, Monique; BERNARD, Christophe. Hyperexcitability of the CA1 hippocampal region during epileptogenesis. **Epilepsia**, [s. l.], v. 48, n. SUPPL. 5, p. 131–139, 2007.
- ELAHIAN, Bahareh et al. Low-voltage fast seizures in humans begin with increased interneuron firing. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 588–600, 2018.
- ENGEL, Jerome. Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? **The Neuroscientist**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 340–352, 2001.
- ESPINOSA-JOVEL, Camilo et al. Epidemiological profile of epilepsy in low income populations. **Seizure**, [s. l.], v. 56, p. 67–72, 2018.
- ESPINOSA, Nelson et al. Basal forebrain somatostatin cells differentially regulate local gamma oscillations and functionally segregate motor and cognitive circuits. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- FALCO-WALTER, Jessica J.; SCHEFFER, Ingrid E.; FISHER, Robert S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 139, n. July 2017, p. 73–79, 2018.
- FALLING, The. The History and Stigma of Epilepsy. **Epilepsia**, [s. l.], v. 44, p. 12–14, 2003.
- FISHER, Robert S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Zeitschrift fur Epileptologie**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 272–281, 2018.
- FISHER, Robert S.; BONNER, Anna M. The Revised Definition and Classification of Epilepsy for Neurodiagnostic Technologists. **Neurodiagnostic Journal**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21646821.2018.1428455>>
- FRAUSCHER, Birgit et al. High-frequency oscillations: The state of clinical research. **Epilepsia**, [s. l.], v. 58, n. 8, p. 1316–1329, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5806699/pdf/nihms931704.pdf>>
- FU, Xiaoxuan et al. Negative effects of interictal spikes on theta rhythm in human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.07.014>>
- GAGLIANO, Laura et al. Bilateral preictal signature of phase-amplitude coupling in canine epilepsy. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 139, n. July 2017, p. 123–128, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.11.009>>
- GELMAN, Diego M.; MARÍN, Oscar. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 2136–2141, 2010.
- GONZÁLEZ, Oscar C. et al. Role of KCC2-dependent potassium efflux in 4-Aminopyridine-induced Epileptiform synchronization. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 137–147, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996117302371>>
- GRONE, Brian P.; BARABAN, Scott C. Animal models in epilepsy research: Legacies and new directions. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 339–343, 2015.
- GU, Lihua; ZHANG, Zhijun. Exploring Potential Electrophysiological Biomarkers in Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis of Event-Related Potential Studies. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 1283–1292, 2017.
- GUAZZI, Milena; STRIANO, Pasquale. GABA strikes down again in epilepsy. **Annals of Translational Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 57–57, 2019.
- GUIRGIS, Mirna et al. Defining regions of interest using cross-frequency coupling in extratemporal lobe epilepsy patients. **Journal of Neural Engineering**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2015.
- GUPTA, Jyoti et al. Restrained Dendritic Growth of Adult-born Granule Cells Innervated by Transplanted Fetal GABAergic Interneurons in Mice with Temporal Lobe Epilepsy. **Eneuro**, [s. l.], v. 6, n. April, p. ENEURO.0110-18.2019, 2019. Disponível em: <<http://eneuro.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0110-18.2019>>

18.2019>

HAMMOND, Constance. The adult hippocampal network. In: **Cellular and Molecular Neurophysiology: Fourth Edition**. Fourth Edi ed. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2015. p. 393–409.

HENDERSON, Katharine W. et al. Long-Term Seizure Suppression and Optogenetic Analyses of Synaptic Connectivity in Epileptic Mice with Hippocampal Grafts of GABAergic Interneurons. [s. l.], v. 34, n. 40, p. 13492–13504, 2014.

HÖLLER, Peter; TRINKA, Eugen; HÖLLER, Yvonne. High-Frequency Oscillations in the Scalp Electroencephalogram: Mission Impossible without Computational Intelligence. **Computational Intelligence and Neuroscience**, [s. l.], v. 2018, p. 1–9, 2018.

HÖLLER, Yvonne; HELMSTAEDTER, Christoph; LEHNERTZ, Klaus. Quantitative Pharmacoelectroencephalography in Antiepileptic Drug Research. **CNS Drugs**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 839–848, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40263-018-0557-x>>

HORWITZ, Barry. The elusive concept of brain connectivity. **NeuroImage**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 466–470, 2003.

HOWARD, MacKenzie A.; BARABAN, Scott C. Synaptic integration of transplanted interneuron progenitor cells into native cortical networks. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 472–478, 2016.

HSIEH, Jui-Yi; BARABAN, Scott C. Medial Ganglionic Eminence Progenitors Transplanted into Hippocampus Integrate in a Functional and Subtype-Appropriate Manner. **Eneuro**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. ENEURO.0359-16.2017, 2017.

HU, H.; GAN, J.; JONAS, P. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. **Science**, [s. l.], v. 345, n. 6196, p. 1255263–1255263, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1255263>>

HUANG, Z. Josh; PAUL, Anirban. The diversity of GABAergic neurons and neural communication elements. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41583-019-0195-4>>

HUNT, Robert F.; BARABAN, Scott C. Interneuron Transplantation as a Treatment for Epilepsy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. a022376, 2015. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a022376>>

INOSTROZA, M. et al. Specific Impairment of “What-Where-When” Episodic-Like Memory in Experimental Models of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 33, n. 45, p. 17749–17762, 2013. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0957-13.2013>>

JACOBS, Daniel et al. Classification of Pre-Clinical Seizure States using Scalp EEG Cross-Frequency Coupling Features. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [s. l.], v. XX, n. X, p. 1–11, 2018.

JIANG, X.; LACHANCE, M.; ROSSIGNOL, E. Involvement of cortical fast-spiking parvalbumin-positive basket cells in epilepsy. **Progress in Brain Research**, [s. l.], v. 226, p. 81–126, 2016.

KALEMAKI, Katerina et al. Mice With Decreased Number of Interneurons Exhibit Aberrant Spontaneous and Oscillatory Activity in the Cortex. **Frontiers in Neural Circuits**, [s. l.], v. 12, n. October, 2018.

KANDEL, Eric. **Principles of Neural Science**. 5a edição ed. [s.l.] : McGraw-Hill Companies, 2013.

KANDRATAVICIUS, Ludmyla et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, [s. l.], p. 1693, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2147/NDT.S50371>>

KANN, Oliver. The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 90, p. 75–85, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.005>>

KAPUR, Jaideep. Dormant Basket Cell Hypothesis Revisited ... Again. **Epilepsy Currents**, [s. l.], v. 3,

n. 6, p. 223–224, 2003. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1046/j.1535-7597.2003.03604.x>>

KARUNAKARAN, Suganya; GRASSE, Dane W.; MOXON, Karen A. Role of CA3 theta-modulated interneurons during the transition to spontaneous seizures abbreviated title: Theta-modulated interneurons and seizures. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 283, p. 341–352, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.027>>

KELLY, Mary E.; COULTER, Douglas A. The Pilocarpine Model of Acquired Epilepsy. In: **Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition**. Second Edi ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. p. 625–636.

KEPECS, Adam; FISHELL, Gordon. Interneuron Cell Types: Fit to form and formed to fit. **Nature**, [s. l.], v. 505, n. 7483, p. 318–326, 2014.

KHAZIPOV, Roustem. GABAergic Synchronization in Epilepsy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. a022764, 2016. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a022764>>

KHOSHKHOO, Sattar; VOGT, Daniel; SOHAL, Vikaas S. Dynamic, Cell-Type-Specific Roles for GABAergic Interneurons in a Mouse Model of Optogenetically Inducible Seizures. **Neuron**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 291–298, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.043>>

KLAUSBERGER, Thomas et al. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. **Nature**, [s. l.], v. 421, n. 6925, p. 844–848, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature01374>>

KLAUSBERGER, Thomas; SOMOGYI, Peter. Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. **Science**, [s. l.], v. 321, n. 5885, p. 53–57, 2008.

KNIERIM, James J. The hippocampus. **Current Biology**, [s. l.], v. 25, n. 23, p. R1116–R1121, 2015.

KNOFLACH, Frédéric; HERNANDEZ, Maria Clemencia; BERTRAND, Daniel. GABAA receptor-mediated neurotransmission: Not so simple after all. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 115, p. 10–17, 2016.

KRALIK, Stephen Francis et al. Cognitive decline and white matter changes in mesial temporal lobe epilepsy. **Medicine**, [s. l.], v. 97, n. 33, p. e11803, 2018.

KRISHNAN, Balu et al. A novel spatiotemporal analysis of peri-ictal spiking to probe the relation of spikes and seizures in epilepsy. **Annals of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 1606–1617, 2014.

KUKI, Toshinobu et al. Contribution of parvalbumin and somatostatin-expressing GABAergic neurons to slow oscillations and the balance in beta-gamma oscillations across cortical layers. **Frontiers in Neural Circuits**, [s. l.], v. 9, n. February, p. 1–12, 2015.

LABAT, R. .. *Traité akkadien de diagnostics et pronostics médicaux*. **Revue d'histoire des sciences et de leurs applications**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 374–377, 1952.

LAGARDE, Stanislas et al. Interictal stereotactic-EEG functional connectivity in refractory focal epilepsies. **Brain**, [s. l.], n. August, p. 1–15, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/advance-article/doi/10.1093/brain/awy214/5068681>>

LAGARDE, Stanislas et al. The repertoire of seizure onset patterns in human focal epilepsies: Determinants and prognostic values. **Epilepsia**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 85–95, 2019.

LAPRAY DAMIEN et al. Behavior-dependent specialization of identified hippocampal interneurons. **nature neuroSClenCe**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 1265–1271, 2012.

LEDRI, M. et al. Global Optogenetic Activation of Inhibitory Interneurons during Epileptiform Activity. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 3364–3377, 2014.

LEE, Frankie H. et al. Abnormal interneuron development in disrupted-in-schizophrenia-1 L100P mutant



mice. **Molecular brain**, [s. l.], v. 6, p. 20, 2013.

LEE, Haejin et al. Human fetal brain-derived neural stem/progenitor cells grafted into the adult epileptic brain restrain seizures in rat models of temporal lobe epilepsy. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2014.

LEITE, João Pereira; GARCIA-CAIRASCO, Norberto; CAVALHEIRO, Esper. .. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 50, n. 1–2, p. 93–103, 2002. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002288054>>

LEVESQUE, M. et al. Two Seizure-Onset Types Reveal Specific Patterns of High-Frequency Oscillations in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 38, p. 13264–13272, 2012.

LÉVESQUE, Maxime; AVOLI, Massimo; BERNARD, Christophe. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 260, p. 45–52, 2016.

LI, Lin et al. Extrahippocampal high-frequency oscillations during epileptogenesis. **Epilepsia**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. e51–e55, 2018.

LILLEKER, James B.; BISWAS, Viveka; MOHANRAJ, Rajiv. Glutamic acid decarboxylase (GAD) antibodies in epilepsy: Diagnostic yield and therapeutic implications. **Seizure**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 598–602, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2014.04.009>>

LIU, Yan et al. Medial ganglionic eminence–like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 440–447, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nbt.2565>>

LOPEZ-PIGOZZI, D. et al. Altered Oscillatory Dynamics of CA1 Parvalbumin Basket Cells during Theta-Gamma Rhythmopathies of Temporal Lobe Epilepsy. **eNeuro**, [s. l.], v. 3, n. 6, 2016. Disponível em: <<http://eneuro.sfn.org/cgi/doi/10.1523/ENEURO.0284-16.2016>>

LÖSCHER, Wolfgang. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 1873–1888, 2017.

MACCOTTA, Luigi et al. Beyond the CA1 subfield: Local hippocampal shape changes in MRI-negative temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 780–788, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.12955>>

MAGIORKINIS, Emmanouil; SIDIROPOULOU, Kalliopi; DIAMANTIS, Aristidis. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 103–108, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.10.023>>

MAGLOIRE, Vincent et al. GABAergic Interneurons in Seizures: Investigating Causality With Optogenetics. **Neuroscientist**, [s. l.], 2018.

MALMGREN, Kristina; THOM, Maria. Hippocampal sclerosis-Origins and imaging. **Epilepsia**, [s. l.], v. 53, n. SUPPL. 4, p. 19–33, 2012.

MANN, Edward O.; PAULSEN, Ole. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 343–349, 2007.

MATHALON, Daniel H.; SOHAL, Vikaas S. Neural oscillations and synchrony in brain dysfunction and neuropsychiatric disorders it's about time. **JAMA Psychiatry**, [s. l.], v. 72, n. 8, p. 840–844, 2015.

MEIER, Ralph et al. Short-term changes in bilateral hippocampal coherence precede epileptiform events. **NeuroImage**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 138–149, 2007.

MILLETT, David. Hans Berger: From Psychic Energy to the EEG. **Perspectives in Biology and Medicine**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 522–542, 2001. Disponível em: <[http://muse.jhu.edu/content/crossref/journals/perspectives\\_in\\_biology\\_and\\_medicine/v044/44.4millet](http://muse.jhu.edu/content/crossref/journals/perspectives_in_biology_and_medicine/v044/44.4millet)>

.html>

MIRI, Mitra L. et al. Altered hippocampal interneuron activity precedes ictal onset. **eLife**, [s. l.], v. 7, p. 1–20, 2018.

MOXON, Karen A. et al. From adagio to allegretto: The changing tempo of theta frequencies in epilepsy and its relation to interneuron function. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 129, n. November 2018, p. 169–181, 2019.

MÜLLER, Christina; REMY, Stefan. Septo–hippocampal interaction. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 373, n. 3, p. 565–575, 2018.

NAFTULIN, Jason S. et al. Ictal and preictal power changes outside of the seizure focus correlate with seizure generalization. **Epilepsia**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 1398–1409, 2018.

NARIAI, Hiroki et al. Ictal high-frequency oscillations at 80-200 Hz coupled with delta phase in epileptic spasms. **Epilepsia**, [s. l.], v. 52, n. 10, p. e130-4, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3674760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

NAVARRO MORA, Graciela et al. Does pilocarpine-induced epilepsy in adult rats require status epilepticus? **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 6, 2009.

NIMMRICH, Volker; DRAGUHN, Andreas; AXMACHER, Nikolai. Neuronal Network Oscillations in Neurodegenerative Diseases. **NeuroMolecular Medicine**, [s. l.], 2015.

NISSEN, Ida A. et al. Localization of the Epileptogenic Zone Using Interictal MEG and Machine Learning in a Large Cohort of Drug-Resistant Epilepsy Patients. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 9, n. August, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2018.00647/full>>

PAIVA, Daisyléa de Souza et al. Transplantation of inhibitory precursor cells from medial ganglionic eminence produces distinct responses in two different models of acute seizure induction. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 70, p. 125–130, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.03.015>>

PANTELIADIS, Christos P. et al. Historical documents on epilepsy: From antiquity through the 20th century. **Brain and Development**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 457–463, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2017.02.002>>

PASQUETTI, M. V. et al. Increased seizure susceptibility in an animal model of glutaric acidemia type I. **Epilepsy & Behavior**, [s. l.], v. 38, p. 204–205, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505014003643>>

PAXINOS, George; WATSON, Charles. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l: s.n.]. v. 7

PELKEY, Kenneth A. et al. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 1619–1747, 2017.

PELLEGRINO, Giovanni et al. Slow Activity in Focal Epilepsy during Sleep and Wakefulness. **Clinical EEG and Neuroscience**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 200–208, 2017.

PERUCCA, Piero; DUBEAU, François; GOTMAN, Jean. Intracranial electroencephalographic seizure-onset patterns: Effect of underlying pathology. **Brain**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 183–196, 2014.

PESARAN, Bijan et al. Investigating large-scale brain dynamics using field potential recordings: analysis and interpretation. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 21, n. July, p. 1–17, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0171-8>>

PETILLA, The et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. **Nature reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 557–68, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2868386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

PLA, Ramon et al. Dlx1 and Dlx2 Promote Interneuron GABA Synthesis, Synaptogenesis, and Dendritogenesis. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 3797–3815, 2018.

QUILICHINI, Pascale P. et al. Hub GABA Neurons Mediate Gamma-Frequency Oscillations at Ictal-like Event Onset in the Immature Hippocampus. **Neuron**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 57–64, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731200181X>>

RACINE, Ronald J. Modification of seizure activity by electrical modification of after-discharge. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 32, p. 281–294, 1972. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/0013469472901770/1-s2.0-0013469472901770-main.pdf?\\_tid=eb2b4ab8-4f74-4878-85a2-e7753e50eb04&acdnat=1525166976\\_62ef7d695a5275b96dff44ff3876c892](https://ac.els-cdn.com/0013469472901770/1-s2.0-0013469472901770-main.pdf?_tid=eb2b4ab8-4f74-4878-85a2-e7753e50eb04&acdnat=1525166976_62ef7d695a5275b96dff44ff3876c892)>

RACINE, Ronald J.; GARTNER, John G.; MCINTYRE BURNHAM, W. Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. **Brain Research**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 262–268, 1972.

REYES-GARCIA, Selvin Z. et al. Different patterns of epileptiform-like activity are generated in the sclerotic hippocampus from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

REYNOLDS, E. H. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a babylonian treatise on epilepsy. **Medical History**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 185–198, 1990.

ROACH, Brian J.; MATHALON, Daniel H. Event-related EEG time-frequency analysis: An overview of measures and an analysis of early gamma band phase locking in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 907–926, 2008.

ROMARIZ, Simone A. A. et al. Medial Ganglionic Eminence Cells Freshly Obtained or Expanded as Neurospheres Show Distinct Cellular and Molecular Properties in Reducing Epileptic Seizures. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 127–134, 2017.

RUDOLPH, Uwe; KNOFLACH, Frédéric. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 685–697, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd3502>>

SALAMI, Pariya et al. Dynamics of interictal spikes and high-frequency oscillations during epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 67, p. 97–106, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.12228>>

SALAZAR, Patricia; TAPIA, Ricardo. Epilepsy and hippocampal neurodegeneration induced by glutamate decarboxylase inhibitors in awake rats. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 116, p. 27–33, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.06.014>>

SAMIEE, Soheila et al. Phase-amplitude coupling and epileptogenesis in an animal model of mesial temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 114, n. February, p. 111–119, 2018. a.

SAMIEE, Soheila et al. Phase-amplitude coupling and epileptogenesis in an animal model of mesial temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 114, p. 111–119, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.02.008>>

SANDBERG, Magnus et al. Transcriptional Networks Controlled by NKX2-1 in the Development of Forebrain GABAergic Neurons. **Neuron**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 1260–1275, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627316305128>>

SANDER, Josemir W. The epidemiology of epilepsy revisited. [Curr Opin Neurol. 2003] - PubMed result. **Current opinion in neurology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 165–70, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644744>>

SCHEFFER-TEIXEIRA, Robson et al. Theta phase modulates multiple layer-specific oscillations in the CA1 region. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 2404–2414, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079925>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

SCHEFFER-TEIXEIRA, Robson; TORT, Adriano B. L. Unveiling Fast Field Oscillations through

Comodulation. **Eneuro**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. ENEURO.0079-17.2017, 2017. Disponível em: <<http://eneuro.sfn.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0079-17.2017>>

SCHIEFFER, Ingrid E. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 512–521, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13709>>

SCHULTZ, Christian; ENGELHARDT, Maren. Anatomy of the hippocampal formation. **The Hippocampus in Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 34, p. 6–17, 2014.

SERIKAWA, Tadao et al. Advances on genetic rat models of epilepsy. **Experimental Animals**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/64/1/64\\_14-0066/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/64/1/64_14-0066/_article)>

SESSOLO, M. et al. Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons Oppose Propagation But Favor Generation of Focal Epileptiform Activity. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 26, p. 9544–9557, 2015.

SHIBATA, Takashi; KOBAYASHI, Katsuhiro. Epileptic high-frequency oscillations in scalp electroencephalography. **Acta Medica Okayama**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 325–329, 2018.

SHORVON, Simon D. The etiological classification of epilepsy. **The Causes of Epilepsy: Common and Uncommon Causes in Adults and Children**, [s. l.], v. 9780521114, n. 6, p. 21–23, 2011.

SINGH, Anuradha; TREVICK, Stephen. The Epidemiology of Global Epilepsy. **Neurologic Clinics**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 837–847, 2016.

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

SLOVITER, Robert S. et al. Abnormal dentate gyrus network circuitry in temporal lobe epilepsy. In: NOEBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, Et al. (Ed.). **Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 5th ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). p. 1–20.

SOHAL, Vikaas S. et al. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. **Nature**, [s. l.], v. 459, n. 7247, p. 698–702, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature07991>>

SONG, Inkyung et al. Bimodal coupling of ripples and slower oscillations during sleep in patients with focal epilepsy. **Epilepsia**, [s. l.], v. 58, n. 11, p. 1972–1984, 2017.

SOUKUPOVÁ, Marie et al. Impairment of GABA release in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 257, p. 39–49, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.014>>

SPRUSTON, Nelson. Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 206–221, 2008.

SUBOTA, Ann et al. Signs and symptoms of the postictal period in epilepsy: A systematic review and meta-analysis. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 94, p. 243–251, 2019.

TEJADA, S. et al. Electroencephalogram functional connectivity between rat hippocampus and cortex after pilocarpine treatment. **Neuroscience**, [s. l.], v. 165, n. 2, p. 621–631, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.031>>

TÉLLEZ-ZENTENO, Jose F.; HERNÁNDEZ-RONQUILLO, Lizbeth. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. **Epilepsy Research and Treatment**, [s. l.], v. 2012, p. 1–5, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ert/2012/630853/>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

THOMSCHEWSKI, Aljoscha; HINCAPIÉ, Ana-Sofía; FRAUSCHER, Birgit. Localization of the Epileptogenic Zone Using High Frequency Oscillations. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 10, n. February, 2019.

- TOMLINSON, Samuel B. et al. Alterations of network synchrony after epileptic seizures: An analysis of post-ictal intracranial recordings in pediatric epilepsy patients. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 143, n. August 2017, p. 41–49, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.04.003>>
- TONG, L. M. et al. Inhibitory Interneuron Progenitor Transplantation Restores Normal Learning and Memory in ApoE4 Knock-In Mice without or with A Accumulation. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 29, p. 9506–9515, 2014.
- TORT, A. B. L. et al. Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 51, p. 20517–20522, 2008. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0810524105>>
- TORT, A. B. L. et al. Measuring Phase-Amplitude Coupling Between Neuronal Oscillations of Different Frequencies. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 1195–1210, 2010. Disponível em: <<http://jn.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jn.00106.2010>>
- TORT, Adriano B. L. et al. Theta-associated high-frequency oscillations (110-160Hz) in the hippocampus and neocortex. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 1–14, 2013.
- TORT, Adriano B. L.; BRANKAČK, Jurij; DRAGUHN, Andreas. **Respiration-Entrained Brain Rhythms Are Global but Often Overlooked Trends in Neurosciences**, 2018.
- TOYODA, I. et al. Unit Activity of Hippocampal Interneurons before Spontaneous Seizures in an Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 16, p. 6600–6618, 2015. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4786-14.2015>>
- TREIMAN, David M. GABAergic mechanisms in epilepsy. **Epilepsia**, [s. l.], v. 42, n. SUPPL. 3, p. 8–12, 2001.
- TRINKA, Eugen et al. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 1515–1523, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13121>>
- TURSKI, Waldemar A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 315–335, 1983. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166432883901365>>
- TYSON, Jennifer A.; ANDERSON, Stewart A. GABAergic interneuron transplants to study development and treat disease. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 169–177, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223614000046>>
- UPADHYA, Dinesh et al. Human induced pluripotent stem cell-derived MGE cell grafting after status epilepticus attenuates chronic epilepsy and comorbidities via synaptic integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 287–296, 2019. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1814185115>>
- VECCHIO, Fabrizio et al. Pre-seizure architecture of the local connections of the epileptic focus examined via graph-theory. **Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 127, n. 10, p. 3252–3258, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2016.07.006>>
- VEIT, Julia et al. Cortical gamma band synchronization through somatostatin interneurons. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 951–959, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.4562>>
- VENDRAMIN PASQUETTI, Mayara et al. Hippocampal CA1 and cortical interictal oscillations in the pilocarpine model of epilepsy. **Brain Research**, [s. l.], v. 1722, n. July, p. 146351, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899319304056>>
- WANG, Chi Han et al. Hippocampal desynchronization of functional connectivity prior to the onset of status epilepticus in pilocarpine-treated rats. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2012.

WANG, Yi et al. Depolarized GABAergic Signaling in Subicular Microcircuits Mediates Generalized Seizure in Temporal Lobe Epilepsy. **Neuron**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 92- 105.e5, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.004>>

WEI, Wei et al. More severe extratemporal damages in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis than that with other lesions: A multimodality MRI study. **Medicine (United States)**, [s. l.], v. 95, n. 10, p. 1–9, 2016.

WEISS, Shennan A. et al. Interneurons and principal cell firing in human limbic areas at focal seizure onset. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 124, p. 183–188, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096999611830682X>>

WICHTERLE, H. et al. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 128, n. 19, p. 3759–71, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585802>>

WOMELSDORF, Thilo et al. Modulation of neuronal interactions through neuronal synchronization. **Science**, [s. l.], v. 316, n. 5831, p. 1609–1612, 2007.

WONDERS, Carl; ANDERSON, Stewart A. Cortical interneurons and their origins. **Neuroscientist**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 199–205, 2005.

WULFF, P. et al. Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 9, p. 3561–3566, 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0813176106>>

YACUBIAN, Elza Márcia Targas; KOCHEN, Silvia. **Crises Epilépticas**. 1. ed. São Paulo: Leitura Médica Ltda, 2014.

YE, Hui; KASZUBA, Stephanie. Inhibitory or excitatory? Optogenetic interrogation of the functional roles of GABAergic interneurons in epileptogenesis. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1–9, 2017.

ZHANG, Ruihua et al. **Temporal-spatial characteristics of phase-amplitude coupling in electrocorticogram for human temporal lobe epilepsy**. [s.l: s.n.]. v. 128

ZHU, Qian; NAEGELE, Janice R.; CHUNG, Sangmi. Cortical GABAergic Interneuron/Progenitor Transplantation as a Novel Therapy for Intractable Epilepsy. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. June, 2018.

ZIJLMANS, Maeike et al. High-frequency oscillations as a new biomarker in epilepsy. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 169–178, 2012.

ZIPANCIC, I. et al. Transplant of GABAergic precursors restores hippocampal inhibitory function in a mouse model of seizure susceptibility. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 549–564, 2010.

## ANEXO I



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 27272

**Título:** ESTUDO DAS FREQUENCIAS E DO ACOPLAMENTO DE FREQUÊNCIAS HIPOCAMPAIS E DA PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS GABAÉRGICOS EM MÓDELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MARIA ELISA CALCAGNOTTO - coordenador desde 01/06/2014  
MAYARA VENDRAMIN PASQUETTI - Aluno de Doutorado desde 01/06/2014  
Letícia Meier Pereira - Aluno de Mestrado desde 01/06/2014

**Equipe Externa:**

Adriano B. Tort - pesquisador desde 01/06/2014

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 09/06/2014 - Sala Multiuso da Biblioteca Central - Prédio da Reitoria - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 130 ratos wistar, machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.**

Porto Alegre, Sexta-Feira, 27 de Junho de 2014

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética