

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

Letícia Barbieri Caus

**AVALIAÇÃO ELETROENCEFALOGRÁFICA DA EPILEPTOGÊNESE DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO EM UM MODELO DE DUPLO-INSULTO: ANIMAIS WAR  
COM MICROGIRIA CORTICAL**

Porto Alegre

2023

Letícia Barbieri Caus

**AVALIAÇÃO ELETROENCEFALOGRÁFICA DA EPILEPTOGÊNESE DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO EM UM MODELO DE DUPLO-INSULTO: ANIMAIS WAR  
COM MICROGIRIA CORTICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Barbieri Caus, Leticia  
AVALIAÇÃO ELETROENCEFALOGRÁFICA DA EPILEPTOGÊNESE  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO EM UM MODELO DE  
DUPLO-INSULTO: ANIMAIS WAR COM MICROGIRIA CORTICAL /  
Leticia Barbieri Caus. -- 2023.  
78 f.  
Orientadora: Maria Elisa Calcagnotto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Neurociências,  
Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Malformações do desenvolvimento cortical. 2.  
Polimicrogiria. 3. Modelo de duplo-insulto. 4.  
Epileptogênese. 5. Oscilações cerebrais. I.  
Calcagnotto, Maria Elisa, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos Departamentos de Neurociências e Bioquímica. A UFRGS foi minha segunda casa por nove anos, e a Bioquímica quase minha primeira pelos últimos quatro. É somente um até logo.

À minha orientadora, Maria Elisa, que me mostrou uma imensidão de paciência e cooperação durante os oito anos em que trabalhamos juntas. Os caminhos que nos juntaram foram inesperados, mas não poderia ter esperado uma parceria melhor.

Aos meus pais, que não me deram só a minha vida, mas a deles também. Cujo amor e paciência me fizeram ser quem eu sou. Que me prepararam para voar. E que me fizeram persistir.

À minha irmã, quem me conhece como gente antes mesmo de eu me conhecer. Quis o Universo que viéssemos juntas à vida e agora eu sei que é por sermos um equilíbrio perfeito uma para a outra.

Ao Gabriel, cujo único defeito é ser gremista. A tua calma me acalma e freia minha tempestade. Fico muito contente de ter dividido o final desta jornada contigo.

Às meninas da Terapia do Ranço, que viram todo o caminho desta dissertação do início ao fim. Os surtos ficaram mais leves com a companhia e o apoio de vocês.

Ao pessoal do Lab 37, da Bioquímica e do NAE que tiveram uma parte muito importante na elaboração dessa dissertação. Sem a ajuda de vocês este trabalho não teria sido possível.

Aos meus amigos, que conheço desde o início da vida ou há apenas algumas semanas. Aos que conheci no colégio, na faculdade, nas ruas de POA ou nas telas. Ao TPC BR e ao Grupinho do Amor. Vocês fizeram tudo ser mais fácil.

Às pessoas que conheci na Hostinger em quase dois anos, principalmente à Mari, à Thaís, ao Martins (que provavelmente irá reconhecer a música da citação), ao Patrick e à gurizada do Let Squad. Eu não poderia ter feito amigos melhores, liderar pessoas melhores ou crescer tanto em tão pouco tempo.

*"I feel hope  
Deep in my bones  
Tomorrow  
Will be beautiful"  
Seven – Sleeping at Last*

## RESUMO

As malformações do desenvolvimento cortical (MDC) ocorrem por ruptura em qualquer uma das etapas do desenvolvimento cortical *in utero*. A polimicrogiria (PMG) é uma MDC da organização cortical, na qual há padrões anormais de sulcos e giros e a formação de múltiplos microgiros, sendo comumente encontrada em pacientes, englobando 20% de todos os diagnósticos de MDC. Estima-se que até 75% dos pacientes com MDC desenvolvam epilepsias, sendo que cerca de 40% das epilepsias na infância refratárias ao tratamento medicamentoso são causadas pelas MDC, que causam reorganização da rede neural e aumento da epileptogênese. A epileptogênese é um processo progressivo e contínuo de alterações moleculares, celulares e de conectividade neural, aumentando a sincronia e causando hiperexcitabilidade, levando ao desenvolvimento de crises epiléticas espontâneas. Este processo de epileptogênese pode ser primário, desenvolvendo-se no local das alterações, e pode tornar-se secundário com recrutamento de circuitos de áreas à distância ou até mesmo inter-hemisféricas. O modelo de microgiria induzida por criolesão cortical neonatal tem sido amplamente utilizado para investigar a epileptogênese relacionada à presença de MDC, porém ele apresenta raras crises epiléticas espontâneas, o que torna o uso de um modelo de duplo-insulto, como o modelo de microgiria induzida em ratos susceptíveis a crises audiogênicas (WAR-MDC), uma alternativa para a investigação da epileptogênese nas MDC. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros das oscilações corticais, talâmicas e hipocâmpais interictais *in vivo* no modelo WAR-MDC, a fim de identificar suas relações com os processos de epileptogênese primária e secundária. Para isso, a análise quantitativa de registros eletroencefalográficos *in vivo* foi realizada no modelo de duplo-insulto, assim como em animais Wistar com e sem microgiria e em animais WAR sem microgiria. Verificou-se que o modelo de duplo-insulto apresenta alterações no padrão de oscilações em múltiplas regiões cerebrais, destacando-se a diminuição na potência das oscilações teta cortical e hipocâmpal ipsilateral à microgiria e independente da idade, o aumento da potência da oscilação delta nas regiões talâmica e hipocâmpal e a diminuição da potência das oscilações gama no hipocampo e no córtex. Estes dados reforçam a possibilidade do uso do modelo de duplo-insulto para a investigação do processo de epileptogênese refratária associada a MDC.

Palavras-chave: Malformações do desenvolvimento cortical, Polimicrogiria, Modelo de duplo-insulto, Epileptogênese, Oscilações cerebrais.

## ABSTRACT

Developmental cortical malformations (DCM) are caused by alterations at any step of *in utero* cortical development. Polymicrogyria (PMG) is a DCM of cortical organization in which there are unusual patterns of sulci and gyri and the formation of multiple microgyria, corresponding to about 20% of all DCM. It is estimated that 75% of patients with DCM develop epilepsy. In addition, approximately 40% of refractory epilepsies during childhood are caused by DCM associated with the reorganization of neural networks and an increase in epileptogenesis. Epileptogenesis is a progressive and continuous process of molecular, cellular and neural connectivity alterations, leading to an increase in hyperexcitability and synchrony and finally to the development of spontaneous seizures. The epileptogenesis process can be primary, developed at the site of the brain alteration, but it can become secondary with the recruitment of distant circuits at intra- and interhemispheric areas. The model of microgyria induced by neonatal cortical freeze-lesion is widely used to investigate the epileptogenesis associated with DCM. However, this model shows rare spontaneous seizures, which makes the use of a double-hit model an alternative to investigate epileptogenesis in DCM. One example of a double-hit model is to induce microgyria (DCM) in rats susceptible to audiogenic seizures like the Wistar Audiogenic Rats (WAR). Therefore, the objective of this work was to evaluate parameters of cortical, thalamic and hippocampal interictal oscillations *in vivo* in the WAR-DCM model in order to identify their relations to primary and secondary epileptogenesis processes. The quantitative analysis of *in vivo* electroencephalographic recordings was conducted in the WAR animals as well as in Wistar rats with and without microgyria. We were able to observe that the double-hit model (WAR-DCM) showed alterations in the oscillation pattern in multiple brain regions. Highlights include the diminished power of cortical and hippocampal theta oscillations ipsilateral to the microgyria. Regardless of age, increased power of thalamic and hippocampal delta oscillation and diminished power of cortical and hippocampal gamma oscillation were detected. Our data reinforce the possibility of using the double-hit model to investigate the refractory epileptogenesis process associated with DCM.

Keywords: Developmental cortical malformation, Polymicrogyria, Double-hit model, Epileptogenesis, Brain oscillations.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ado – Idade da adolescência

AMPA - Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico

DCF – Displasias corticais focais

EEG – Eletroencefalograma

GEE – Equações de estimações generalizadas

HFOs – Oscilações de alta frequência

Juv – Idade juvenil

MDC – Malformações do desenvolvimento cortical

NMDA – N-metil-D-aspartato

P – Dia pós-natal

PMG – Polimicrogiria

SWD – *Spike-wave discharges*

WAR – *Wistar Audiogenic Rats*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1 MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL</b> .....	<b>11</b>
1.1.1 Displasias corticais focais e polimicrogiria .....	12
<b>1.2 OSCILAÇÕES CEREBRAIS E EPILEPTOGÊNESE</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Epileptogênese e MDC .....	18
<b>1.3 MODELO ANIMAL DE MALFORMAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL: MICROGIRIA INDUZIDA POR CRIOLEÇÃO CORTICAL</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4 MODELO ANIMAL DE DUPLO INSULTO: MICROGIRIA EM RATOS DA LINHAGEM WISTAR AUDIOGENIC RATS (WAR)</b> .....	<b>20</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	<b>22</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 GERAIS.....	23
4.2 ESPECÍFICOS .....	23
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
5.1 ANIMAIS .....	23
5.2 INDUÇÃO NA MICROGIRIA POR CRIOLEÇÃO CORTICAL .....	24
5.3 ELETROFISIOLOGIA <i>IN VIVO</i> .....	25
5.3.1 Implantação dos eletrodos .....	27
5.3.2 Registros eletrofisiológicos <i>in vivo</i> (vídeo-EEG) .....	28
5.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	29
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	30
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	<b>64</b>

<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
---------------------------	-----------

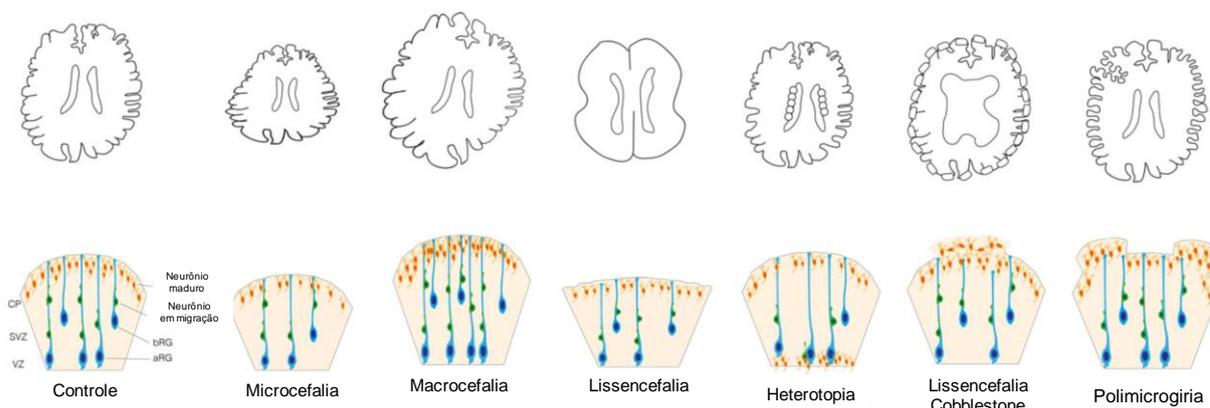
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL

O desenvolvimento e a organização apropriados do córtex cerebral humano dependem da regulação altamente precisa de diversas etapas, incluindo a proliferação dos progenitores celulares, a diferenciação correta desses progenitores, a migração celular e sua organização em camadas, formando uma estrutura funcional cortical (GUERRINI; BARBA, 2010; SUBRAMANIAN; CALCAGNOTTO; PAREDES, 2020). Neste contexto, as malformações do desenvolvimento cortical (MDC) compreendem um conjunto heterogêneo de desordens que resultam na perturbação de qualquer uma das etapas do desenvolvimento cortical humano *in utero* (GUERRINI; DOBYNS, 2014; OEGEMA *et al.*, 2020). A classificação das MDC baseia-se principalmente no estágio de desenvolvimento mais inicial que é perturbado, levando também em conta o panorama genético e alterações em exames de imagem vistas nos pacientes, resultando em três principais categorias: malformações secundárias à proliferação ou apoptose anormais de neurônios ou células gliais; malformações por migração neuronal anormal; e malformações secundárias ao desenvolvimento pós-migracional anormal (BARKOVICH *et al.*, 2012; GUERRINI; DOBYNS, 2014). A Figura 1 traz alguns exemplos de MDC, assim como a citoarquitetura envolvida em cada uma delas.

As alterações anatômicas e funcionais das MDC são heterogêneas, variando conforme o período do desenvolvimento afetado, a alteração genética envolvida, a severidade do insulto e também fatores ambientais, como infecções intrauterinas (DESIKAN; BARKOVICH, 2016; LEVENTER; GUERRINI; DOBYNS, 2008; PANG; ATEFY; SHEEN, 2008). Embora não haja consenso quanto à incidência das MDC durante a infância, sabe-se que essas desordens são causa comum de atrasos no desenvolvimento, paralisia cerebral, autismo e também epilepsias, sendo as epilepsias e desordens de funções corticais superiores as manifestações clínicas mais comuns das malformações corticais (GUERRINI; BARBA, 2010; OEGEMA *et al.*, 2020). Estima-se que até 75% dos pacientes com MDC desenvolvam epilepsias, sendo as MDC responsáveis por até 40% das epilepsias manifestadas durante a infância que são refratárias aos medicamentos atualmente disponíveis (LEVENTER;

GUERRINI; DOBYNS, 2008). Técnicas cirúrgicas de ressecção do foco epileptogênico podem beneficiar estes pacientes, porém esta abordagem nem sempre é possível, uma vez que a extensão da lesão e a impossibilidade de acesso ou identificação das lesões associadas à epileptogênese podem ser fatores que tornam o uso destas técnicas pouco eficiente ou inadequado (GUERRINI; BARBA, 2010).

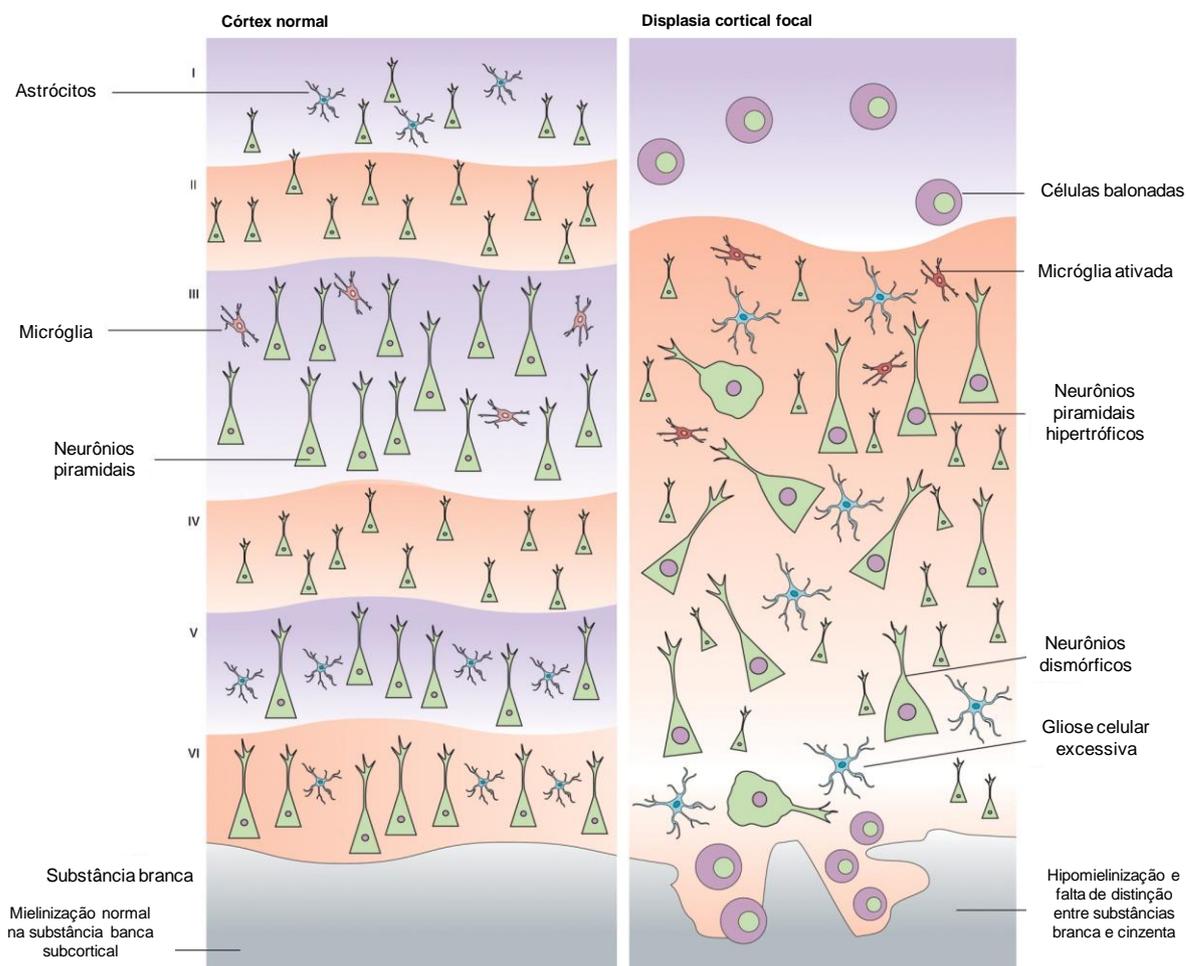


**Figura 1.** Tipos de MDC e esquematizações de sua apresentação macroscópica, com alterações ventriculares e na organização dos giros e sulcos (acima) e microscópica, mostrando modificações na estrutura das camadas corticais, na organização dos tipos celulares e na proporção entre as células neurais (abaixo). **CP**: placa cortical; **SVZ**: região subventricular; **VZ**: zona ventricular; **bRG**: glia radial basal; **aRG**: glia radial apical. Adaptado de OSSOLA; KALEBIC, 2022

### 1.1.1 Displasias corticais focais e polimicrogiria

Dentre as MDC, as displasias corticais focais (DCF) são comumente vistas em crianças, compreendendo anormalidades na estrutura hexalaminar e na citoarquitetura cortical e incluindo a presença de citomegalia, células balonadas, heterotopia e polimicrogiria (BLÜMCKE *et al.*, 2011) (Figura 2). A hipótese mais abordada do desenvolvimento das DCF indica sua origem a partir de anormalidades de migração, maturação e morte celular durante a ontogênese, levando a um espectro de manifestações histopatológicas e fenotípicas (GUERRINI; BARBA, 2010). Além disso, as DCF são frequentemente relacionadas a epilepsias refratárias em crianças e adultos e também a causa mais comum de epilepsias neocorticais em crianças, sendo que o início dessas epilepsias ocorre geralmente nos primeiros anos de vida (CRINO, 2015; IFFLAND; CRINO, 2017; WONG-KISIEL *et al.*, 2018). A prevalência de DCF em crianças com epilepsias refratárias que passaram por

cirurgias para ressecção do foco epileptiforme chega a 75% (PALMINI; HOLTHAUSEN, 2013).



**Figura 2.** Elementos citoarquitetônicos encontrados em DCF. Adaptada de SISODIYA *et al.*, 2009

A polimicrogiria (PMG), por sua vez, é considerada uma desordem da organização cortical, compreendendo perturbações na migração neuronal e na estrutura laminar cortical (BARKOVICH, 2010). Como resultado, há a fusão de camadas corticais mais internas, espessamento cortical, padrões anormais de sulcos e giros e a formação de múltiplos microgiros no local da lesão (STUTTERD; LEVENTER, 2014). Dentre as malformações corticais, a PMG é a mais comumente encontrada em pacientes, englobando 20% de todos os diagnósticos de MDC (STUTTERD; LEVENTER, 2014).

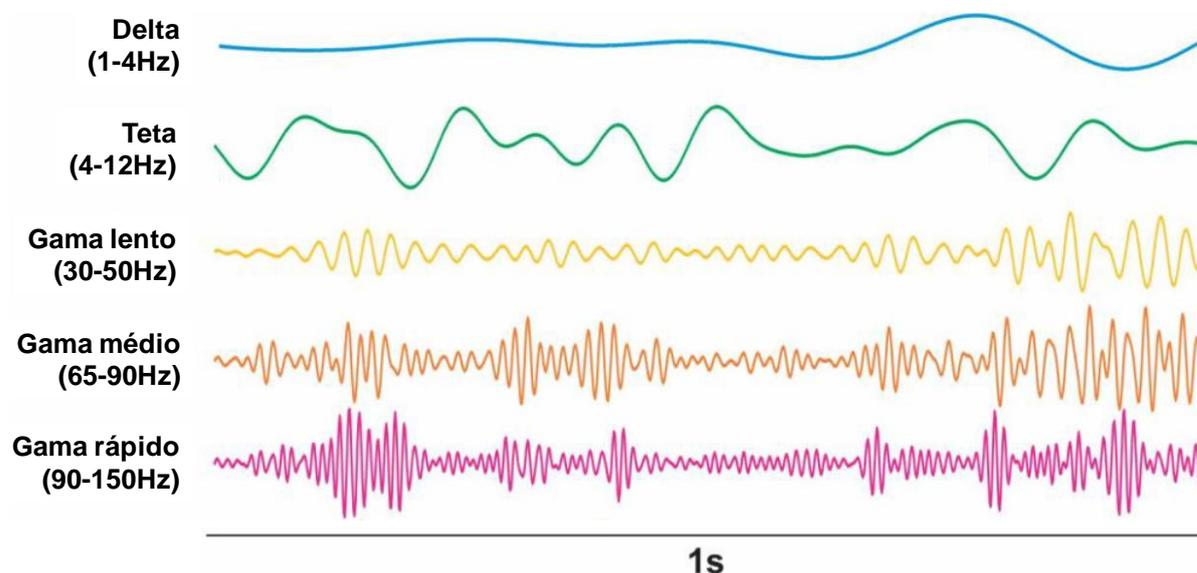
A PMG varia quanto às manifestações clínicas e à abrangência das lesões, podendo ser focal, multifocal ou difusa, e pode afetar qualquer região cortical de forma uni ou bilateral, sendo mais comumente encontrada no lobo frontal

(BARKOVICH, 2010). As manifestações clínicas incluem atrasos no desenvolvimento, hemiparesias e epilepsias, sendo a PMG uma lesão altamente epileptogênica: a incidência de epilepsias em pacientes com esta malformação cortical é de até 87%, dependendo da extensão e da gravidade das lesões, sendo que até 65% dos pacientes apresenta epilepsias refratárias com início durante idades tenras (MAILLARD; RAMANTANI, 2018; SHAIN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016). Assim como para pacientes com epilepsias refratárias associadas a outras MDC, a ressecção cirúrgica do foco epileptogênico é uma alternativa de manejo clínico. Porém, a condução de pacientes com PMG ao tratamento cirúrgico esbarra em muitos desafios, como a extensão da malformação e a coexistência de córtex epileptogênico e funcional na área da lesão (MAILLARD; RAMANTANI, 2018). Além disso, dentre os pacientes que passam pelo procedimento cirúrgico, os desfechos são variados, sendo que apenas 33% dos pacientes apresentam redução significativa no número de crises e muitos não apresentam melhoras (WANG *et al.*, 2016).

## 1.2 OSCILAÇÕES CEREBRAIS E EPILEPTOGÊNESE

As oscilações são fenômenos cerebrais dinâmicos que representam a atividade cooperativa de um grupo de células excitáveis, principalmente neurônios (BUZSÁKI, 2006). Elas são detectadas através do eletroencefalograma (EEG), que realiza a medida de potenciais extracelulares, ou campos elétricos, gerados pelo somatório dos fluxos de corrente iônica através das membranas excitáveis (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012). No cérebro de mamíferos, oscilações já foram registradas na faixa de 0,05 a 500 Hz (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004), e, de uma forma geral, elas são separadas em distintas faixas de frequência. No córtex de roedores, foram caracterizadas, dentre outras, as oscilações delta (1 – 4 Hz), teta (3 – 10 Hz), gama (30 – 80 Hz) e oscilações de alta frequência (HFOs), também chamadas *ripples* (80 – 200 Hz) (PENTTONEN, 2003). Essas faixas de frequência podem sofrer pequenas alterações no seu intervalo conforme o experimento realizado ou ser mais profundamente divididas em intervalos menores e são distintas das encontradas no cérebro humano, embora as diferenças sejam pequenas e não

escapem dos intervalos supracitados. A Figura 3 traz uma representação das oscilações cerebrais, na qual podemos ver sua ritmicidade.



**Figura 3.** Representação das oscilações cerebrais após decomposição de um traçado de eletroencefalograma. Adaptada de PASQUETTI, 2019

A geração das oscilações cerebrais depende da atividade de diferentes tipos celulares. A importância de interneurônios inibitórios que regulam a atividade de neurônios piramidais através de projeções GABAérgicas é reconhecida em várias regiões encefálicas, como no hipocampo e no neocórtex como um todo (ANTONOUDIQU *et al.*, 2020; KLAUSBERGER; SOMOGYI, 2008), e é fundamental para a geração das oscilações teta (BUZSÁKI, 2002), gama (ANTONOUDIQU *et al.*, 2020; CSICSVARI *et al.*, 2003) e *ripples* (BRAGIN *et al.*, 2002). Devido às propriedades da condução de volume, eletrodos de EEG registram fundamentalmente potenciais extracelulares restritos a regiões cerebrais próximas do contato, no geral das camadas mais superficiais do córtex, o que torna difícil distinguir de qual região especificamente as oscilações são originárias e também impossibilita o registro de regiões mais profundas (GELINAS *et al.*, 2016). Em experimentos que buscam o registro de regiões encefálicas isoladas ou profundas, é possível realizar a implantação de eletrodos de profundidade em coordenadas específicas, o que permite um registro mais restrito da região de interesse, como regiões hipocámpais ou corticais ou núcleos específicos do tálamo, por exemplo.

As funções das oscilações cerebrais são geralmente exploradas de forma individual, ou seja, cada faixa de frequência é, na maioria dos casos, estudada de forma isolada das demais e em determinadas estruturas cerebrais (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004). Porém, na análise das oscilações como um todo, sabe-se que as diferentes faixas de frequência da atividade cerebral são importantes para coordenar a resposta a diferentes *inputs* e selecionar aqueles em determinadas frequências, para a criação de assembleias neuronais com sincronia baseada no acoplamento de oscilações, para a consolidação de informações e para a representação de diferentes informações por um mesmo neurônio, no qual cada informação é “armazenada” em uma fase de determinada oscilação (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004).

Além do papel geral das oscilações cerebrais, cada faixa de frequência parece estar associada a diferentes funções encefálicas, períodos de atividade cerebral e momentos do ciclo circadiano. A oscilação delta, que ocorre de forma fisiológica nas fases mais tardias do sono anterior à fase de movimento rápido dos olhos (sono NREM), tem implicações no processo de “esquecimento” de memórias (KIM; GULATI; GANGULY, 2019) e também está envolvida em processos cognitivos (GÜNTEKIN; BAŞAR, 2016). A oscilação teta, proeminente no hipocampo (BUZSÁKI, 2002), está envolvida em uma gama de processos cognitivos e sensoriais, como aquisição e consolidação de memórias, manutenção da atenção e integração sensório-motora (KARAKAŞ, 2020). A oscilação gama, por sua vez, participa do processamento de informações, da manutenção de memórias e da percepção (HERRMANN *et al.*, 2016), além de participar do processo de movimentação ativa (BLENKINSOP; ANDERSON; GURNEY, 2017). Oscilações *ripples*, com frequências mais altas e correspondendo aos eventos mais síncronos no cérebro de mamíferos (BUZSÁKI, 2015), estão fortemente relacionadas à recuperação e reavaliação de memórias (SOSA; JOO; FRANK, 2020) e aos processos de planejamento e tomada de decisões (BUZSÁKI, 2015).

Além do seu envolvimento em diferentes funções e processos cerebrais, as oscilações também diferem quanto a sua localização e proeminência em diferentes regiões encefálicas. No hipocampo, por exemplo, as oscilações mais comumente encontradas em registros eletroencefalográficos são teta, gama e *ripples*, devido ao seu papel na consolidação e no processamento de memórias (COLGIN, 2016). O tálamo, sendo uma região de suma importância para o controle da transmissão de

informações para várias regiões corticais (STERIADE; MCCORMICK; SEJNOWSKI, 1993), está envolvido na geração de ritmos ligados tanto a estados de vigília quanto de sono, como *sleep spindles* e oscilações delta (FOGERSON; HUGUENARD, 2016; STERIADE; MCCORMICK; SEJNOWSKI, 1993).

Dada a sua importância em diversos processos fisiológicos envolvendo redes neuronais, alterações no padrão de atividade elétrica cerebral, e conseqüentemente nas oscilações cerebrais, estão envolvidas em diversas patologias do Sistema Nervoso Central, incluindo as epilepsias (HORSTMANN *et al.*, 2010). A epileptogênese é um processo no qual uma rede neuronal cerebral, cujo funcionamento prévio era normal, passa por alterações funcionais a partir de um insulto inicial, tornando-se mais suscetível à geração de crises epiléticas espontâneas (PITKÄNEN *et al.*, 2015). Ela pode ser dividida em epileptogênese primária, em que há a alteração permanente da rede cortical neuronal que traz a susceptibilidade a gerar crises epiléticas, e secundária, que envolve modificações adicionais que levam ao aumento da frequência e da severidade das crises espontâneas (BEN-ARI; DUDEK, 2010). O processo da epileptogênese não é instantâneo, e sim progressivo e contínuo: a frequência das crises epiléticas espontâneas aumenta em função do tempo a partir do início da epileptogênese (KADAM *et al.*, 2010).

Além de ser um processo contínuo, a epileptogênese parece ser um processo multifatorial, que segue uma “cascata” de eventos com uma sequência temporal, a qual é dividida em três fases: a fase aguda, que ocorre entre minutos e dias após o insulto e envolve a ativação de alguns genes imediatos, alterações pós-translacionais em receptores e canais iônicos e a ativação de canais iônicos; subaguda, que ocorre de horas a dias após o insulto inicial e engloba a morte neuronal, processos inflamatórios e alterações na transcrição gênica; e crônica, que pode durar de dias a meses e inclui neurogênese, gliose e a reorganização de redes neuronais (JENSEN, 2009; MUKHTAR, 2020; RAKHADE; JENSEN, 2009).

Há grande interesse na compreensão da epileptogênese, pois intervenções durante este processo podem ser benéficas para impedir o desenvolvimento de epilepsias que surgem após um insulto conhecido. Uma intervenção ideal seria capaz de reverter alterações patológicas envolvidas na epileptogênese, e o ponto de intervenção dependeria da avaliação individual de cada paciente para definir em que momento do processo ele está (PITKÄNEN; LUKASIUK, 2011). Estudos já foram

conduzidos com medicamentos antiepilépticos utilizados frequentemente como tratamento clínico (PITKÄNEN; LUKASIUK, 2011), porém seu uso como prevenção ao desenvolvimento das epilepsias esbarra em alguns fatores, como as diferenças entre os mecanismos de epileptogênese e ictogênese (ENGEL; PITKÄNEN, 2020). Assim, a busca de biomarcadores do processo de epileptogênese faz-se necessária para descobrir potenciais alvos terapêuticos (ENGEL; PITKÄNEN, 2020).

Nesse sentido, biomarcadores eletrofisiológicos são promissores no contexto da epileptogênese, e muitos estudos com modelos animais de epilepsias e também em pacientes com traumas ou outras lesões com potencial epileptiforme tiveram como enfoque alterações eletrofisiológicas prévias ao surgimento das primeiras crises epiléticas espontâneas nesses modelos. Dentre estes candidatos a biomarcadores estão tanto o padrão quanto a quantidade de HFOs, os quais apresentam-se alterados em áreas epileptogênicas em comparação ao tecido cortical saudável (BRAGIN; WILSON; ENGEL, 2000; KERBER *et al.*, 2014). Além das HFOs, evidências sugerem que alterações na dinâmica das oscilações teta também têm potencial como biomarcadores, uma vez que vários modelos animais de epilepsias apresentam alterações neste ritmo (MILIKOVSKY *et al.*, 2017).

### 1.2.1 Epileptogênese e MDC

Embora muitos estudos em pacientes e modelos animais tenham explorado vários mecanismos para tentar explicar o fenômeno da epileptogênese em MDC, em especial nas FCD, como esse processo acontece ainda é uma questão em debate (KUZNIECKY, 2015). Em pacientes com diferentes MDC, foi demonstrado que existem anormalidades na expressão de transportadores de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) no córtex lesionado, que contribuem à hiperexcitabilidade vista no tecido lesionado e à função despolarizante do neurotransmissor GABA, semelhante ao que é visto em neurônios imaturos (ARONICA *et al.*, 2007). Além disso, alterações no sistema GABAérgico também foram detectadas no tecido lesionado, incluindo diminuição de interneurônios que expressam parvalbumina (ALONSO-NANCLARES, 2004). As células neuronais com anormalidades morfológicas encontradas nas FCD também apresentam anormalidades eletroencefalográficas, como correntes de  $\text{Ca}^{+2}$  aberrantes e alterações em propriedades intrínsecas, como na resistência de *input* (CEPEDA *et al.*, 2003).

Como discutido acima, a região que circunda a malformação cortical também apresenta hiperexcitabilidade e pode também ser responsável pela epileptogênese (MARIN-VALENCIA; GUERRINI; GLEESON, 2014). O córtex adjacente à malformação também apresenta alterações no sistema GABAérgico semelhantes às vistas no córtex envolvido na MDC (ALONSO-NANCLARES, 2004), e células aberrantes no córtex lesionado, como as células balonadas, que não apresentam alterações eletrofisiológicas e parecem “silentes”, podem induzir uma reorganização sináptica que aumenta o número de *inputs* sinápticos nos neurônios normais do córtex adjacente, o que contribuiria para a hiperexcitabilidade vista também nesta região (CEPEDA *et al.*, 2003; MARIN-VALENCIA; GUERRINI; GLEESON, 2014).

### **1.3 MODELO ANIMAL DE MALFORMAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL: MICROGIRIA INDUZIDA POR CRIOLEÇÃO CORTICAL**

As MDC podem resultar tanto de fatores ambientais quanto genéticos, sendo então multifatoriais (WONG; ROPER, 2016). Sendo assim, modelos animais de malformações corticais foram desenvolvidos através da indução de mutações em genes específicos ligados a diferentes etapas do desenvolvimento cortical, insultos intrauterinos que perturbam o desenvolvimento fetal e intervenções peri e pós-natais (CHEVASSUS-AU-LOUIS *et al.*, 1999).

Um dos modelos animais para o estudo das MDC foi desenvolvido, no ano de 1977, por Dvorák e Feit, e consiste na indução de uma lesão necrótica no córtex cerebral de ratos recém-nascidos (entre os dias pós-natal (P) 0 e 1) através do toque de um *probe* metálico congelado em nitrogênio líquido (DVOŘÁK; FEIT, 1977). Essa *criolesão* resulta na perda da estrutura laminar cortical, que passa a apresentar quatro camadas ao invés de seis no local da lesão, e na formação de microgiros com estrutura semelhante à encontrada nos pacientes com PMG (DVOŘÁK; FEIT, 1977; DVOŘÁK; FEIT; JURÁNKOVÁ, 1978; WILLIAMS; FERRANTE; CAVINESS, 1976).

O modelo de criolesão cortical tem sido amplamente utilizado para investigar a epileptogênese relacionada à presença de MDC (CHEVASSUS-AU-LOUIS *et al.*, 1999). Estes estudos mostram que a região cortical que circunda os microgiros apresenta hiperexcitabilidade e padrões anormais de atividade síncrona capaz de se

propagar para outras regiões corticais próximas (JACOBS; GUTNICK; PRINCE, 1996; LUHMANN *et al.*, 1998), embora o córtex displásico envolvido no microgiro em si não tenha sido encontrado como sendo o foco dessa atividade anormal (CHEVASSUS-AU-LOUIS *et al.*, 1999). A origem e a propagação dessa atividade hiperexcitatória estão ligadas ao envolvimento e à hiperativação de receptores glutamatérgicos dos tipos N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido a-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) (LUHMANN *et al.*, 1998), à redução da densidade de interneurônios que expressam parvalbumina e somatostatina na região do microgiro (PATRICK; CONNORS; LANDISMAN, 2006; ROSEN, 1998), ao prejuízo em projeções inibitórias em camadas corticais adjacentes ao microgiro (JIN; JIANG; PRINCE, 2014) e à reorganização de conexões córtico-corticais e projeções talâmicas aos neurônios na região da malformação devido à ausência de seus alvos naturais, os neurônios das camadas mais profundas que foram perdidas durante a indução do microgiro (GIANNETTI *et al.*, 2000; JACOBS; PRINCE, 2005).

Apesar da hiperexcitabilidade encontrada nas áreas adjacentes aos microgiros e da demonstração de que o modelo animal de microgiria induzida por criolesão é mais suscetível a crises epiléticas induzidas por alguns agentes, como por hipertermia (SCANTLEBURY *et al.*, 2004), estes animais apresentam raras crises epiléticas espontâneas de natureza eletrográfica ou comportamental (GIBBS *et al.*, 2008; KELLINGHAUS *et al.*, 2007). Assim, embora este modelo animal seja capaz de replicar com bastante similaridade os aspectos histológicos e funcionais da organização cortical microgiral vista em pacientes com PMG, ele não é capaz de replicar uma das manifestações clínicas mais encontradas em pacientes com essa malformação cortical (LUHMANN, 2016).

#### **1.4 MODELO ANIMAL DE DUPLO INSULTO: MICROGIRIA EM RATOS DA LINHAGEM *WISTAR AUDIOGENIC RATS (WAR)***

Frente à alta prevalência de epilepsias em pacientes com MDC e ao fato do modelo animal de microgiria induzida por criolesão cortical em apresentar raras crises epiléticas espontâneas, tem sido proposto o uso de modelos animais com um insulto adicional. Esta hipótese do “duplo-insulto” sugere que a combinação de dois fatores é necessária para que o cérebro em desenvolvimento apresente um

processo significativo de epileptogênese (AUVIN *et al.*, 2010). Sendo um dos insultos a própria microgiria induzida por criolesão cortical, o segundo insulto poderia ser realizado, por exemplo, pela indução de inflamação ou de crises por hipertermia, que simulam crises febris (AUVIN *et al.*, 2010; HAMELIN *et al.*, 2014; SCANTLEBURY *et al.*, 2004).

O modelo animal de duplo-insulto também pode ser realizado pela associação da microgiria induzida por criolesão cortical a uma linhagem de animais já suscetíveis a crises epiléticas, como no caso da linhagem *Wistar Audiogenic Rats* (WAR). Os animais WAR compõem uma linhagem selecionada de ratos Wistar que apresentam susceptibilidade a crises induzidas por um estímulo auditivo agudo ou crônico, desenvolvida no Laboratório de Neuroetologia da Escola de Medicina de Ribeirão Preto na Universidade de São Paulo (DORETTO *et al.*, 2003; GARCIA-CAIRASCO; UMEOKA; CORTES DE OLIVEIRA, 2017). Estima-se que 10% dos animais Wistar sejam geneticamente suscetíveis a crises audiogênicas (GARCIA-CAIRASCO; UMEOKA; CORTES DE OLIVEIRA, 2017); estes animais apresentam crises de comportamento estereotipado após serem expostos, na idade adulta, a sons de intensidade variando entre 110 e 120 dB e de frequências entre 5000 e 20000 Hz. Os animais que apresentam crises do tipo tônico-clônicas generalizadas, de maior severidade, são escolhidos para reprodução (GARCIA-CAIRASCO; UMEOKA; CORTES DE OLIVEIRA, 2017), e os casais são formados entre irmãos e irmãs, formando uma linhagem isogênica de animais suscetíveis a crises audiogênicas, e essa susceptibilidade é mantida durante várias gerações (DORETTO *et al.*, 2003). As crises audiogênicas originam-se principalmente da hiperativação de estruturas do tronco encefálico relacionadas à audição, como os colículos superior e inferior e a formação reticular (CUNHA *et al.*, 2020; DORETTO *et al.*, 2009; GARCIA-CAIRASCO, 2002), enquanto que sua manifestação motora e comportamental é coordenada principalmente pela *substantia nigra*, que controla a integração sensoriomotora necessária para expressar as crises audiogênicas (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1991).

Os animais WAR possuem alterações celulares e eletrofisiológicas em regiões prosencefálicas, e não somente nas áreas do tronco encefálico envolvidas na audição. No hipocampo, por exemplo, os neurônios piramidais de animais WAR são mais hiperpolarizados, recebem menos *inputs* mediados pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), que é um neurotransmissor inibitório, e apresentam

alterações na cinética de correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) (CUNHA *et al.*, 2018; DRUMOND *et al.*, 2011). Em outro modelo animal também geneticamente suscetível a crises audiogênicas, o envolvimento de regiões talâmicas, especialmente do núcleo geniculado medial, na geração e nas características das crises audiogênicas, foi caracterizado, tendo estas regiões um aumento no número de disparos durante o estímulo auditivo e implicação direta na severidade das crises manifestadas pelos animais (N'GOUEMO; FAINGOLD, 1997).

Assim, a associação entre o uso de animais geneticamente suscetíveis a crises audiogênicas e a indução da microgiria por criolesão cortical (WAR-MDC) como um modelo de duplo-insulto pode ser uma alternativa para o estudo do processo de epileptogênese associado às malformações corticais.

## **2 JUSTIFICATIVA**

As MDC são uma das principais causas de epilepsias refratárias em crianças (HAUPTMAN; MATHERN, 2012; LERNER *et al.*, 2009). Apesar de muitos estudos focarem na função sináptica das regiões displásicas, os microcircuitos neoformados, os fatores que podem aumentar a susceptibilidade às crises epiléticas (como um segundo insulto), os mecanismos envolvidos na epileptogênese secundária e os preditores ictais ainda são pouco compreendidos. Entender estes mecanismos modulatórios poderá ajudar no desenvolvimento de novas terapias para estas alterações altamente epileptogênicas. Portanto, dados provenientes da avaliação quantitativa detalhada dos registros eletrofisiológicos *in vivo* em modelos animais são promissores para obter um melhor conhecimento tanto dos mecanismos como dos fatores de epileptogênese primária e secundária.

## **3 HIPÓTESE**

Sabemos que a organização da rede neural é importante para a manutenção dos ritmos cerebrais e que, em pacientes com MDC, há um rearranjo da estrutura das redes neurais, o qual se estende além da região do microgiro (HONG *et al.*, 2017). Portanto, nossa hipótese é que a reorganização na rede neural nas MDC durante o desenvolvimento, intensificada por um insulto secundário, aumenta a interação entre a microcircuitaria local, resultando em alterações nas oscilações

hipocampais, corticais e talâmicas e causando uma ruptura na rede sináptica, o que favorece os processos de epileptogênese primária e secundária.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 GERAIS**

No presente trabalho, pretendemos avaliar parâmetros das oscilações corticais, talâmicas e hipocampais interictais *in vivo* em um modelo animal de duplo insulto (WAR-MDC), a fim de identificar suas relações com os processos de epileptogênese primária (no local do insulto) e secundária (envolvendo outras áreas cerebrais) no modelo.

### **4.2 ESPECÍFICOS**

1) Analisar o perfil eletroencefalográfico de animais Wistar e WAR, com microgiria ou não, em dois períodos de desenvolvimento (juvenil e adolescente), em três estruturas encefálicas (córtex somatossensorial, núcleo ventral posteromedial do tálamo e região CA1 do hipocampo) e em ambos hemisférios cerebrais (ipsi e contralateral à lesão), a fim de caracterizar os modelos de duplo insulto e de único insulto (WAR ou microgiria) quanto à epileptogenicidade;

2) Investigar a progressão da epileptogênese primária de acordo com a faixa etária dos animais Wistar e WAR, dentro de uma mesma estrutura encefálica;

3) Verificar a presença de epileptogênese secundária, relacionando alterações encontradas entre os hemisférios ipsi e contralateral à lesão em uma mesma estrutura encefálica.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 ANIMAIS**

O manuseio e todos os procedimentos dos animais experimentais, incluindo o procedimento de eutanásia, envolveram o mínimo de desconforto ou sofrimento e foram realizados estritamente de acordo com as recomendações da Sociedade

Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), da International Brain Research Organization (IBRO), do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) e da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA). A aprovação do projeto junto ao CEUA-UFRGS foi obtida em Julho/2019, sob o nº 37310.

Foram utilizados animais Wistar adultos, machos e fêmeas, obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica – UFRGS, assim como animais adultos, machos e fêmeas, da linhagem WAR, provenientes do Biotério Especial de criação desta linhagem localizado no Campus da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto. Os animais de ambas as linhagens foram mantidos em condições padrão de biotério, em ambiente controlado por fotoperíodo (ciclo claro/escuro de 12h, com luzes acesas às 7h e apagadas às 19h), com temperatura regulada em  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e com água e alimentação (ração comercial) *ad libitum*.

De acordo com a linhagem utilizada, a presença ou não de lesão por congelamento e a idade avaliada, explicados abaixo, os animais foram divididos em oito grupos: Wistar-Sham-Juv (animais Wistar juvenis sem criolesão, n = 4 machos e 4 fêmeas); Wistar-Sham-Ado (animais Wistar adolescentes sem criolesão, n = 3 machos e 3 fêmeas); Wistar-MDC-Juv (animais Wistar juvenis com criolesão, n = 4 machos e 4 fêmeas); Wistar-MDC-Ado (animais Wistar adolescentes com criolesão, n = 2 machos e 4 fêmeas); WAR-Sham-Juv (animais WAR juvenis sem criolesão, n = 2 machos e 3 fêmeas); WAR-Sham-Ado (animais WAR adolescentes sem criolesão, n = 3 machos e 4 fêmeas); WAR-MDC-Juv (animais WAR juvenis com criolesão, n = 5 machos e 3 fêmeas); e WAR-MDC-Ado (animais WAR adolescentes com criolesão n = 5 machos e 3 fêmeas).

## **5.2 INDUÇÃO NA MICROGIRIA POR CRIOLEÇÃO CORTICAL**

O protocolo de indução da criolesão cortical foi realizado em ratos neonatos de ambos os sexos, entre P0 ou P1 (LUHMANN, 2016), na Sala de Cirurgia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para isso, os animais foram inicialmente anestesiados por hipotermia, um dos métodos recomendados na literatura para anestesia de curta duração em

neonatos (ANDRESEN *et al.*, 2014; ARMBRUSTER *et al.*, 2014; CHU; PARADA; PRINCE, 2009; PATRICK; CONNORS; LANDISMAN, 2006; SHIMIZU-OKABE *et al.*, 2007) devido à segurança e ao fato de que, em idades tenras, roedores são funcionalmente poiquilotérmicos, ou seja, sua taxa de metabolismo é equivalente à temperatura ambiente (HUSS *et al.*, 2016; PHIFER; TERRY, 1986). Além disso, devido ao pequeno tamanho dos filhotes, o resfriamento da superfície do corpo possibilita o resfriamento rápido também dos órgãos no seu interior, e os neonatos são capazes de suportar temperaturas abaixo de 1°C por períodos extensos de tempo (PHIFER; TERRY, 1986). A indução da hipotermia se dá pela imersão de copos de Becker forrados com papel em caixas de isopor contendo gelo. Os filhotes são colocados dentro destes copos durante no máximo 10 minutos e retirados após averiguação da anestesia a partir da imobilidade e da ausência de reflexos.

A criolesão cortical foi realizada de forma unilateral no hemisfério direito, na região aproximada do córtex somatossensorial. Para isso, inicialmente realizou-se uma incisão com bisturi à direita da linha média, o que expõe o crânio do animal. Um *probe* metálico em forma de tridente, previamente imerso em nitrogênio líquido, foi posto em contato com a região exposta do crânio do animal durante 20 segundos, com a aplicação de leve pressão, e após a limpeza do corte, a pele foi suturada pelo uso de cola cirúrgica (*Dermabond*® - *Ethicon*®, Johnson & Johnson). Após, o neonato foi colocado em uma placa aquecedora, com temperatura semelhante à do ninho (por volta de 33°C), até completa recuperação e secagem da sutura, quando então foi devolvido ao cuidado materno.

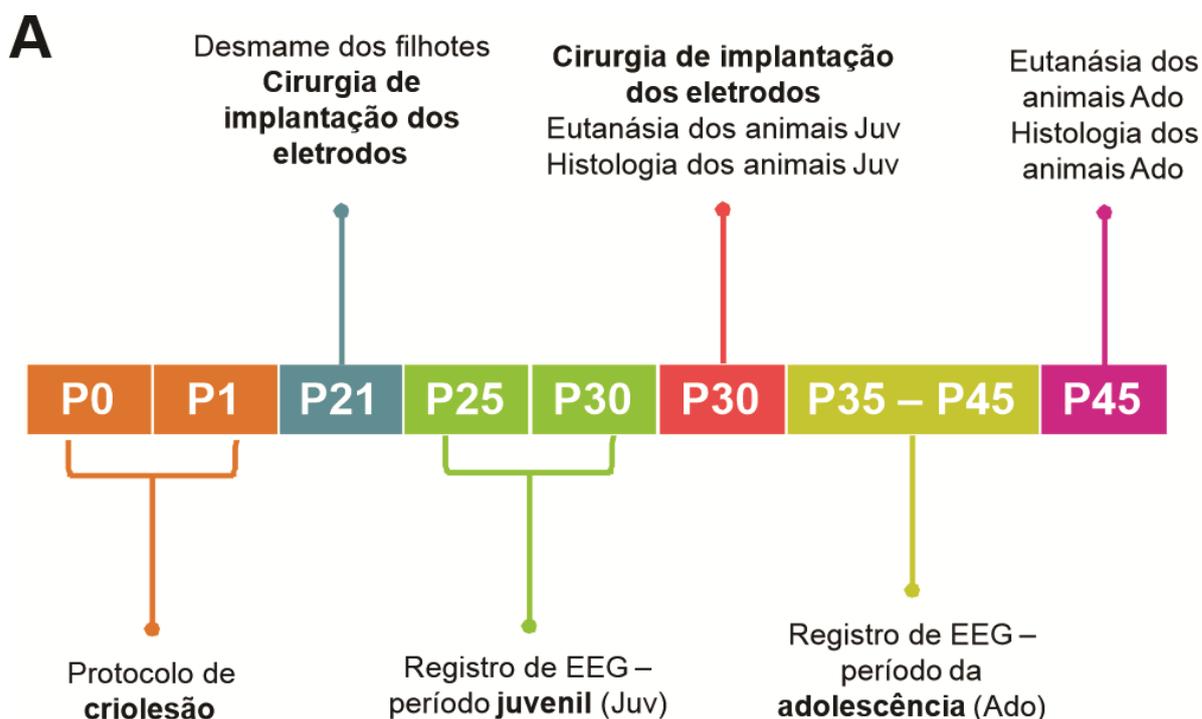
Para os animais dos grupos Sham, todos os procedimentos foram semelhantes aos dos animais lesionados, porém o *probe* estava em temperatura ambiente.

### **5.3 ELETROFISIOLOGIA *IN VIVO***

Os registros eletrofisiológicos *in vivo* foram realizados em dois períodos de desenvolvimento distintos, considerando animais juvenis (entre P25 e P30) e adolescentes (entre P35 e P45) (BURKE; MICZEK, 2014). Para fornecer tempo de recuperação suficiente e respeitar a data do desmame dos animais (em P21), as cirurgias de implantação dos eletrodos foram realizadas preferencialmente no dia do

desmame e, se possível, o mesmo animal teve sua atividade cerebral registrada nos dois períodos de desenvolvimento considerados. Alguns animais tiveram registros nos dois períodos de estudo (tanto na idade juvenil quanto na adolescente), enquanto outros apenas no primeiro ou no segundo período (somente na idade juvenil ou adolescente). Para os animais que tiveram registros de EEG somente no período da adolescência, os eletrodos foram implantados após P30 e os registros foram programados de forma a possibilitar cinco dias de recuperação da cirurgia de implantação de eletrodos (entre P35 a P45).

A Figura 4A traz uma linha do tempo com um resumo dos procedimentos realizados em cada dia pós-natal.



**Figura 4. (A)** Linha do tempo experimental.

### 5.3.1 Implantação dos eletrodos

Para a cirurgia de implantação dos eletrodos, cada animal, em P21 ou pelo menos cinco dias antes do primeiro registro eletrofisiológico, foi anestesiado por via intraperitoneal (i.p.) com cetamina (60 – 90 mg/kg) e xilazina (5 – 10 mg/kg) (UFRGS, 2013). Após confirmação da anestesia devido à falta do reflexo de retirada da pata, cada animal recebeu uma dose de anti-inflamatório (Meloxicam, 2 mg/kg, por via subcutânea), anestésico local na região dorsal da cabeça (Lidocaína, 7 mg/kg, por via subcutânea) e antibiótico (Tilosina, 10 mg/kg, por via subcutânea). Após, o animal foi cuidadosamente posicionado em um aparelho estereotáxico, o crânio foi exposto através de uma incisão realizada com bisturi aproximadamente na linha média sagital do crânio e nove pequenos orifícios foram feitos com o auxílio de uma broca odontológica. Seis orifícios foram utilizados para o posicionamento de eletrodos de profundidade, construídos com fio de tungstênio, de forma bilateral, seguindo coordenadas específicas de acordo com as estruturas encefálicas de interesse: dois na região do córtex somatossensorial (- 2,10 mm AP, ± 5,20 mm LL, - 2,30 mm DV), dois na região do núcleo ventral posteromedial (VPM) do tálamo (- 3,00 mm AP, ± 3,00 LL, - 6,00 mm DV) e dois na região CA1 do hipocampo (- 4,50

mm AP,  $\pm$  3,00 mm LL, - 2,80 mm DV) (PAXINOS; WATSON, 2007). Os três demais orifícios foram destinados à implantação de um eletrodo de referência, na região occipital, e dois parafusos para aterramento e para fixação do capacete. Depois de posicionados, os eletrodos e parafusos foram fixados com cimento acrílico dentário e, ao fim do procedimento, o animal foi cuidadosamente retirado do aparelho estereotáxico e monitorado até recuperação completa da anestesia.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na Sala de Cirurgia do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Após a cirurgia, os animais foram alojados de forma individual em caixas-moradia de acrílico (41x34x16 cm) para sua recuperação na Sala do Pós-Operatório no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, onde permaneceram até o final dos experimentos. Nos dois dias subsequentes à cirurgia, os animais receberam também doses diárias de anti-inflamatório (Meloxicam, 2 mg/kg de forma subcutânea), e, durante todo o tempo de experimentação, os animais foram cuidadosamente monitorados diariamente.

### 5.3.2 Registros eletrofisiológicos *in vivo* (vídeo-EEG)

No dia do registro eletrofisiológico *in vivo* associado ao monitoramento por vídeo (vídeo-EEG), feito individualmente para cada animal, a caixa-moradia foi transportada para uma caixa de observação, na qual os eletrodos implantados foram conectados a um amplificador (MAP-32, Plexon, Inc.), sendo o animal livre para se movimentar. A atividade eletrofisiológica e o comportamento do animal foram registrados durante períodos de 3h consecutivas por dia de registro, a fim de avaliar a progressão temporal do efeito da presença do duplo-insulto nas oscilações cerebrais das estruturas encefálicas de interesse.

A análise detalhada da densidade da potência espectral (PSD do inglês: *power spectrum density*) das frequências no EEG foi realizada através de rotinas customizadas no *software* MATLAB (Mathworks Inc.). Os sinais de EEG foram filtrados entre 0,1 – 500 Hz e digitalizados a 1 kHz para análise quantitativa, a qual foi realizada utilizando a função *pwelch* com uma janela de *hamming* de 4 s, com 50% de sobreposição. A decomposição de frequências foi realizada através da função *spectrogram*, que usa uma transformada de Fourier para fornecer um valor representativo da quantidade de determinada faixa de frequência em um determinado trecho do registro de EEG. O sinal decomposto foi quantificado em

cinco faixas de frequência: delta (1 – 4 Hz), teta (4 – 12 Hz), gama lento (30 – 50 Hz), gama médio (65 – 90 Hz) e gama rápido (90 – 150 Hz).

Após a decomposição, também foi realizada a remoção de componentes aperiódicos, os quais ocorrem juntamente às oscilações que identificamos no EEG, porém não possuem origem em um processo regular e rítmico (DONOGHUE *et al.*, 2020) e, no presente trabalho, precisam ser separados dos componentes periódicos, que são as oscilações em si. Em dados neurais, este componente aperiódico possui uma distribuição  $1/f$  – uma curva  $1/f$  foi então calculada para cada faixa de frequência, considerando valores de potência ao redor da faixa de interesse, e subtraída do sinal bruto, a fim de normalizar os traçados e isolar o componente periódico de cada oscilação (SCHEFFZÜK *et al.*, 2013). A Figura 4D ilustra o processamento do sinal realizado em cada um dos traçados.

Para as análises quantitativas, foram selecionados, por registro de EEG, múltiplos trechos de 30 s de duração, os quais estavam localizados pelo menos três minutos afastados de qualquer atividade epileptiforme e que foram correlacionados, a partir da análise de vídeo, a momentos de vigília e imobilidade do animal, a fim de excluir alterações no EEG por movimentos musculares ou alterações de padrão devido a ciclos de sono.

Fez-se um esforço para que o mesmo animal fosse registrado tanto durante o período Juvenil quanto Adolescente, porém nem todos os animais possuem registros em ambos os períodos de desenvolvimento. Além disso, os animais também foram registrados sempre dentro de um mesmo turno (manhã ou tarde, durante o período claro), a fim de remover vieses ligados ao ciclo circadiano.

#### **5.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS**

Imediatamente após o final do período de registros, os animais foram eutanasiados a partir da inalação do anestésico isoflurano, com posterior decapitação via guilhotina para remoção dos cérebros, os quais foram fixados em paraformaldeído 4% *overnight* e então armazenados em solução de sacarose 30% em baixa temperatura. Todo o processo de eutanásia foi conduzido de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15.02.2018 (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA, 2018).

Fatias cerebrais coronais (60  $\mu\text{m}$  de espessura) foram cortadas em um criostato (CM1850, Leica), entre as coordenadas - 1 mm e - 5 mm AP, e coradas com hematoxilina-eosina. A posição dos eletrodos de profundidade implantados e da lesão por congelamento foram confirmadas por microscopia óptica de acordo com o posicionamento da lesão causada pelo eletrodo ou da *probe* congelada. A Figura 4B mostra os cortes histológicos com o posicionamento dos eletrodos, enquanto que a Figura 4C mostra a representação do posicionamento dos eletrodos conforme as coordenadas adotadas (PAXINOS; WATSON, 2007).

## 5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Devido à estrutura experimental de medidas repetidas, as análises estatísticas foram conduzidas utilizando um modelo de equações de estimações generalizadas (GEE) (GUIMARÃES; HIRAKATA, 2012). Para a potência das oscilações, a análise considerou uma distribuição Gama com função de ligação logarítmica, uma vez que os dados são não paramétricos. Fatores de interesse do modelo incluíram idade (juvenil ou adolescente), hemisfério (direito ou esquerdo), procedimento (*sham* ou MDC) e linhagem (Wistar ou WAR). O sexo dos animais e o turno de registro (manhã ou tarde) foram utilizados como fatores de ajuste, porém, devido ao tamanho amostral, não foram utilizados para maior separação dos grupos ou considerados diretamente nas comparações. Os modelos foram ajustados utilizando funções do pacote *geeglm* do *software r*, enquanto que os contrastes foram calculados utilizando a função *esticon* do pacote *doBy*.

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Foram consideradas significativas diferenças cujo nível de significância ( $p$ ) foi inferior a 0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando rotinas customizadas em linguagem *r* e os gráficos foram feitos utilizando os *softwares* GraphPad Prism 8 e MATLAB.

## 6 RESULTADOS

## 7 DISCUSSÃO

Embora a prevalência de epilepsias em pacientes com polimicrogirias possa chegar a 87% (SHAIN *et al.*, 2013), o modelo animal de lesão por congelamento, um modelo amplamente aceito de indução de microgiros em roedores, apresenta poucas crises epiléticas espontâneas (HOLMES *et al.*, 1999). A fim de aperfeiçoar este modelo, tem-se proposto o uso de modelos de “duplo-insulto”, nos quais um fator de predisposição seria utilizado como primeiro insulto (SCHMIDT; SCHACHTER, 2008), enquanto que a criolesão para indução da microgiria seria o segundo insulto no modelo, o que então intensificaria o processo de epileptogênese e a ocorrência de crises epiléticas. A hipótese do duplo-insulto já é explorada através de algumas técnicas, como a indução de crises epiléticas febris (SPAGNOLI *et al.*, 2015) e a exposição pré-natal a agentes tóxicos, como metilazoximetanol (BATTAGLIA *et al.*, 2009), por isso a combinação de uma linhagem de animais Wistar suscetíveis a crises epiléticas audiogênicas com a lesão por congelamento surge como uma possibilidade para investigação dos processos de epileptogênese relacionados às malformações do desenvolvimento cortical. Baseado nisso, no presente trabalho, avaliamos as alterações eletroencefalográficas em um modelo animal de duplo-insulto (animais WAR com microgiria – WAR-MDC) em três regiões encefálicas de interesse (córtex, tálamo e hipocampo) a fim de investigar as alterações nas oscilações cerebrais que possam indicar o curso dos processos de epileptogênese primária e secundária no modelo. Nossos principais achados foram alterações em oscilações corticais de baixa frequência, maiores valores das potências de oscilações de alta frequência talâmicas e menor potência das oscilações rápidas hipocampais no modelo de duplo-insulto (WAR-MDC).

O processo de epileptogênese está acompanhado de alterações nas oscilações cerebrais e estudos sugerem que a presença de oscilações de alta frequência (a partir de 80 Hz) esteja correlacionada ao local de gênese das crises epiléticas em pacientes com epilepsia do lobo temporal (THOMSCHEWSKI; HINCAPIÉ; FRAUSCHER, 2019). Recentemente tem-se destacado também a diminuição na potência da oscilação teta como forte preditor de regiões epileptogênicas (ARABADZISZ *et al.*, 2005; KITCHIGINA *et al.*, 2013; MILIKOVSKY *et al.*, 2017). Neste trabalho, os animais WAR-MDC apresentaram diminuição na

potência da oscilação teta em diversas regiões encefálicas, assim como em ambas as idades avaliadas. Enquanto que a diminuição na potência desta oscilação na região cortical foi revertida entre os períodos juvenil e adolescente no hemisfério contralateral à microgiria, ela foi mantida no hemisfério ipsilateral. Neste sentido, a microgiria parece alterar permanentemente a dinâmica das oscilações teta corticais apenas nos animais WAR, uma vez que nos grupos Wistar com MDC esta diminuição da potência de teta não está presente.

A mesma diminuição de potência da oscilação teta é vista na região hipocampal para os animais com duplo-insulto – nesta região, ela ocorre independente do hemisfério analisado ou da idade considerada. O ritmo teta é bastante vulnerável em regiões hipocampais (KITCHIGINA; SHUBINA, 2023) e estudos indicam que a diminuição na potência de teta nesta estrutura reflete a integração das regiões hipocampais em uma rede epileptogênica, que abrange ambos os hemisférios (KILIAS *et al.*, 2023). Os achados aqui apresentados podem indicar a contribuição do hipocampo na epileptogênese tanto primária quanto secundária no modelo de duplo-insulto WAR-MDC.

O córtex pré-frontal é considerado um modulador global da atividade de teta gerada no hipocampo (PIGNATELLI; BEYELER; LEINEKUGEL, 2012) e a oscilação teta cortical funciona como um carreador de informações entre o hipocampo e outras estruturas encefálicas, como o estriado (BENCHENANE; TIESINGA; BATTAGLIA, 2011). O hipocampo e o córtex atuam em conjunto na geração e propagação da oscilação teta (BENCHENANE; TIESINGA; BATTAGLIA, 2011) e esta geração depende de vários tipos celulares hipocampais diferentes, como neurônios piramidais e interneurônios inibitórios (BENCHENANE; TIESINGA; BATTAGLIA, 2011; LEUNG, 1998). O processo de epileptogênese em modelos animais está relacionado à perda de interneurônios GABAérgicos hipocampais (Kumar e Buckmaster, 2006) e também a alterações no padrão de disparos dos interneurônios hipocampais restantes (TOYODA *et al.*, 2015). O déficit na atividade inibitória hipocampal intermediada por interneurônios é vista tanto em animais WAR (DRUMOND *et al.*, 2011; MESQUITA *et al.*, 2005) quanto em animais com microgiria (YANG; WILLIAMS; SUN, 2021), o que indica uma possível correlação entre as alterações celulares e de circuitaria nos animais WAR-MDC e o processo de epileptogênese.

O papel da oscilação delta no processo da epileptogênese tem sido considerado e incluído há muito tempo nas discussões de busca de biomarcadores e preditores para áreas suscetíveis a crises epiléticas (GAMBARDELLA *et al.*, 1995). O aumento na potência desta oscilação durante a epileptogênese em várias estruturas encefálicas já foi mostrado tanto em modelos animais (COSTA *et al.*, 2021; PASQUETTI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021) quanto em pacientes com epilepsias diversas (CLEMENS; SZIGETI; BARTA, 2000; POTOTSKIY *et al.*, 2021; WESTIN *et al.*, 2022). Os resultados apresentados por este trabalho mostram uma maior potência de delta na região CA1 do hipocampo no modelo animal de duplo-insulto no período da adolescência, vista apenas no hemisfério ipsilateral à microgiria, corroborando os achados em modelos animais e pacientes encontrados na literatura (PASQUETTI *et al.*, 2019; TSENG *et al.*, 2020; ZAVERI *et al.*, 2001).

No tálamo, em contraste, a maior potência de delta ocorre apenas para animais adolescentes no hemisfério esquerdo dos animais WAR, com ou sem MDC, e Wistar-MDC em relação ao grupo Wis-Sham-Ado. Esta maior potência de delta talâmico nos animais WAR com ou sem MDC e nos Wistar com MDC em relação ao controle Wistar sem lesão é um importante achado, uma vez que alterações na circuitaria tálamo cortical estão relacionadas a crises de ausência (LÜTTJOHANN; VAN LUIJTELAAR, 2022; STERIADE, 2001, 2006) que foram encontradas em animais WAR, independente da microgiria (KLIPPEL ZANONA *et al.*, 2022), e com menor frequência, em roedores com microgiria (SUN *et al.*, 2016; WILLIAMS; SUN, 2019; WILLIAMS; ZHOU; SUN, 2016), denotando uma alteração talâmica que pode estar relacionada com epileptogênese.

Em contrapartida, o modelo animal de duplo-insulto no período da adolescência apresenta menor potência de delta na região cortical contralateral à microgiria, enquanto que, no hemisfério ipsilateral, alterações não foram detectadas. Um estudo anterior de nosso laboratório mostrou que animais WAR-Sham apresentaram menor potência da oscilação delta em registros subdurais, porém esta diferença não foi vista para animais com microgiria bilateral (KLIPPEL ZANONA *et al.*, 2022). Uma vez que registros subdurais detectam o potencial de campo de regiões mais superficiais no córtex, esta forma de registro pode camuflar alterações específicas de determinadas regiões corticais. Os eletrodos, implantados em profundidade, registram a atividade de áreas mais específicas do córtex, as quais podem apresentar alterações distintas das camadas superficiais. Além disso, neste

trabalho a microgiria foi induzida de forma bilateral, ao contrário do trabalho aqui apresentado, no qual a indução foi realizada apenas no hemisfério direito.

As alterações eletroencefalográficas em pacientes e modelos animais de epilepsias também abrangem as oscilações gama. Na região cortical, os animais WAR-Sham, de ambas as idades, apresentam menor potência das oscilações gama médio e gama rápido no hemisfério ipsilateral à microgiria e em comparação aos grupos Wistar de mesma idade. A diminuição de potência de gama rápido cortical foi observada previamente por nosso grupo em animais WAR (KLIPPEL ZANONA *et al.*, 2022). Outro estudo anterior do nosso grupo de pesquisa mostrou que os ratos com epilepsia induzida por pilocarpina apresentaram menor potência de gama lento em relação a animais controle nas regiões corticais, além de alterações em gama lento, médio e rápido no *stratum oriens* de CA1, porém não foi possível detectar alterações nas demais camadas hipocâmpais em CA1 (PASQUETTI *et al.*, 2019).

No tálamo ipsilateral à microgiria, em contraste com a região cortical, as três faixas de gama consideradas neste estudo apresentam maiores valores de potência no período da adolescência nos grupos com MDC em comparação aos grupos Sham. Levando em consideração que não ficou demonstrada soma de efeitos entre os dois insultos do modelo WAR-MDC, pode-se estimar que a contribuição para a maior potência de gama é interferência da reorganização da circuitaria neuronal causada pela microgiria, podendo afetar a via corticotalâmica.

Na região de CA1 hipocâmpal, a potência de gama é menor nos animais WAR-MDC em comparação aos demais grupos, independentemente da idade e principalmente no hemisfério esquerdo, contralateral à microgiria. Estudos anteriores mostraram que displasias corticais focais, como a microgiria induzida pela criolesão, levam a perturbações na distribuição de subunidades dos receptores GABA<sub>A</sub> não apenas na região adjacente ao microgiro, mas também longínquas, como o hipocampo (REDECKER *et al.*, 2000), e que a geração dos ritmos gama é regulada através da inibição mediada por receptores do tipo GABA<sub>A</sub> e depende da distribuição das subunidades destes receptores nas células piramidais (HENTSCHKE *et al.*, 2009; KUJALA *et al.*, 2015). Somado a isso, alterações na transmissão GABAérgica têm sido descritas em hipocampo de animais WAR (CUNHA *et al.*, 2018). Como a transmissão sináptica GABAérgica é essencial para a organização das oscilações gama (SOHAL *et al.*, 2009), esta alteração da inibição mediada por GABA

hipocampal (REDECKER *et al.*, 2000) pode ser um dos mecanismos de diminuição da potência de oscilações gama no hipocampo nos animais WAR-MDC.

O processo de epileptogênese é contínuo e depende de uma série de alterações de plasticidade celular e circuitaria neuronal, como a perda da circuitaria inibitória, alterações na expressão de receptores, a reorganização sináptica e a geração de novas sinapses entre os neurônios restantes (DUDEK; SPITZ, 1997; PITKÄNEN *et al.*, 2015; RAKHADE; JENSEN, 2009). Considerando que alterações de circuitaria neuronal ocorrem em animais com microgiria induzida por criolesão (JACOBS; PRINCE, 2005; REDECKER *et al.*, 2000; SCANTLEBURY *et al.*, 2004) e também nos animais WAR (CUNHA *et al.*, 2018; DRUMOND *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2017) e que a preservação da circuitaria neuronal é de suma importância para a manutenção dos ritmos cerebrais e das oscilações fisiológicas (BUZSÁKI; WATSON, 2012), é possível associar as alterações de rede neural com as alterações das oscilações corticais hipocampais e talâmicas relacionando-as ao processo de epileptogênese.

## 8 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que animais modelo de duplo-insulto (animais WAR com microgiria) apresentam alterações das oscilações cerebrais em múltiplas regiões (córtex, tálamo e hipocampo), as quais podem estar relacionadas aos processos de epileptogênese primária e secundária. Dentre estas alterações, destacam-se a diminuição na potência das oscilações teta cortical e hipocampal ipsilateral à microgiria e independentemente da idade, o aumento da potência da oscilação delta nas regiões talâmica e hipocampal e a diminuição da potência das oscilações gama no hipocampo e no córtex. Estes dados reforçam a possibilidade do uso do modelo de duplo-insulto como modelo animal para o processo de epileptogênese vista em pacientes com MDC.

Como perspectivas, continuaremos com a análise qualitativa dos registros eletroencefalográficos, buscando padrões de *spike-wave discharges* (SWD) e crises de ausência, já reportado no modelo de duplo-insulto pelo nosso grupo previamente (KLIPPEL ZANONA *et al.*, 2022), e pretendemos realizar análises de sincronia da rede neuronal entre as regiões córtico-talâmicas e hipocampo, em busca do padrões

de oscilações cerebrais e biomarcadores de epileptogênese associados a malformações do desenvolvimento cortical.

## 9 REFERÊNCIAS

ALONSO-NANCLARES, L. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. **Brain**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 158–173, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awh331>.

ANDRESEN, L. *et al.* Gabapentin attenuates hyperexcitability in the freeze-lesion model of developmental cortical malformation. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 71, p. 305–316, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996114002538>.

ANTONOUDIQU, P. *et al.* Parvalbumin and Somatostatin Interneurons Contribute to the Generation of Hippocampal Gamma Oscillations. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 40, n. 40, p. 7668–7687, 2020. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0261-20.2020>.

ARABADZISZ, D. *et al.* Epileptogenesis and chronic seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy are associated with distinct EEG patterns and selective neurochemical alterations in the contralateral hippocampus. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 194, n. 1, p. 76–90, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488605000488>.

ARMBRUSTER, M. *et al.* Laser-scanning astrocyte mapping reveals increased glutamate-responsive domain size and disrupted maturation of glutamate uptake following neonatal cortical freeze-lesion. **Frontiers in cellular neuroscience**, [s. l.], v. 8, p. 277, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00277/abstract>.

ARONICA, E. *et al.* Differential expression patterns of chloride transporters, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-cotransporter and K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-cotransporter, in epilepsy-associated malformations of cortical development. **Neuroscience**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. 185–196, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645220601637X>.

AUVIN, S. *et al.* Inflammation enhances epileptogenesis in the developing rat brain. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 303–310, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996110002007>.

BARKOVICH, A. J. *et al.* A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. **Brain**, [s. l.], v. 135, n. 5, p. 1348–1369, 2012.

BARKOVICH, A. J. Current concepts of polymicrogyria. **Neuroradiology**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 479–487, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00234-009-0644-2>.

- BATTAGLIA, G. *et al.* Basic mechanisms of MCD in animal models. **Epileptic Disorders**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 206–214, 2009. Disponível em: <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/epd.2009.0273>.
- BEN-ARI, Y.; DUDEK, F. E. Primary and Secondary Mechanisms of Epileptogenesis in the Temporal Lobe: There is a before and an After. **Epilepsy Currents**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 118–125, 2010. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1111/j.1535-7511.2010.01376.x>.
- BENCHENANE, K.; TIESINGA, P. H.; BATTAGLIA, F. P. Oscillations in the prefrontal cortex: a gateway to memory and attention. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 475–485, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438811000080>.
- BLENKINSOP, A.; ANDERSON, S.; GURNEY, K. Frequency and function in the basal ganglia: the origins of beta and gamma band activity. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 595, n. 13, p. 4525–4548, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/JP273760>.
- BLÜMCKE, I. *et al.* The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission1. **Epilepsia**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 158–174, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2010.02777.x>.
- BRAGIN, A. *et al.* Local Generation of Fast Ripples in Epileptic Brain. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 2012–2021, 2002. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.22-05-02012.2002>.
- BRAGIN, A.; WILSON, C. L.; ENGEL, J. Chronic Epileptogenesis Requires Development of a Network of Pathologically Interconnected Neuron Clusters: A Hypothesis. **Epilepsia**, [s. l.], v. 41, n. s6, p. S144–S152, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.2000.tb01573.x>.
- BRODOVSKAYA, A.; KAPUR, J. Circuits generating secondarily generalized seizures. **Epilepsy & behavior : E&B**, [s. l.], v. 101, n. Pt B, p. 106474, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996114002538>.
- BURKE, A. R.; MICZEK, K. A. Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 231, n. 8, p. 1557–1580, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-013-3369-1>.
- BUZSÁKI, G. Hippocampal sharp wave- ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. **Hippocampus**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 1073–1188, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.22488>.
- BUZSÁKI, G. **Rhythms of the Brain**. [S. l.: s. n.], 2006-. ISSN <null>. Disponível em: [https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=ldz58irprjYC&oi=fnd&pg=PA4&dq=Rhythms+of+the+Brain&ots=Q2S64ZiHJS&sig=SNnv-HU-z3NsaIOyvY7THb\\_qBRM%0Ahttp://books.google.es/books/about/Rhythms\\_of\\_the\\_Brain.html?id=ldz58irprjYC&pgis=1](https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=ldz58irprjYC&oi=fnd&pg=PA4&dq=Rhythms+of+the+Brain&ots=Q2S64ZiHJS&sig=SNnv-HU-z3NsaIOyvY7THb_qBRM%0Ahttp://books.google.es/books/about/Rhythms_of_the_Brain.html?id=ldz58irprjYC&pgis=1).
- BUZSÁKI, G. Theta Oscillations in the Hippocampus. **Neuron**, [s. l.], v. 33, n. 3, p.

325–340, 2002. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662730200586X>.

BUZSÁKI, G.; ANASTASSIOU, C. A.; KOCH, C. 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. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrn3241>.

BUZSÁKI, G.; DRAGUHN, A. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. **Science**, [s. l.], v. 304, n. 5679, p. 1926–1929, 2004. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1099745>.

BUZSÁKI, G.; WATSON, B. O. Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 345–367, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.31887/DCNS.2012.14.4/gbuzsaki>.

CEPEDA, C. *et al.* Morphological and electrophysiological characterization of abnormal cell types in pediatric cortical dysplasia. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 472–486, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.10604>.

CHEVASSUS-AU-LOUIS, N. *et al.* Cortical Malformations and Epilepsy: New Insights from Animal Models. **Epilepsia**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 811–821, 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.1999.tb00786.x>.

CHU, Y.; PARADA, I.; PRINCE, D. A. Temporal and topographic alterations in expression of the  $\alpha 3$  isoform of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the rat freeze lesion model of microgyria and epileptogenesis. **Neuroscience**, [s. l.], v. 162, n. 2, p. 339–348, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452209005818>.

CLEMENS, B.; SZIGETI, G.; BARTA, Z. EEG frequency profiles of idiopathic generalised epilepsy syndromes. **Epilepsy research**, [s. l.], v. 42, n. 2–3, p. 105–115, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074183>.

COLGIN, L. L. Rhythms of the hippocampal network. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 239–249, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrn.2016.21>.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. **Conselho nacional de controle de experimentação animal). Diretriz da prática de eutanásia**, [s. l.], p. 49, 2018. Disponível em: [https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia\\_site-concea.pdf](https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf).

COSTA, A.-M. *et al.* Relationship between Delta Rhythm, Seizure Occurrence and Allopregnanolone Hippocampal Levels in Epileptic Rats Exposed to the Rebound Effect. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 127, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/2/127>.

CRINO, P. Focal Cortical Dysplasia. **Seminars in Neurology**, [s. l.], v. 35, n. 03, p. 201–208, 2015. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s->

0035-1552617.

CSICSVARI, J. *et al.* Mechanisms of Gamma Oscillations in the Hippocampus of the Behaving Rat. **Neuron**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 311–322, 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627302011698>.

CUNHA, A. O. S. *et al.* Alterations in brainstem auditory processing, the acoustic startle response and sensorimotor gating of startle in Wistar audiogenic rats (WAR), an animal model of reflex epilepsies. **Brain Research**, [s. l.], v. 1727, p. 146570, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899319306249>.

CUNHA, A. O. S. *et al.* Intrinsic and synaptic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain, a genetic model of epilepsy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 10412, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-28725-y>.

DESIKAN, R. S.; BARKOVICH, A. J. Malformations of cortical development. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 80, n. 6, p. 797–810, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.24793>.

DONOGHUE, T. *et al.* Parameterizing neural power spectra into periodic and aperiodic components. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 1655–1665, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41593-020-00744-x>.

DORETTO, M. C. *et al.* Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). **Behavior genetics**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 33–42, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645820>.

DORETTO, M. C. *et al.* Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. **Epilepsia**, [s. l.], v. 50, n. 12, p. 2563–2574, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2009.02164.x>.

DRUMOND, L. E. *et al.* Reduced hippocampal GABAergic function in Wistar audiogenic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 1054–1059, 2011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2011001000011&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2011001000011&lng=en&tlng=en).

DUDEK, F. E.; SPITZ, M. Hypothetical mechanisms for the cellular and neurophysiologic basis of secondary epileptogenesis: proposed role of synaptic reorganization. **Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 90–101, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165404>.

DVOŘÁK, K.; FEIT, J. Migration of neuroblasts through partial necrosis of the cerebral cortex in newborn rats-contribution to the problems of morphological development and developmental period of cerebral microgyria. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 203–212, 1977. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00688066>.

DVOŘÁK, K.; FEIT, J.; JURÁNKOVÁ, Z. Experimentally induced focal microgyria and

status verrucosus deformis in rats — Pathogenesis and interrelation histological and autoradiographical study. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 121–129, 1978. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00691477>.

ENGEL, J.; PITKÄNEN, A. Biomarkers for epileptogenesis and its treatment. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 167, p. 107735, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390819302941>.

FOGERSON, P. M.; HUGUENARD, J. R. Tapping the Brakes: Cellular and Synaptic Mechanisms that Regulate Thalamic Oscillations. **Neuron**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 687–704, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627316307255>.

GAMBARDELLA, A. *et al.* Focal intermittent delta activity in patients with mesiotemporal atrophy: a reliable marker of the epileptogenic focus. **Epilepsia**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 122–129, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7821268>.

GARCIA-CAIRASCO, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. **Hearing Research**, [s. l.], v. 168, n. 1–2, p. 208–222, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378595502003714>.

GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. E. Possible interaction between the inferior colliculus and the substantia nigra in audiogenic seizures in Wistar rats. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 421–427, 1991. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031938491900897>.

GARCIA-CAIRASCO, N.; UMEOKA, E. H. L.; CORTES DE OLIVEIRA, J. A. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. **Epilepsy & Behavior**, [s. l.], v. 71, p. 250–273, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505017302688>.

GELINAS, J. N. *et al.* Interictal epileptiform discharges induce hippocampal–cortical coupling in temporal lobe epilepsy. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 641–648, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.4084>.

GIANNETTI, S. *et al.* Organization of cortico-cortical associative projections in a rat model of microgyria. **NeuroReport**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 2185–2189, 2000. Disponível em: <http://journals.lww.com/00001756-200007140-00024>.

GIBBS, S. A. *et al.* Hippocampal atrophy and abnormal brain development following a prolonged hyperthermic seizure in the immature rat with a focal neocortical lesion. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 176–182, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996108001630>.

GONZÁLEZ, M. I.; CRUZ DEL ANGEL, Y.; BROOKS-KAYAL, A. Down-regulation of gephyrin and GABA A receptor subunits during epileptogenesis in the CA1 region of hippocampus. **Epilepsia**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 616–624, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.12063>.

GUERRINI, R.; BARBA, C. Malformations of Cortical Development and Aberrant Cortical Networks: Epileptogenesis and Functional Organization. **Journal of Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 372–379, 2010. Disponível em: <https://journals.lww.com/00004691-201012000-00003>.

GUERRINI, R.; DOBYNS, W. B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 710–726, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442214700407>.

GUIMARÃES, L. S. P.; HIRAKATA, V. N. Uso de modelo de equações de estimativas generalizadas na análise de dados longitudinais. **Revista HCPA**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 503–511, 2012.

GÜNTEKIN, B.; BAŞAR, E. Review of evoked and event-related delta responses in the human brain. **International Journal of Psychophysiology**, [s. l.], v. 103, p. 43–52, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167876015000318>.

HAMELIN, S. *et al.* Long-term modifications of epileptogenesis and hippocampal rhythms after prolonged hyperthermic seizures in the mouse. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 69, p. 156–168, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996114001430>.

HAUPTMAN, J. S.; MATHERN, G. W. Surgical treatment of epilepsy associated with cortical dysplasia: 2012 update. **Epilepsia**, [s. l.], v. 53, p. 98–104, 2012.

HENTSCHKE, H. *et al.* Altered GABA A,slow Inhibition and Network Oscillations in Mice Lacking the GABA A Receptor  $\beta$  3 Subunit. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 102, n. 6, p. 3643–3655, 2009. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00651.2009>.

HERRMANN, C. S. *et al.* EEG oscillations: From correlation to causality. **International Journal of Psychophysiology**, [s. l.], v. 103, p. 12–21, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167876015000331>.

HOLMES, G. L. *et al.* Consequences of cortical dysplasia during development in rats. **Epilepsia**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 537–544, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386521>.

HONG, S.-J. *et al.* The spectrum of structural and functional network alterations in malformations of cortical development. **Brain**, [s. l.], v. 140, n. 8, p. 2133–2143, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article/140/8/2133/3903073>.

HORSTMANN, M.-T. *et al.* State dependent properties of epileptic brain networks: Comparative graph–theoretical analyses of simultaneously recorded EEG and MEG. **Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 172–185, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388245709006154>.

HUSS, M. K. *et al.* The Physiologic Effects of Isoflurane, Sevoflurane, and Hypothermia Used for Anesthesia in Neonatal Rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 83–88, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26817984>.

IFFLAND, P. H.; CRINO, P. B. Focal Cortical Dysplasia: Gene Mutations, Cell Signaling, and Therapeutic Implications. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 547–571, 2017.

JACOBS, K. M.; GUTNICK, M. J.; PRINCE, D. A. Hyperexcitability in a Model of Cortical Maldevelopment. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 514–523, 1996. Disponível em: <https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/6.3.514>.

JACOBS, K. M.; PRINCE, D. A. Excitatory and Inhibitory Postsynaptic Currents in a Rat Model of Epileptogenic Microgyria. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 687–696, 2005.

JENSEN, F. E. Introduction Posttraumatic epilepsy: Treatable epileptogenesis. **Epilepsia**, [s. l.], v. 50, p. 1–3, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2008.02003.x>.

JIN, X.; JIANG, K.; PRINCE, D. A. Excitatory and inhibitory synaptic connectivity to layer V fast-spiking interneurons in the freeze lesion model of cortical microgyria. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 112, n. 7, p. 1703–1713, 2014. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00854.2013>.

KADAM, S. D. *et al.* Continuous Electroencephalographic Monitoring with Radio-Telemetry in a Rat Model of Perinatal Hypoxia–Ischemia Reveals Progressive Post-Stroke Epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 404–415, 2010. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.4093-09.2010>.

KARAKAŞ, S. A review of theta oscillation and its functional correlates. **International Journal of Psychophysiology**, [s. l.], v. 157, p. 82–99, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167876020300763>.

KELLINGHAUS, C. *et al.* Dissociation between in vitro and in vivo epileptogenicity in a rat model of cortical dysplasia. **Epileptic Disorders**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 11–19, 2007.

KERBER, K. *et al.* Differentiation of specific ripple patterns helps to identify epileptogenic areas for surgical procedures. **Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 125, n. 7, p. 1339–1345, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388245713012273>.

KILIAS, A. *et al.* Integration of the <sc>CA2</sc> region in the hippocampal network during epileptogenesis. **Hippocampus**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 223–240, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.23479>.

KIM, J.; GULATI, T.; GANGULY, K. Competing Roles of Slow Oscillations and Delta Waves in Memory Consolidation versus Forgetting. **Cell**, [s. l.], v. 179, n. 2, p. 514–526.e13, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867419309596>.

KITCHIGINA, V. *et al.* Disturbances of septohippocampal theta oscillations in the epileptic brain: Reasons and consequences. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 247, p. 314–327, 2013. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488613000423>.

KITCHIGINA, V.; SHUBINA, L. Oscillations in the dentate gyrus as a tool for the performance of the hippocampal functions: Healthy and epileptic brain. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 125, p. 110759, 2023. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584623000453>.

KLAUSBERGER, T.; SOMOGYI, P. Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations. **Science**, [s. l.], v. 321, n. 5885, p. 53–57, 2008. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1149381>.

KLIPPEL ZANONA, Q. *et al.* Absence-like Seizures, Cortical Oscillations Abnormalities and Decreased Anxiety-like Behavior in Wistar Audiogenic Rats with Cortical Microgyria. **Neuroscience**, [s. l.], v. 500, p. 26–40, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452222004006>.

KUJALA, J. *et al.* Gamma oscillations in V1 are correlated with GABAA receptor density: A multi-modal MEG and Flumazenil-PET study. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 16347, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep16347>.

KUZNIECKY, R. Epilepsy and malformations of cortical development. **Current Opinion in Neurology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 151–157, 2015. Disponível em: <https://journals.lww.com/00019052-201504000-00011>.

LERNER, J. T. *et al.* Assessment and surgical outcomes for mild type I and severe type II cortical dysplasia: A critical review and the UCLA experience. **Epilepsia**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 1310–1335, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2008.01998.x>.

LEUNG, L. S. Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 275–290, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9579318>.

LEVENTER, R. J.; GUERRINI, R.; DOBYNS, W. B. Malformations of cortical development and epilepsy. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 47–62, 2008. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.31887/DCNS.2008.10.1/rjleventer>.

LUHMANN, H. J. *et al.* Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: extracellular in vitro recordings. **The European journal of neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 3085–3094, 1998.

LUHMANN, H. J. Models of cortical malformation—Chemical and physical. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 260, p. 62–72, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027015001351>.

LÜTTJOHANN, A.; VAN LUIJTELAAR, G. The role of thalamic nuclei in genetic generalized epilepsies. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 182, p. 106918, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121122000699>.

MAILLARD, L.; RAMANTANI, G. Epilepsy surgery for polymicrogyria: a challenge to be undertaken. **Epileptic Disorders**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 319–338, 2018. Disponível em: <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/epd.2018.1004>.

MARIN-VALENCIA, I.; GUERRINI, R.; GLEESON, J. G. Pathogenetic mechanisms of focal cortical dysplasia. **Epilepsia**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 970–978, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.12650>.

MARTÍN-LÓPEZ, D. *et al.* The Role of Thalamus Versus Cortex in Epilepsy: Evidence from Human Ictal Centromedian Recordings in Patients Assessed for Deep Brain Stimulation. **International Journal of Neural Systems**, [s. l.], v. 27, n. 07, p. 1750010, 2017. Disponível em: <https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0129065717500101>.

MESQUITA, F. *et al.* Electrophysiological properties of cultured hippocampal neurons from Wistar Audiogenic Rats. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 177–183, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923005000262>.

MILIKOVSKY, D. Z. *et al.* Electrocorticographic Dynamics as a Novel Biomarker in Five Models of Epileptogenesis. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 37, n. 17, p. 4450–4461, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28330876>.

MUKHTAR, I. Inflammatory and immune mechanisms underlying epileptogenesis and epilepsy: From pathogenesis to treatment target. **Seizure**, [s. l.], v. 82, p. 65–79, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1059131120302831>.

N'GOUEMO, P.; FAINGOLD, C. L. Audiogenic kindling increases neuronal responses to acoustic stimuli in neurons of the medial geniculate body of the genetically epilepsy-prone rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 761, n. 2, p. 217–224, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899397003223>.

OEGEMA, R. *et al.* International consensus recommendations on the diagnostic work-up for malformations of cortical development. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 618–635, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41582-020-0395-6>.

OSSOLA, C.; KALEBIC, N. Roots of the Malformations of Cortical Development in the Cell Biology of Neural Progenitor Cells. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 15, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.817218/full>.

PALMINI, A.; HOLTHAUSEN, H. Focal malformations of cortical development: a most relevant etiology of epilepsy in children. **Handbook of clinical neurology**, [s. l.], v. 111, p. 549–565, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23622203>.

PANG, T.; ATEFY, R.; SHEEN, V. Malformations of Cortical Development. **The Neurologist**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 181–191, 2008. Disponível em: <https://journals.lww.com/00127893-200805000-00005>.

PASQUETTI, M. V. *et al.* Hippocampal CA1 and cortical interictal oscillations in the pilocarpine model of epilepsy. **Brain Research**, [s. l.], v. 1722, 2019.

PASQUETTI, M. V. **Oscilações corticais e hipocâmpais interictais e o efeito do**

**transplante de precursores gabaérgicos sobre atividade peri-ictal no modelo animal de epilepsia induzida por pilocarpina.** 2019. 127 f. [s. l.], 2019.

PATRICK, S. L.; CONNORS, B. W.; LANDISMAN, C. E. Developmental changes in somatostatin-positive interneurons in a freeze-lesion model of epilepsy. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 70, n. 2–3, p. 161–171, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121106001343>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 6th Eded. [S. l.]: Academic Press, 2007.

PENTTONEN, M. Natural logarithmic relationship between brain oscillators. **Thalamus & Related Systems**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 145–152, 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472928803000074>.

PHIFER, C. B.; TERRY, L. M. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 887–890, 1986. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031938486900582>.

PIGNATELLI, M.; BEYELER, A.; LEINEKUGEL, X. Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. **Journal of Physiology-Paris**, [s. l.], v. 106, n. 3–4, p. 81–92, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928425711000337>.

PINTO, H. P. P. *et al.* Auditory processing assessment suggests that Wistar audiogenic rat neural networks are prone to entrainment. **Neuroscience**, [s. l.], v. 347, p. 48–56, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188855>.

PITKÄNEN, A. *et al.* Epileptogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. a022822, 2015. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a022822>.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 173–186, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442210703100>.

POTOTSKIY, E. *et al.* Brain injuries can set up an epileptogenic neuronal network. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 129, p. 351–366, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763421003468>.

RAKHADE, S. N.; JENSEN, F. E. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 380–391, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrneurol.2009.80>.

REDECKER, C. *et al.* Differential Downregulation of GABA A Receptor Subunits in Widespread Brain Regions in the Freeze-Lesion Model of Focal Cortical Malformations. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 13, p. 5045–5053, 2000. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.20-13-05045.2000>.

ROSEN, G. Effects of neonatal freeze lesions on expression of parvalbumin in rat neocortex. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 753–761, 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/8.8.753>.

SCANTLEBURY, M. H. *et al.* Freeze Lesion-Induced Focal Cortical Dysplasia Predisposes to Atypical Hyperthermic Seizures in the Immature Rat. **Epilepsia**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 592–600, 2004.

SCHEFFZÜK, C. *et al.* Global slowing of network oscillations in mouse neocortex by diazepam. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 65, p. 123–133, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390812004868>.

SCHMIDT, D.; SCHACHTER, S. C. **Puzzling Cases of Epilepsy**. 2<sup>a</sup> edição. [S. l.]: Academic Press, 2008. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123740052X00014>.

SENDROWSKI, K.; SOBANIEC, W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. **Pharmacological reports : PR**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 555–565, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950578>.

SHAIN, C. *et al.* Polymicrogyria-associated epilepsy: A multicenter phenotypic study from the Epilepsy Phenome/Genome Project. **Epilepsia**, [s. l.], v. 54, n. 8, p. 1368–1375, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.12238>.

SHIMIZU-OKABE, C. *et al.* Changes in the expression of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 288–295, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010207017191>.

SHUMAN, T. *et al.* Breakdown of spatial coding and interneuron synchronization in epileptic mice. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 229–238, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41593-019-0559-0>.

SISODIYA, S. M. *et al.* Focal cortical dysplasia type II: biological features and clinical perspectives. **The Lancet. Neurology**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 830–843, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19679275>.

SOHAL, V. 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: <https://www.nature.com/articles/nature07991>.

SOSA, M.; JOO, H. R.; FRANK, L. M. Dorsal and Ventral Hippocampal Sharp-Wave Ripples Activate Distinct Nucleus Accumbens Networks. **Neuron**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 725–741.e8, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627319310086>.

SPAGNOLI, C. *et al.* Symptomatic Neonatal Seizures Followed by Febrile Status Epilepticus. **Journal of Child Neurology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 615–618, 2015. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0883073814533004>.

STERIADE, M. Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. **Neuroscience**, [s. l.], v. 137, n. 4, p. 1087–1106, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645220501153X>.

STERIADE, M. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. **Journal of neurophysiology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 1–39, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431485>.

STERIADE, M.; MCCORMICK, D. A.; SEJNOWSKI, T. J. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 262, n. 5134, p. 679–685, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8235588>.

STUTTERD, C. A.; LEVENTER, R. J. Polymicrogyria: A common and heterogeneous malformation of cortical development. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 227–239, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.c.31399>.

SUBRAMANIAN, L.; CALCAGNOTTO, M. E.; PAREDES, M. F. Cortical Malformations: Lessons in Human Brain Development. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 13, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00576/full>.

SUN, Q.-Q. *et al.* Continuous spike-waves during slow-wave sleep in a mouse model of focal cortical dysplasia. **Epilepsia**, [s. l.], v. 57, n. 10, p. 1581–1593, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.13501>.

THOMSCHEWSKI, A.; HINCAPIÉ, A.-S.; FRAUSCHER, B. Localization of the Epileptogenic Zone Using High Frequency Oscillations. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2019.00094/full>.

TOYODA, I. *et al.* Unit Activity of Hippocampal Interneurons before Spontaneous Seizures in an Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 16, p. 6600–6618, 2015. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.4786-14.2015>.

TSENG, H.-T. *et al.* Deep Brain Stimulation Increases Seizure Threshold by Altering REM Sleep and Delta Powers During NREM Sleep. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2020.00752/full>.

TUNG, H. *et al.* Characterization of Hippocampal-Thalamic-Cortical Morphometric Reorganization in Temporal Lobe Epilepsy. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 12, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2021.810186/full>.

UFRGS. Procedimentos para Anestesia de Animais de Laboratório –. [s. l.], n. 51, p. 12, 2013.

WANG, D. D. *et al.* Surgical management of medically refractory epilepsy in patients with polymicrogyria. **Epilepsia**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 151–161, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.13264>.

WARSI, N. M. *et al.* The anterior and centromedian thalamus: Anatomy, function, and dysfunction in epilepsy. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 182, p. 106913, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092012112200064X>.

WESTIN, K. *et al.* Interictal epileptiform discharges in focal epilepsy are preceded by increase in low-frequency oscillations. **Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 136, p. 191–205, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388245722001602>.

WILLIAMS, R. S.; FERRANTE, R. J.; CAVINESS, V. S. The cellular pathology of microgyria. A Golgi analysis. **Acta neuropathologica**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 269–283, 1976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/64105>.

WILLIAMS, A. J.; SUN, Q.-Q. Cortical Layer and Spectrotemporal Architecture of Epileptiform Activity in vivo in a Mouse Model of Focal Cortical Malformation. **Frontiers in Neural Circuits**, [s. l.], v. 13, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2019.00002/full>.

WILLIAMS, A. J.; ZHOU, C.; SUN, Q.-Q. Enhanced Burst-Suppression and Disruption of Local Field Potential Synchrony in a Mouse Model of Focal Cortical Dysplasia Exhibiting Spike-Wave Seizures. **Frontiers in Neural Circuits**, [s. l.], v. 10, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2016.00093/full>.

WONG-KISIEL, L. C. *et al.* Challenges in managing epilepsy associated with focal cortical dysplasia in children. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 145, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121117304047>.

WONG, M.; ROPER, S. N. Genetic animal models of malformations of cortical development and epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 260, p. 73–82, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027015001545>.

WU, Y.-J. *et al.* Delta oscillation underlies the interictal spike changes after repeated transcranial direct current stimulation in a rat model of chronic seizures. **Brain Stimulation**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 771–779, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1935861X21000954>.

YANG, W.; WILLIAMS, A.; SUN, Q.-Q. Circuit Mechanisms Underlying Epileptogenesis in a Mouse Model of Focal Cortical Malformation. **Current Biology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 334–345.e4, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982220315335>.

ZAVERI, H. P. *et al.* Distinguishing subtypes of temporal lobe epilepsy with background hippocampal activity. **Epilepsia**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 725–730, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11422326>.

ZHANG, T. *et al.* Aberrant basal ganglia-thalamo-cortical network topology in juvenile absence epilepsy: A resting-state EEG-fMRI study. **Seizure**, [s. l.], v. 84, p. 78–83, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1059131120303794>.

## 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: 37310

Título: Epileptogênese em modelo de duplo insulto

Vigência: 01/07/2019 à 31/12/2023

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MARIA ELISA CALCAGNOTTO - coordenador desde 01/07/2019  
Eduardo Rigon Zimmer - pesquisador desde 01/07/2019  
Natividade de Sá Couto Pereira - pesquisador desde 01/07/2019  
Querusche Klippel Zanona - Aluno de Doutorado desde 01/07/2019  
LETÍCIA BARBIERI CAUS - Aluno de Mestrado desde 01/07/2019  
GABRIELA LAZZAROTTO - Aluno de Mestrado desde 01/07/2019  
Joseane Righes Marafiga - Aluno de Doutorado desde 01/07/2019

**Equipe Externa:**

Norberto Garcia Cairasco - pesquisador desde 01/07/2019  
Artur Fernandes - pesquisador desde 01/07/2019  
José Antonio C. Oliveira - pesquisador desde 01/07/2019  
Ana Luiza Ferreira Donatti - pesquisador desde 01/07/2019

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 164 animais adultos (41 animais WISTAR: 33 fêmeas adultas Wistar e 8 machos adultos Wistar e 82 animais WAR: 66 fêmeas adultas WAR e 16 machos adultos WAR) para a obtenção de 528 animais (264 Wistar + 264 WAR), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.**

Porto Alegre, Terça-Feira, 20 de Agosto de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética