

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

**“ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO COMPARATIVO DE
NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DE PACIENTES COM
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT) E RATOS COM
EPILEPSIA CRÔNICA NO MODELO DO 0-Mg²⁺”**

Mestranda: **ANDREA LUISA ALENCAR TAVARES**

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

Porto Alegre, novembro de 2001.

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

**“ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO COMPARATIVO DE
NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DE PACIENTES COM
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT) E RATOS COM
EPILEPSIA CRÔNICA NO MODELO DO 0-Mg²⁺”**

Mestranda: ANDREA LUISA ALENCAR TAVARES

Orientador: Prof. Dr. JADERSON COSTA DA COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências –
Universidade Federal Do Rio Grande do Sul- Requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre, novembro de 2001.

AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Orientador Dr. Jaderson Costa da Costa por acreditar no meu potencial, pela orientação e incentivo.
- ◆ Aos Neurocirurgiões: Dr. Eliseu Paglioli Neto e Dr. Ney Azambuja, pois sem eles seria impossível a realização da parte experimental que envolvia o Tecido Humano.
- ◆ Aos colegas e amigos conquistados do Neurolab, em especial a mestranda Simone Denise Salamoni; Gisele Finkler da Fonseca, Ricardo Breda, Fabricio Simão, Paulo da Costa, Roberto Maldonado e a Raquel Matos pela ajuda na realização deste trabalho.
- ◆ Aos meus pais, Jorge e Cleonice pelo incentivo carinho e paciência.
- ◆ Ao meu marido Adriano pelo incentivo , carinho e muita paciência, principalmente nos dias que antecederam a entrega desta dissertação.
- ◆ Ao laboratório de Neurociências do IPB-HSL-PUCRS, pela chance de desenvolver este trabalho.
- ◆ Ao Programa de Pós Graduação em Neurociências- UFRGS pela oportunidade de crescimento intelectual.
- ◆ A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram nestes 2 anos.
- ◆ Aos Pacientes portadores de Epilepsia por contribuírem neste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	62
3. MATERIAL & MÉTODOS	64
4. RESULTADOS	102
5. DISCUSSÃO	227
6. CONCLUSÕES	252
7. RESUMO	254
8. ABSTRACT	257
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	260
10. ANEXOS:	
ANEXO 1 (TABELAS)	I
ANEXO 2 (ÍNDICE COMPLETO)	XXVI

ABREVIATURAS:

ACFS -	Fluido cefalorraquidiano artificial
AHP	Pós hiperpolarização ou hiperpolarização tardia
APV	Ácido 2-amino-5-fosfonoaléico
AMA/AMD/AMP	Amplitude PA antes/durante/depois 0 Mg ⁺²
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropionico
CA	Cornu ammonis
CDS	Células com descargas em salva
CDSAL	CDS de alto limiar
CDSBL/-I/-II/-III	CDS de baixo limiar/grau I/grau II/grau III
CSDS	Células sem descargas em salva.
CER	Crises espontâneas recorrentes
CG	Células granulares
CIPAA/CIPAD/CIPAP	Corrente injetada para o 1º PA antes/durante/depois 0-Mg ⁺²
CPC	Crise parcial complexa
CT	Constante de tempo
CTMA/CTMD/CTMP	CT antes/durante/depois 0 Mg ⁺²
DC	Conexão direta
DS	Descargas em salva
DZ	Diazepam
EC	Extracelular
EEG	Eletroencefalograma
ELT	Epilepsia do lobo temporal
EMT	Esclerose Mesial Temporal
FCS	Fibras colaterais de Schaffer
FH	Formação hipocampal
FM	Fibras musgosas
FS	Espículas de intervalos curtos (“fast-spiking”)
GABA	Ácido gama-amino butírico
GABA_AR	Receptor GABA _A
GAD	descarboxilase do ácido glutâmico

GD	Giro denteado
HPD	Hipocampo propriamente dito
IC	Intracelular
ILEA	Liga Internacional contra a Epilepsia
IV	Intensidade de corrente x voltagem
LAMA/LAMD/LAMP	Limiar do PA antes/durante/depois 0-Mg ⁺²
MP	Membrana plasmática
MS	Metilescopolamina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor NMDA
PA	Potencial de ação
DPMA/DPMD/DPMP	Duração do PA antes/durante/depois 0-Mg ⁺²
PC	Computador pessoal
PD	Propriedades de disparo
PDS	Onda despolarizante paroxística (“Paroxysmal Depolarization Shift”)
PEPS	Potenciais excitatórios pós-sinápticos
PILO	Pilocarpina
PIPS	Potenciais inibitórios pós-sinápticos
PMMA/PMMD/PMMP	PM antes/durante/depois 0 Mg ⁺²
PMr	Potencial de membrana de repouso
PPHr	Pós-potencial de hiperpolarização
PPHMA/PPHMD/PPHM	PPH antes/durante/depois 0 -Mg ⁺²
PSE	Pós-Status epilepticus
RE	Resistência de entrada
REMA/REMD/REMP	RE antes/durante/depois 0-Mg ⁺²
RNA_m	RNA mensageiro
RS	Espículas de intervalos regulares (“regular-spiking”)
SCER	Sem crises espontâneas recorrentes
SDS/CDS	Sem DS/Com DS
SE	Status epilepticus
SNC	Sistema Nervoso Central
SSAL	Solução salina

1. INTRODUÇÃO:

1. EPILEPSIA

1.1 CONCEITO GERAL:

A epilepsia é um dos problemas médicos mais antigos, tendo sido descrita minuciosamente por Hipócrates, há mais de 2000 anos. A palavra Epilepsia é derivada do verbo Grego, significando “possuir”, “apossar-se de” ou “acometer”. Para os antigos gregos a epilepsia era considerada como um fenômeno milagroso, pois para eles só os deuses poderiam derrubar uma pessoa, tirando-lhe a razão e a consciência, fazendo com que seu corpo se agitasse sem controle, para depois deixá-lo como antes (Fustes & Fustes 1992; Sander & Hart 1999). Assim, o termo "epilepsia" adquiriu um sentido particular naquela época sendo denominada de "doença sagrada"(morbus divinus).

Há cerca de 400 A.C. Hipócrates atacou a explicação “sobrenatural” no seu escrito sobre "A Doença Sagrada" (Fustes & Fustes, 1992). Ele argumentou que o legado caráter divino era simplesmente uma cobertura para a ignorância e o tratamento falso. Portanto, a epilepsia não deveria ser tratada com mágica, mas com DIETA e remédios.

O Iluminismo do século XVIII e os avanços na neurologia no século XIX levaram a uma melhor compreensão da epilepsia e ao abandono da idéia da possessão demoníaca como sendo sua causa. John Hughlings Jackson fundou a era moderna do estudo e conhecimento da epilepsia mediante uma análise cuidadosa de cada paciente com epilepsia. Ele foi responsável pela primeira definição de epilepsia, onde postulou como sendo “uma descarga ocasional, súbita, rápida e localizada na substância Cinzenta”

(Sander & Hart 1999) e com isso refutou as hipóteses mirabolantes sobre a epilepsia, inaugurando o longo e difícil caminho das descobertas sobre o diagnóstico e o tratamento da epilepsia.

A descoberta do eletroencefalograma (EEG) humano por Berger em 1929 introduziu o instrumento que facilitou a diferenciação da epilepsia de outros distúrbios e ofereceu um recurso adicional para testar as teorias sobre a epilepsia.

Como conceito geral, a epilepsia é considerada como a ocorrência de paroxismos transitórios de descargas elétricas neuronais incontrolláveis, que podem ser causadas por uma grande variedade de fatores, e que resultam em crises epiléticas. Não existe um conceito completamente satisfatório de epilepsia; sob esta denominação é incluída uma ampla categoria de sintomas complexos decorrentes de uma alteração da função cerebral, que podem ser secundários a um grande número de processos patológicos (Guerreiro e colaboradores 1993; 2000).

A epilepsia também pode ser vista como uma Síndrome ou uma condição fisiopatológica crônica caracterizada pela expressão de crises epiléticas que ocorrem mesmo na ausência da doença tóxica metabólica ou estado febril (Gastaut 1973; Rogawski 1990). Este conceito destaca a entidade clínica, descrita como crise epilética, que é definida como resultado das descargas súbitas e excessivas de neurônios numa região do cérebro (crises focais) ou de áreas extensas envolvendo os dois hemisférios (crises generalizadas) (Meldrum 1990). Outra situação importante é o *status epilepticus* (SE), no qual o indivíduo apresenta “crises epiléticas suficientemente prolongadas, ou repetidas em intervalos curtos, que resultam num estado epilético contínuo e duradouro”. Estima-se que entre 1 a 8% dos pacientes epiléticos apresentaram, em algum período da sua doença, pelo menos um episódio de SE.

A incidência de epilepsia é estimada em 100 casos /100.000 pessoas em países em desenvolvimento e ao redor de 50/100.000 em países desenvolvidos (Sander & Hart 1999), com taxa de prevalência de 4 - 10/1.000. Fernandes e colaboradores encontraram uma prevalência de 16,5-20,3/1000 respectivamente para a epilepsia ativa e inativa em Porto Alegre (Fernandes 1993) e Marino e colaboradores, obtiveram uma prevalência na grande São Paulo de 11,9/1000 (Marino e colaboradores 1986).

As faixas etárias com maior incidência estão situadas entre crianças com menos de 2 anos e idosos com mais de 65 anos (Guerreiro 1993). Ocorre um ligeiro predomínio do sexo masculino (Shorvon 1990; Guerreiro 1993; Cockerel & Shorvon 1997; Sander & Hart 1999).

Cerca de 10-20% dos pacientes tem suas crises inadequadamente tratadas apresentando resistência à terapia medicamentosa. Dentre as epilepsias refratárias ao tratamento clínico, aquelas com crises parciais complexas (CPC) com origem no lobo temporal são as mais freqüentes (Sander e colaboradores 1992; Mello 1993; Valério e colaboradores 1995; Jorge 1996; Blüncke 1999).

1.2. CLASSIFICAÇÃO:

Existem muitas classificações das epilepsias: de acordo com a etiologia, idade de início das crises, a topografia das descargas elétricas, manifestação clínicas, achados eletroencefalográficos ou tipos de crises. O problema da classificação é controverso e ainda não existe um consenso sobre o melhor modo de fazê-la. Apesar disto a classificação

mais usada é a proposta pela *League International Against Epilepsy (ILAE)*. A

Classificação das crises epiléticas foi proposta em 1981 (quadro 1) e a das epilepsias e síndromes epiléticas em 1985 e modificada em 1989 (quadro 2). A Classificação das crises epiléticas baseia-se nas manifestações clínicas (quadro 1), não levando em consideração a etiologia e anatomia. Ela divide as crises em dois grupos principais, de acordo com a origem da descarga neuronal primária: as originadas em áreas corticais localizadas, a saber os focos epiléticos (crises parciais) e as caracterizadas por descargas sincrônicas, provenientes de ambos os hemisférios (crises generalizadas). Além disso existem crises que não se enquadram em nenhuma categoria acima, sendo consideradas “não classificáveis”.

As crises focais ou parciais originam-se de um foco epilético, que representa uma região cortical localizada, onde ocorre uma descarga neuronal excessiva. As manifestações clínicas de uma crise parcial dependem da posição do foco no córtex, da propagação ou não dos fenômenos elétricos, e das vias corticais envolvidas. A localização mais comum de origem das crises epiléticas é nos lobos temporais, o que posteriormente será abordado.

QUADRO 1: Classificação Internacional das crises epiléticas

I. CRISES PARCIAIS (origem localizada)	A CRISES PARCIAIS SIMPLES (sem prejuízo da consciência): relativamente raras, visto que progridem, assumindo outras formas
	<ol style="list-style-type: none"> 1) Com sintomas motores 2) Com sintomas somatossensoriais ou sensoriais especiais 3) Com sintomas autossômicos 4) Com sinais psíquicos

	<p>B CRISES PARCIAIS COMPLEXAS (com alteração da consciência): são as mais frequentes .</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Começam como parcial simples e progridem com perda da consciência: <ol style="list-style-type: none"> a. Sem manifestações b. Como manifestações descritas em A .1.4 c. Com automatismos 2) Com alteração do estado de consciência desde o início: <ol style="list-style-type: none"> a. Sem outras manifestações b. Como manifestações descritas em A .1.4 c. Com automatismos
	<p>C Crises parciais secundariamente generalizadas</p>
<p>II. CRISES GENERALIZADAS (bilateralmente simétricas atípicas)</p>	<p>Caracterizada pelo envolvimento simultâneo de todo o córtex, desde o início do quadro, o que é facilmente demonstrável com o EEG.</p> <ol style="list-style-type: none"> A 1. Ausência de crises 2. Crises de ausência típicas <hr/> <p>B Crises Míoclônicas</p> <hr/> <p>C Crises Clônicas</p> <hr/> <p>D Crises Tônicas</p> <hr/> <p>E Crises Tônico-clônicas</p> <hr/> <p>F Crises atônicas</p>
<p>III. CRISES EPILEPTICAS NÃO CLASSIFICADAS</p>	<p>Dados Incompletos ou inadequados</p>

QUADRO 2: Classificação Internacional das epilepsias e síndromes epiléticas e condições relacionadas.

1. Síndromes e epilepsias localizadas (locais, focais ou parciais)	<p>1.1. Idiopática (início relacionado à idade)</p> <p>Epilepsia benigna da infância com espícula centro-temporal</p> <p>Epilepsia da infância com paroxismos occipitais</p> <p>Epilepsia primária da leitura</p>
	<p>1.2. Sintomática</p> <p>Epilepsia parcial contínua progressiva crônica</p> <p>Síndromes com quadros específicos de manifestação</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Epilepsia de lobo temporal ◆ Epilepsia de lobo frontal ◆ Epilepsia de lobo parietal ◆ Epilepsia de lobo occipital
	<p>1.3. Criptogênica</p>
2. Síndromes e epilepsias generalizadas	<p>2.1. Idiopática (início relacionado à idade)</p> <p>Convulsão familiar neonatal benigna</p> <p>Convulsão neonatal benigna</p> <p>Epilepsia mioclônica benigna do lactente</p> <p>Epilepsia ausência da infância</p> <p>Epilepsia ausência juvenil</p> <p>Epilepsia mioclônica juvenil</p> <p>Epilepsia com crises tônico-clônicas ao despertar</p> <p>Outras epilepsias idiopáticas generalizadas</p> <p>Epilepsias desencadeadas por modos específicos de ativação</p>

	<p>2.2. Criptogênica ou sintomática</p> <p>Síndrome de West</p> <p>Síndrome de Lennox-Gastaut</p> <p>Epilepsia mioclônica-astática</p> <p>Epilepsia com ausências mioclônicas</p> <p>Sintomática</p> <p>2.2.1. Etiologia inespecífica</p> <p>Encefalopatia mioclônica precoce</p> <p>Encefalopatia epiléptica infantil precoce com surto-depressão</p> <p>Outras epilepsias generalizadas sintomáticas</p> <p>2.2.2. Síndromes específicas</p> <p>Crises epiléticas complicando outras doenças</p>
<p>3. Síndromes e epilepsias indeterminadas se focais ou</p>	<p>3.1. Com crises focais e generalizadas</p> <p>Crises neonatais</p> <p>Epilepsia mioclônica grave do lactente</p> <p>Epilepsia com espícula-onda lenta contínua durante sono lento</p> <p>Afasia epiléptica adquirida</p> <p>Outras epilepsias indeterminadas</p> <p>3.2. Sem inequívocas características focais ou generalizadas</p>
<p>4. Síndromes especiais</p>	<p>4.1. Crises circunstanciais</p> <p>Convulsões febris</p> <p>Crises isoladas ou estado de mal isolado</p> <p>Crises ocorrendo somente em evento tóxico ou metabólico</p>

2. EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT):

De modo geral, a ELT se caracteriza por apresentar crises parciais simples, complexas, recorrentes, e com generalização secundária (crises Tônico-clônicas), pouco frequentes. Os principais sintomas são gerados principalmente pelo acometimento de estruturas mesiais do lobo temporal, sendo esta a forma mais comum de ELT. Devido a percentagem considerável de pacientes com ELT refratários ao tratamento clínico, cada vez mais busca-se a compreensão dos mecanismos celulares para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes.

2.1 LOBO TEMPORAL E FORMAÇÃO HIPOCAMPAL:

O lobo temporal mesial é anatomicamente relacionado à formação hipocampal, que por sua vez comunica-se intimamente com a amígdala e com outras estruturas do sistema límbico. O termo formação hipocampal (FH) geralmente inclui subiculum, giro denteado (GD) e o hipocampo propriamente dito (HPD) (Brown & Zador 1990; Knowles 1992; Jorge e colaboradores 1996).

O hipocampo é a região medial subcortical mais alongada do lobo temporal que se curva para cima e para dentro para formar a superfície ventral da ponta do anterior do ventrículo lateral (Fig. 1.A). Uma das extremidades do hipocampo fica junto dos núcleos amigdalóides, e também se funde ao longo de suas bordas, com o giro do para-hipocampo, que é o córtex da superfície ventromesial do lobo temporal (Guyton 1993). Ele consiste

de 3 regiões corticais que são interconectadas e extensivamente conectadas a outras estruturas límbicas, neocorticais e subcorticais. As células piramidais do subiculum e hipocampo são primariamente neurônios de projeção. Eles são interconectados com células granulares denteadas e interneurônios hipocampais.

Lorente de Nó (1934) dividiu o hipocampo em sub-regiões CA1- CA4 (CA- abreviatura para *cornu ammonis*) (Fig. 1.A). CA1 em humanos é uma região de neurônios piramidais pequenos dispersos e triangulares adjacentes ao subiculum (Knowles 1992). Blackstad em 1956 observou em roedores que os neurônios piramidais de CA1 são densamente agrupados (Knowles 1992); o CA2 em humanos está localizado entre CA1 e CA3 consistindo de neurônios piramidais grandes e ovóides densamente agrupados e nos roedores são pequenos e menos distintos; CA3 está localizado na porção do hipocampo próxima ao GD.

Os neurônios de CA3 são similares a CA2, só que menos agrupados. Estes neurônios também são distinguidos pela presença de uma densa inervação de fibras musgosas das células granulares (Fig.1.A). A região dentro da concavidade do GD foi denominada de CA4 por Lorente de Nó, posteriormente denominada de hilo denteado (Fig.1.B). O limite entre CA e GD não é determinado facilmente, existindo uma região polimorfa ou endofolium, sendo importante na fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal (ELT). O GD é dividido em 3 camadas, onde a principal é a granular, composta predominantemente pelas células granulares; seus axônios são as fibras musgosas (Fig.1.B) (Mello1993; Jorge e colaboradores 1996).

No HPD foram identificados pelo menos dois tipos celulares: células piramidais e neurônios intrínsecos. Os neurônios piramidais pertencem à classe mais numerosa do hipocampo. A morfologia destas células variam gradualmente em torno do HPD, sendo evidente se compararmos a região CA3 e CA1 (Fig. 1B) (Brown & Zador 1990). O soma

se dispõe numa camada denominada de *stratum pyramidale*. As terminações dendríticas e arborizações axonais das mesmas constituem outras camadas (Fig. 1.B): 1) *stratum alveus* (camada polimórfica) contém algumas aferências ao hipocampo, principalmente os axônios das células piramidais do hipocampo (Andersem e colaboradores 1964); 2) *stratum oriens*, uma camada entre o alveus e a camada piramidal, contém os dendritos basais das células principais além de algumas células em cesto; 3) *stratum pyramidale* contém o corpo das células piramidais; 4) *stratum radiatum* e o 5) *stratum lacunosum/moleculare*, são formados respectivamente por segmentos proximais e distais das arborizações dendríticas apicais.

A segunda classe de neurônios encontrados no HPD são um grupo heterogêneo de neurônios intrínsecos do hipocampo. Os interneurônios do hipocampo incluem as células em cesto (“basket cells”), *interneurônios oriens/ alveus*; interneurônios do *moleculare/lacunosum* e as células em candelabro (“chandelier cells”). As células em cesto localizam-se próximo do *stratum pyramidale* e funcionalmente atuam inibindo as células piramidais via sinapses axo-somáticas. Estas células participam da formação de circuitos inibitórios do tipo “Renshaw” (Knowles 1992).

Os interneurônios *oriens/ alveus* e os interneurônios do *moleculare/lacunosum*, localizados nas bordas destas camadas, também tem um papel inibitório via sinapses axo-somáticas, já as células em candelabro inibiriam as células piramidais no segmento inicial do axônio (Brown & Zador 1990; Knowles 1992).

FORMAÇÃO HIPOCAMPAL E CIRCUITARIA

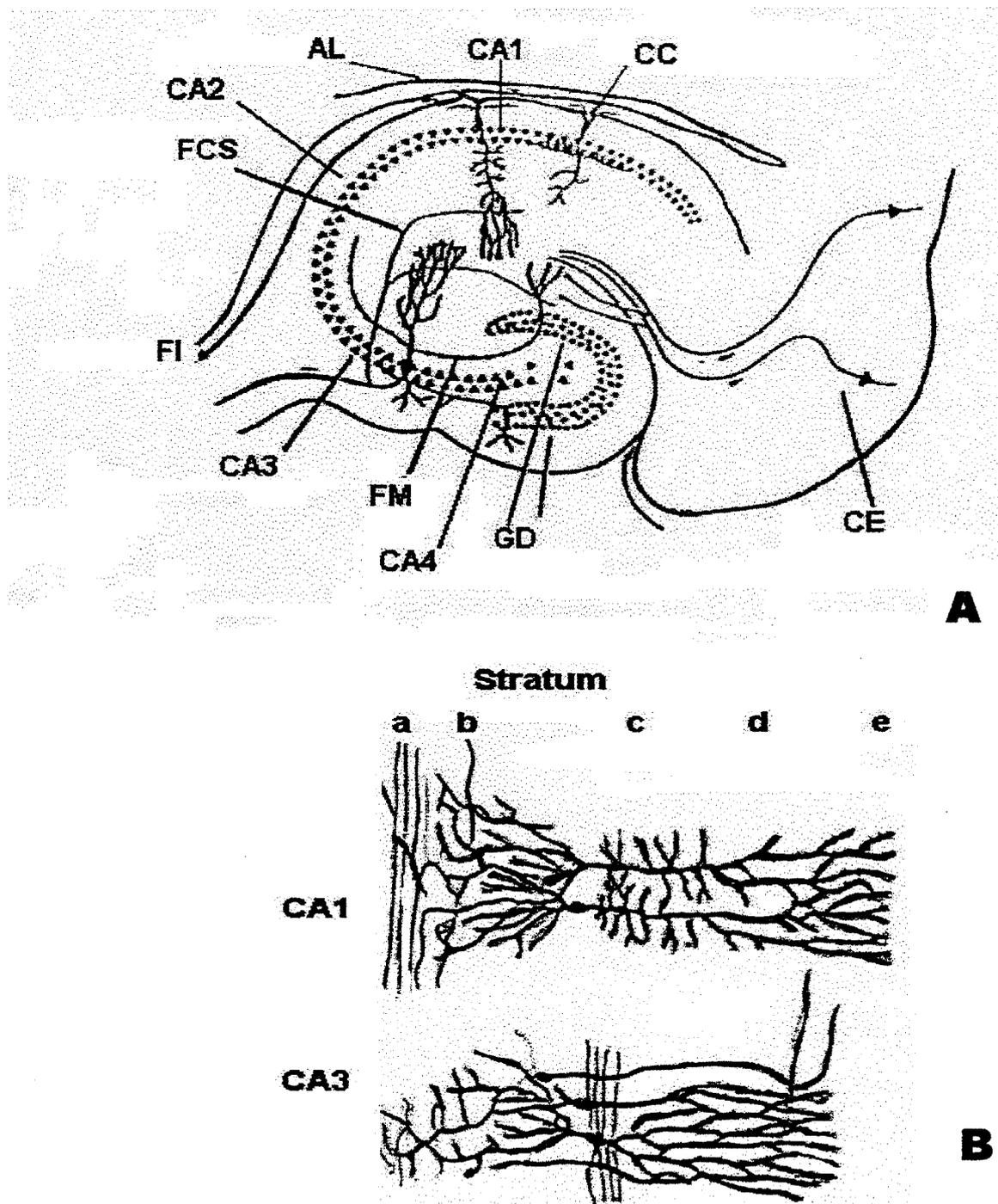


FIG.1.A) Corte coronal do hipocampo mostrando as canadas e vias sinápticas. B) Detalhe das áreas de CA1 e CA3 do HPD mostrando camadas: a- *stratum alveus*; b- *stratum oriens*; c- *stratum pyramidale*; d- *stratum radiatum*; e- *stratum moleculare*.. AL- alveus. CC- células em cesto. CE- córtex entorrinal; FCS- fibra colateral de Schaffer; FI- fimbria; GD- Giro denteado; explicação no texto (extraído de Shepperd 1990)

A mais importante via excitatória da formação hipocampal forma a via tri-sináptica lamelar (Brown and Zador 1990; Knowles 1992; Sanabria e colaboradores 1997). Nesta via, em condições normais, as células granulares (DG) recebem sinais excitatórios, geralmente glutamatérgicos, provenientes do córtex entorrinal (camada II) (Fig. 2), através da via perforante. As células entorrinais da camada II e III projetam também parte de seus axônios às áreas CA2 e CA3 (Brown & Zador 1990). Das células granulares (CG) do GD partem fibras axonais que formam a via das fibras musgosas (FM) que fazem conexão com CA3 e CA2 do HPD,

Os neurônios piramidais de CA3, por sua vez, inervam a área CA1, através das via das fibras colaterais de Schaffer (FCS), que formam sinapses excitatórias (Brown & Zador 1990; Knowles 1992; Sanabria e colaboradores 1997; Gutierrez 1999). As FCS são as mais extensivamente estudadas no cérebro de mamífero, principalmente em experimentos eletrofisiológicos “*in vitro*”, sendo popular em estudos farmacológicos de rotina e estudos de plasticidade sináptica entre outros (Kelso & Brown 1986)

Os axônios piramidais de CA1 se organizam no *alveus* ou em fibras comissurais que se projetam lateralmente. A informação neural é transmitida em CA1 ao subiculum, assim como a outras áreas, constituindo uma via de informação pré-processada no hipocampo.

No caso das epilepsias do lobo temporal e modelos em animais com epilepsia crônica ocorrem aberrações nas conexões sinápticas (Brown & Zador 1990; Mello 1993; Gutierrez e colaboradores 1999 a, b), com proliferação (“sprouting”) das fibras musgosas desenvolvendo colaterais recorrentes que invadem a camada molecular (Mello 1993). Essa reorganização aberrante das fibras musgosas já foi proposta como a base da hiperexcitabilidade e das crises (Tauck e colaboradores 1985) e será abordada

posteriormente quando forem apresentadas as hipóteses que tentam explicar a origem das crises epiléticas.

CIRCUITARIA BÁSICA DO HIPOCAMPO

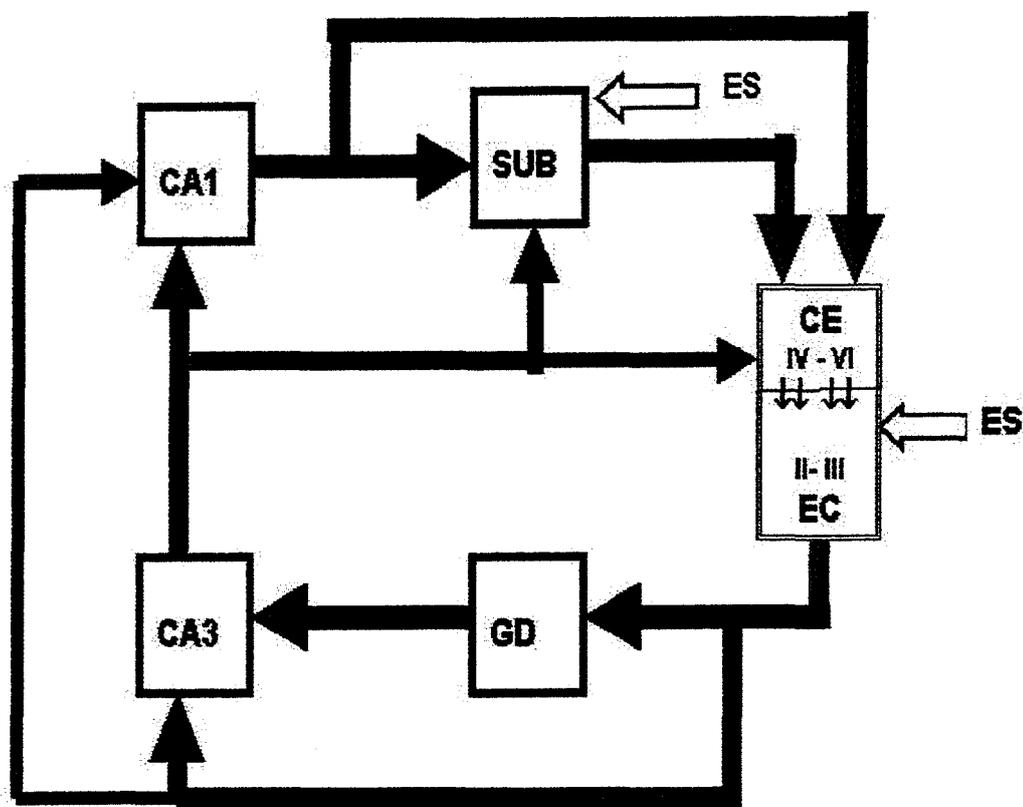


Fig. 2 Circuitaria Básica do Hipocampo. A figura mostra as diversas conexões das estruturas do hipocampo. Notar que cada área, com exceção de GD, projetam pelo menos para 2 outras áreas. SUB- subículo; CE- córtex entorrinal, GD- giro denteado; ES- entrada sensorial (adaptado de Shepperd 1990)

2.2 PATOLOGIA HIPOCAMPAL NA ELT :

Historicamente, os primeiros estudos sobre a esclerose mesial temporal (EMT) e sua relação com a ELT datam de 1825, quando Bouchet e Cazanvieu, descreveram a atrofia e endurecimento do hipocampo no exame pós-mortem. Os autores concluíram que o hipocampo poderia ser a estrutura mais comprometida (Babb & Brown 1987).

Em 1880, Sommer, (apud – Jorge e colaboradores 1996) descreveu nos primeiros estudos microscópios que além da existência de assimetria hipocampal haveria perda neuronal e que esta predominaria no setor que corresponde a CA1 e pró-subículo de Lorente de Nó.

A atrofia hipocampal pode ser vista em exames de ressonância magnética de alta resolução em pacientes com ELT, porém esta atrofia nem sempre é tão evidente chegando a não ser detectada nem em avaliações histopatológicas de rotina. Em menos de 50% dos casos a contagem celular (técnicas quantitativas) são necessárias para avaliar a perda neuronal do hilo e CA1 (Engel 1996a). Constatou-se ainda uma astrogliose hipocampal (Blunke 1999) e em 60-65% das ELT ocorre atrofia unilateral severa de FH.

Histopatologicamente, o hipocampo destes pacientes revela uma perda segmentar neuronal (Trevisol e colaboradores 1992; Guerreiro 1993, Müller 1993a 1993b; Engel 1996a; Quigg e colaboradores 1997; Bluncke e colaboradores 1999; Coutinho 1999), existindo uma intensidade gradual de perda neuronal nos vários subcampos atingindo em ordem decrescente: CA1 e setor de Sommer (pró-subículo); hilo do GD e CA3; Células granulares do GD e CA2 (Bluncke e colaboradores 1999; Coutinho 1999). A perda neuronal aparece em outras áreas mesiais temporais como na camada III do córtex entorrinal (Du e colaboradores, 1993) e o núcleo lateral da amígdala (Miller e

colaboradores 1997; Bluncke 1999; Pitckamen e colaboradores 1998). Estes achados caracterizam a EMT.

Embora se observem, em pacientes epiléticos, mudanças morfológicas descritas anteriormente, ainda se desconhece o papel destas alterações. Em células hipocampais de roedores cultivadas, utilizando modelos que mimetizam a neuropatologia humana, sugeriu-se que a EMT seria uma consequência da atividade epilética crônica. Isto implica também, numa perda dos interneurônios do HPD e GD, além de modificações morfológicas das células piramidais sobreviventes (Muller 1993a, 1993b).

ESCLEROSE HIPOCAMPAL

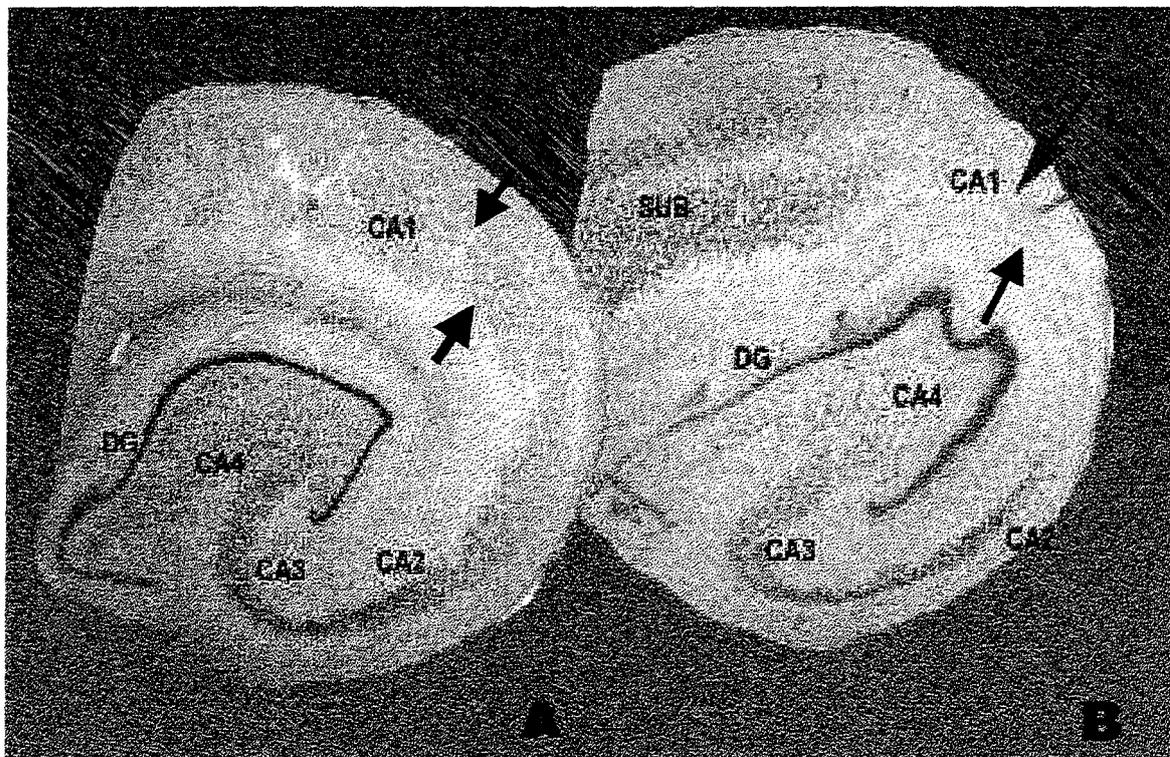


Fig.3 A figura acima mostra dois hipocampos. em A) um hipocampo normal com CA1 bem evidenciado (setas) já em (B) mostra um típico hipocampo com esclerose e com severa perda de CA1

2.3 BASES CELULARES NA ELT E GERAÇÃO DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME:

O hipocampo parece ter uma maior sensibilidade para a gênese da atividade epileptiforme. A aplicação de métodos invasivos, com eletrodos profundos, demonstraram a localização da atividade epileptiforme em estruturas mesiais, fundamentalmente o hipocampo (Babb e colaboradores 1984), cuja remoção resulta numa melhora significativa em comparação aos casos em que este não é removido.

Com o uso de drogas agonistas e antagonistas dos receptores foi possível verificar a importância da transmissão gabaérgica e glutamatérgica na gênese da atividade epileptiforme.

2.3.1. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS:

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (Watkins & Evans 1981; Isokawa 1997). Identificamos 2 classes de neurorreceptores glutamatérgicos, classificados de acordo com o superfamília de canais iônicos com portões controlados por ligantes (ionotrópicos) e uma terceira classe de receptores associados ao sistema de segundo mensageiros ligados a proteína G (metabotrópicos) sendo subdividido em três subclasses classe I, II e III . A ligação do glutamato ao receptor desta classe gera uma cascata de processos enzimáticos que, de forma indireta, promovem a abertura dos canais de Na^+ , e com isto uma resposta excitatória (McGonige & Molinof 1994; Dingledine & McBain 1994).

A classificação dos receptores glutamatérgicos foi feita de acordo com os mecanismos de ação, quais sejam: **NMDA** e os **NÃO NMDA** (Zigmond 2000). Ambos, por estarem inseridos no próprio canal iônico, atuam diretamente na abertura do mesmo (Dingledine & McBain 1994). No hipocampo encontramos principalmente estes grupos de neuroreceptores, com distribuição distinta nas diferentes regiões (de Lanerole e colaboradores 1990; Penney e colaboradores 1990; Dingledine & McBain 1994), além de serem ativados sobre diferentes condições fisiológicas (de Lanerole e colaboradores 1990; Penney e colaboradores 1990).

Os receptores não-NMDA são representados pelos receptores: AMPA (ácido α -amino-3-hidroxy-5-metil-isoxazolepropionico) e Cainato. O hipocampo é rico em receptores do tipo AMPA, cujo mecanismo de ação é rápido e a abertura do canal provoca um influxo de Na^+ . Tanto a atuação como a distribuição do Cainato no hipocampo ainda permanecem obscuras, embora a área de CA3 seja sensível a ação nestes receptores (Monaghan e colaboradores 1989).

RECEPTORES NMDA:

Os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) possuem uma estrutura complexa, com pelo menos 5 sítios distintos de ligantes endógenos que influenciam na abertura do canal (Monaghan e colaboradores 1989; Dingledine & McBain 1994; Zigmond 2000). Consistem de dois sítios de reconhecimento de agonistas (glutamato e glicina); um sítio regulatório, que promove a ativação e separa os sítios de reconhecimento para o Mg^{2+} e Zn^{2+} que atuam inibindo o fluxo iônico através da ligação do agonista com o receptor. A

ativação dos receptores NMDA produz um aumento na permeabilidade de Na^+ e Ca^{2+} e essa mudança na permeabilidade é voltagem e Mg^{2+} dependente.

2.3.2 RECEPTORES GABAÉRGICOS:

No hipocampo e córtex cerebral a inibição é produzida primariamente por células locais do circuito i.e. os interneurônios. Cerca de 80% destes interneurônios hipocampais são imunorreativos para o neurotransmissor inibitório GABA (ácido γ - amino butírico), cujos receptores são o **GABA_A** e o **GABA_B** (Avoli e colaboradores 1997; Nurse & Lacaille 1997). O receptor GABA_A é do tipo ionotrópico responsável por uma resposta inibitória rápida (Brooks - Kayal e colaboradores 1998) e de curta duração, em contrapartida o receptor GABA_B é metabotrópico apresentando uma resposta mais tardia e duradoura.

RECEPTORES GABA_A:

O receptor GABA_A (GABAR) é um complexo protéico, composto por múltiplas combinações das subunidades (α , β , γ , δ e ρ), que formam os canais com abertura controlada por ligantes ânion-seletivos para cloreto. O complexo inclui 5 grandes sítios de ligação, que são: o sítio para o GABA, o sítio para barbitúricos, o sítio para benzodiazepínicos, o sítio para esteróides e o sítio para picrotoxina. Estes domínios de

ligação servem para modular a resposta a estimulação do GABA constituindo um complexo integrado ao próprio canal do cloreto.

Estes receptores inibitórios são responsáveis não apenas pela integração neuronal, mas também pela sincronia e recrutamento da atividade epileptógena (da Costa e colaboradores 1992; Schwartzkroin 1994; Avoli 1995; Gibbs 1996; Isokawa 1997). Foi sugerido que as alterações seletivas nas subunidades dos receptores GABA_A poderiam estar implicadas na epileptogênese (Brooks & Kayal 1998). Em circunstâncias fisiológicas, o neurotransmissor GABA interage com receptores GABA_A pós-sinápticos (GABARs), compostos por múltiplas subunidades. A composição das subunidades varia em diferentes regiões cerebrais e em diferentes tipos celulares, que implica em diferentes comportamentos farmacológicos e funcionais (Brooks & Kayal 1998). Estudos demonstraram a expressão diferencial dos RNAs mensageiros das subunidades dos GABARs em neurônios de ratos epiléticos, pelo modelo da pilocarpina, sugerindo que este fenômeno constitua um processo essencial na epileptogênese (Rudy & Iverson 1992).

2.3.3 DESCARGA INTERICTAL e ICTAL:

Embora se saiba muito sobre as bases fisiológicas das descargas anormais que acompanham as crises, os mecanismos celulares responsáveis pela epileptogênese permanecem indeterminados. Uma descrição das bases elétricas e celulares da epilepsia deveria definir as circunstâncias que dão origem a descarga elétrica inicial (ictal e interictal), especificar o que constitui e a causa da transição de interictal para ictal, além de analisar os mecanismos sinápticos e não sinápticos pelos quais as descargas elétricas se difundem-se e os mecanismos que levam ao término da atividade epilética.

2.3.3 1 DEFINIÇÃO DE DESCARGA INTERICTAL E ICTAL:

A atividade interictal é um tipo de atividade epileptiforme freqüentemente encontrada em registros eletrofisiológicos de pacientes portadores de epilepsia crônica. Esse fenômeno pode aparecer tanto no Eletroencefalograma (EEG) de superfície como registros electrocorticográficos ou de estruturas profundas, sendo que esta localização topográfica ajuda a definir a localização do foco epileptogênico (Privitera e colaboradores 1990), assim como a área a ser removida na cirurgia (Lantz, e colaboradores 1996). A atividade interictal pode ser observada de forma espontânea em estudos *in vitro* em células de tecido humano obtidos de cirurgia para o tratamento de ELT (Kohling e colaboradores 1998).

A Fig.4 ilustra os conceitos sobre a relação entre os vários registros extracelulares e intracelulares em relação aos fenômenos interictais e ictais. Pontas interictais (representadas pelo EEG com distribuição focal ou generalizada) corresponde no registro intracelular à uma despolarização paroxística em neurônios principais alterando o seu potencial de membrana e está associado a uma eclosão de Potenciais de ação, seguida por uma fase de hiperpolarização.

O estudo eletrofisiológico *In vitro* de atividade interictal espontânea em modelos experimentais de epilepsia crônica apresenta aspectos polêmicos, já que em muitos casos é necessário adicionar ao meio de perfusão do tecido a ser estudado algum agente convulsivante (Nagao e colaboradores 1994). Os mecanismos básicos para a gênese da atividade interictal tem sido estudados em modelos de epilepsia, na sua maioria desenvolvidos na década de 80, usando “fatias de cérebro” (“brain slices”) onde as conexões sinápticas são preservadas. A maioria desses modelos foi desenvolvida em “fatias de hipocampais” pela alteração da composição iônica do meio de perfusão,

incluindo a redução do Ca^{2+} (Jefferys & Haas 1982), ausência de Mg^{2+} (Anderson e colaboradores 1986) ou elevação do K^+ (Trainelis & Dingledine 1988).

A descarga interictal foi definida como atividade de natureza epileptiforme hipersincrônica de um grupo de neurônios (Ajmore Marsan 1961) sendo considerada como um fenômeno da rede neuronal cujos mecanismos básicos de sua gênese ainda não estão completamente elucidados. Um dos achados mais interessantes da descarga interictal no EEG é uma modificação paroxística do potencial de membrana detectadas através de registros IC durante a atividade interictal e denominada de “desvio despolarizante paroxístico” ou “onda despolarizante paroxística” do inglês “paroxysmal depolarization shift” (PDS). Os estudos eletrofisiológicos de células epiléticas iniciados na década de 60 verificaram que o PDS nos registros intracelulares correspondia a ponta interictal do EEG, habitualmente assintomática i.e. não causando modificação do comportamento dos pacientes e geralmente originadas na região do foco epilético.

DESCARGAS INTERICTAIS E ICTAIS

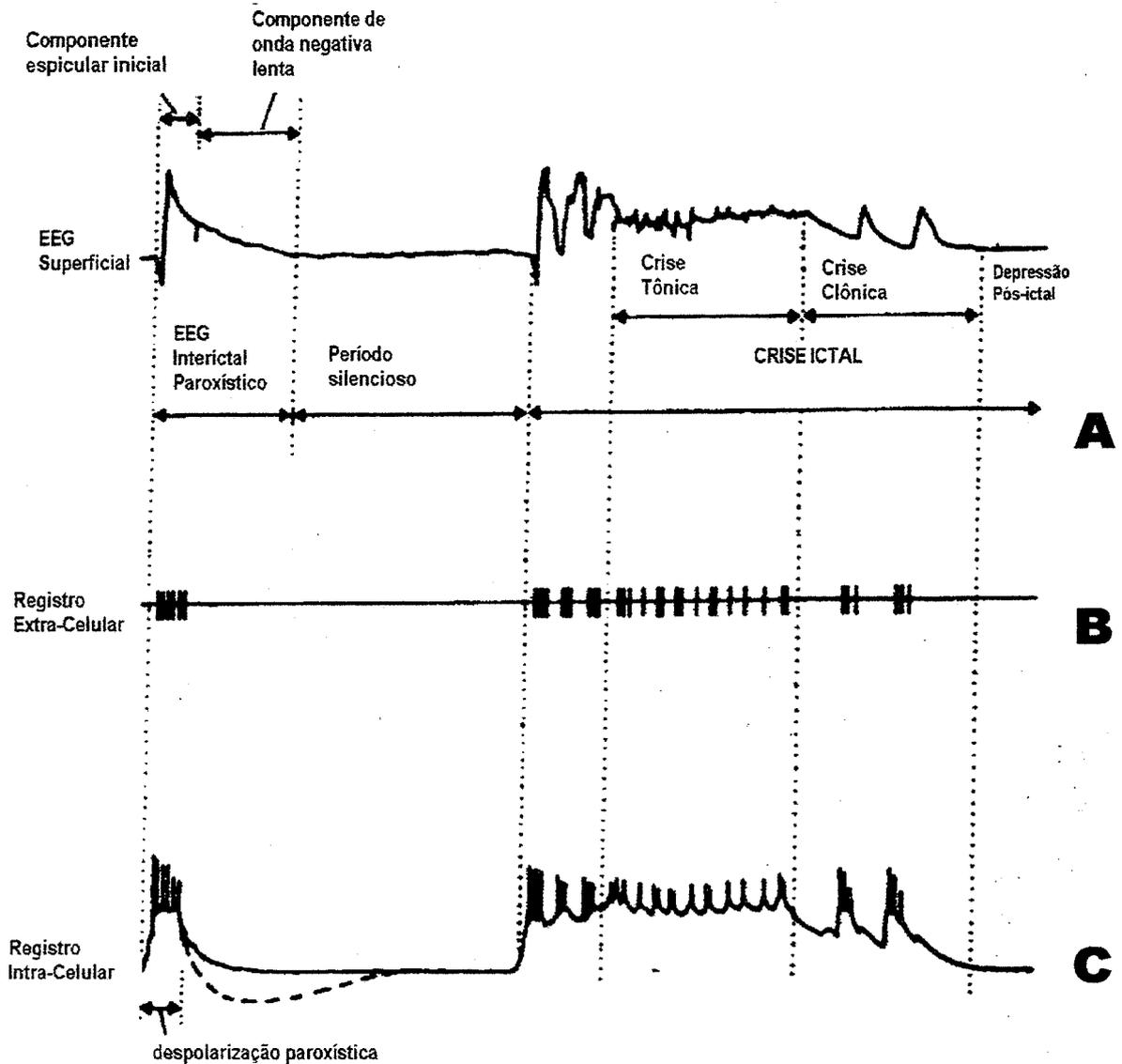


Fig.4 Diagrama esquemático das relações entre descargas corticais, EEG de superfície, (A) e atividade extra-celular (B) e intracelular (C). A esquerda observa-se uma descarga interictal isolada. A direita, uma atividade ictal Tônico-clônica (Meldron 1990)

O PDS consiste de uma despolarização de alta voltagem e prolongada da membrana neuronal associada a uma salva (“burst”) de potenciais de ação. Na maioria dos neurônios corticais, o PDS é gerado por uma grande corrente excitatória que pode ser aumentada pela ativação de correntes intrínsecas reguladas pela voltagem (Johnston & Brown 1981, Dichter & Ayala 1987). Inicialmente o fenômeno de PDS foi definido como um fato particular, uma despolarização súbita da membrana em um neurônio como consequência de uma série de processos complexos originários de uma rede neuronal sinapticamente conectada (Matsumoto & Ajmore Marsan 1964).

Em modelos experimentais, nos quais descargas contínuas semelhantes as ictais podem ser produzidas por drogas ou alterações iônicas, as descargas ictais tornam-se mais frequentes desaparecendo a fase de hiperpolarização, de modo que as despolarizações paroxísticas tornam-se recorrentes. Estas descargas estão associadas a um aumento na concentração extracelular de K^+ e uma diminuição do Ca^{2+} .

No caso das crises parciais, a localização das descargas paroxísticas está inicialmente associada a uma atividade inibitória aumentada nas áreas de projeção do cérebro. Posteriormente ocorre uma redução nesta atividade associada com o aumento e por fim com predominância da neurotransmissão excitatória, gerando disparos sincronizados em áreas corticais relacionadas ou em núcleos cerebrais profundos. Desta maneira a atividade elétrica pode difundir-se no sistema límbico (amígdala, hipocampo) ou do córtex para os gânglios basais e tálamo.

O término da atividade epiléptica está associado a interrupção das descargas elétricas e a substituição das despolarizações paroxísticas pela manutenção da hiperpolarização, provavelmente por consequência dos processos inibitórios ativos. Sinais

emitidos pelo gânglio basal (substância nigra e sistema pálido) parecem ser importantes na modulação e generalização da atividade epiléptica. (Bett 1990).

2.3.3.2. EXTINÇÃO DA DESCARGA INTERICTAL:

Das descargas “em salva” da atividade interictal segue-se um período de hiperpolarização onde não são observados disparos de PA (Matsumoto & Ajmore Marsan 1964, Wong & Prince 1981; Bett 1990). Estudos prévios sugeriram que esta hiperpolarização seria responsável pela extinção do PDS

3. O USO DE FATIAS CEREBRAIS (“BRAIN SLICE”) NO ESTUDO DA ELT:

Técnicas como a das fatias de cérebro (“brain slices”) e do cultivo celular “*in vitro*” têm permitido o estudo da atividade extracelular e intracelular “*in vitro*”, com a possibilidade de visualizar tanto o local de estimulação quanto realizar registros extra e/ou intracelulares. Outra facilidade é a possibilidade de manipulação do meio externo, modificando sua concentração iônica (Baschin 1992; Henderson 1993; Dingleline 1984). Através disto, é possível não só mimetizar condições morfo-fisiológicas normais *in vivo*, além de patológicas (Prince e colaboradores 1981; da Costa 1992; Schwartzkroin 1994),

mas também a realização de estudos mais refinados que demonstram a abertura e fechamento dos canais iônicos (“patch clamp”), (Hille 1992).

Em 1955, Ward e Thomas registraram extracelularmente a atividade dos neurônios neocorticais humanos epiléticos que haviam sido cirurgicamente removidos. Em 1976, Schwartzkroin e Prince relataram os primeiros registros intracelulares *in vitro* de tecido humano epiléticos (Schwartzkroin & Prince, 1976). Desde então muito tem sido feito. Entretanto, hoje em dia ainda existem obstáculos quanto a utilização de tecido humano, envolvendo aspectos éticos e problemas técnicos (Schwartzkroin 1983, 1994), como por exemplo a escolha de um grupo controle viável.

A atividade epileptiforme pode ser estudada *in vitro* utilizando-se as fatias cerebrais e cultura de neurônios, onde se induz atividade epileptiforme (Schwartzkroin e colaboradores 1983; da Costa e colaboradores 1992; Schwartzkroin 1994; Avoli 1995; Gibbs 1996; Isokawa 1997). Os modelos de epilepsia *in vitro* mais frequentemente utilizados envolvem 1) estimulação elétrica repetitiva; ou 2) aplicação na solução nutriente de perfusão convulsivantes, incluindo a) concentrações alteradas (K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}); ou b) quimioconvulsivantes (Al Noori 1998).

Os modelos que envolvem a adição de agentes convulsivantes e/ ou modificação de concentrações iônicas do meio de perfusão têm permitido a identificação de alguns mecanismos envolvidos na gênese da atividade epileptiforme. Por exemplo: um meio de perfusão com ausência de Mg^{2+} .

Quanto a interferência com as vias inibitórias, o tratamento com antagonistas dos receptores GABA como a bicuculina, a picrotoxina (da Costa e colaboradores 1992; Avoli 1995; Gibbs 1996) e a penicilina (Avoli 1989), tem um efeito convulsivante.

Esta técnica permite avaliar a contribuição do circuitos inibitórios locais que atuam inibindo tonicamente circuitos excitatórios; e a depressão ou bloqueio da inibição

que permitiria as interações excitatórias polissinápticas, que levariam às descargas epileptogênicas. Assim, no hipocampo, os diferentes tipos celulares do hipocampo respondem diferentemente aos estímulos lesivos: as células granulares e em cesto (interneurônios inibitórios) são as mais resistentes, enquanto as células musgosas são as mais vulneráveis. Estas últimas são excitatórias glutamatérgicas das células em cestos, que impedem descargas neuronais excessivas das células granulares. A morte das células musgosas acarreta na inativação das células em cesto que permanecem inativas (“dormência”), que será abordada posteriormente (Sloviter 1983). As crises epilepticas neste caso seriam ocasionadas pela falta de inibição nas células do GD.

3.1 MODELO DE INDUÇÃO DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME PELA AUSÊNCIA DO ÍON Mg^{2+} NO MEIO DE PERFUSÃO:

Neste modelo, as fatias cerebrais são expostas a um ACFs livre de Magnésio podem apresentar descargas interictais espontâneas nas áreas CA1 e CA3 (Anderson et al, 1986). O envolvimento do receptor NMDA nessa atividade epileptiforme pode ser observado através da adição do APV (antagonista do NMDA) antes e durante o tratamento com o ACFS livre de Mg^{+2} . Os mecanismos subjacentes a esta atividade poderiam incluir uma redução de carga (Frankenhaeuser et al, 1957) e/ ou remoção do bloqueio dos canais NMDA (Nowak, et al 1984) que é normalmente feito pelo Mg^{+2} . A atividade resultante tem sido descrita em preparações de fatias cerebrais de neocórtex (Silva, et al; 1991), bem como em cultura de neurônios hipocâmpais (Gutierrez, 1999).

4 GERAÇÃO DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME:

Foram propostas duas teorias que tentam explicar a origem das crises epilépticas: ① a hipótese neuronal propõe que as propriedades intrínsecas do neurônio estão alteradas, e ② a hipótese da rede neuronal baseia-se na atividade sináptica anormal (Schwartzkroin 1994). Entretanto, autores sugerem que a comunicação neuronal responsável pelas crises podem ser geradas também pela atuação de elementos não sinápticos associados com os elementos sinápticos (Trainelis & Dingledine 1988; McNamara 1994)

4.1 ALTERAÇÃO DAS PROPRIEDADES INTRÍNSECAS DO NEURÔNIO: “NEURÔNIO EPILÉPTICO”:

Alguns autores defendem a idéia do chamado “neurônio epiléptico, no qual modificações das propriedades biofísicas (passivas ou ativas) da membrana seriam responsáveis pelo início das crises. Alguns trabalhos em eletrofisiologia utilizando fatias de tecidos de hipocampo ou neocórtex, de pacientes que se submeteram a cirurgia não evidenciaram alterações significativas nestes parâmetros, levando a crer que não seria este o mecanismo responsável pela epileptogênese (Schwartzkroin 1994). Entretanto, outros trabalhos mostraram a existência de alterações específicas em determinadas correntes iônicas em neurônios de pacientes epilépticos (Mody 1998).

4.1.2 AUMENTO DO NÚMERO DE NEURÔNIOS QUE DISPARAM DESCARGAS EM SALVA (DS):

Estudos prévios em tecido epiléptico crônico mostraram alguns grupos de neurônios disparavam “trens” de PA (Calvin e colaboradores 1973; Wyler e colaboradores 1975). Verificou-se, no modelo do abrasamento (“kindling”) de hipocampo de ratos que o número destas células estava aumentado alguns dias após a indução das crises epiléticas (Yamada & Bikey 1991; Zhao & Leung 1993)

As células que disparam este tipo de atividade podem também ser denominadas de células “burst”. O termo “burst “ significa trem, surto ou salva de vários potenciais de ação ou 3-5 espículas de amplitude decrescente disparadas a alta frequência (80-200 Hz) e que emergem geralmente de uma onda despolarizante lenta de 20 a 100 ms. de duração.

4.1.2.1 CLASSIFICAÇÃO:

Existem dois subtipos diferentes de neurônios com descargas em salva (CDS) nos sistemas neuronais: 1) o endógeno e 2) o do agregado neuronal.

Quadro 2: classificação dos subtipos neurônios com descargas em salva (Fig.3).

Subtipos	Gênese das descargas em salva	
	Evocada	Espontâneo
CDS neuronal	CDS intrínseco evocado	CDS intrínseco
Endógeno ou intrínseco	Por injeção intracelular de corrente	Espontâneo
CDS do agregado	CDS evocada no agregado neuronal por	CDS espontânea do

neuronal	estimulação aferente da população de neurônios	de agregado neuronal
<hr/>		

4.1.2.2 GÊNESE DA DS NEURONAL INTRÍNSECA:

As descargas “ em salva” (DS) podem ser gerados de forma intrínseca em neurônios individuais (não necessariamente interconectados) por mecanismos intrínsecos neuronais (Fig.5). Existem algumas premissas básicas para se considerar que este tipo de atividade possua natureza endógena (Johnston & Brown 1984). Uma das premissas mais importantes diz que a DS intrínseca depende do potencial de membrana em repouso (PMR). Quando se estuda a frequência de aparição do mesmo em função do PMR pode se observar que uma hiperpolarização da membrana diminui essa frequência, assim como a probabilidade de diminuir ou mesmo bloquear a DS (Fig.5) (Johnston & Brown 1984)

Esta atividade é provocada por correntes iônicas, sendo elas: correntes de K^+ (Av Ron 1994;); correntes lentas de sódio (persistentes) (Alkadhi & Tian 1996, Azous e colaboradores 1996) e correntes de cálcio (Wong & Prince 1978; Aicard & Schwartzkroin 1990; Andrew 1987) podem gerar uma onda despolarizante lenta da qual pode eventualmente emergir a DS (Fig.5.B). Neste caso, se forem aplicadas correntes positivas dentro da célula ou se a membrana for despolarizada por pulsos breves de correntes ou por uma estimulação ortodrômica de baixa intensidade, a resposta será uma DS.

A DS endógena pode ser também espontânea, neste caso a atividade ocorre sem qualquer estímulo (Fig. 5A.b), persistindo em condições onde há o bloqueio de toda a atividade sináptica (Konnert e colaboradores 1986; Pan & Stringer 1996). Este tipo de

neurônio recebem a denominação de “neurônios com descarga em salva (Connors 1984; Connors e colaboradores 1982). Um fenômeno interessante ocorre neste tipo de neurônio e consiste na chegada de potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) nos mesmos onde freqüentemente emergem DS quando o limiar é atingido (Fig.5.A-d.). Assim os PEPS podem induzir um fenômeno intrínseco de DS.

GÊNESE DAS DESCARGAS EM SALVA (“BURST”)

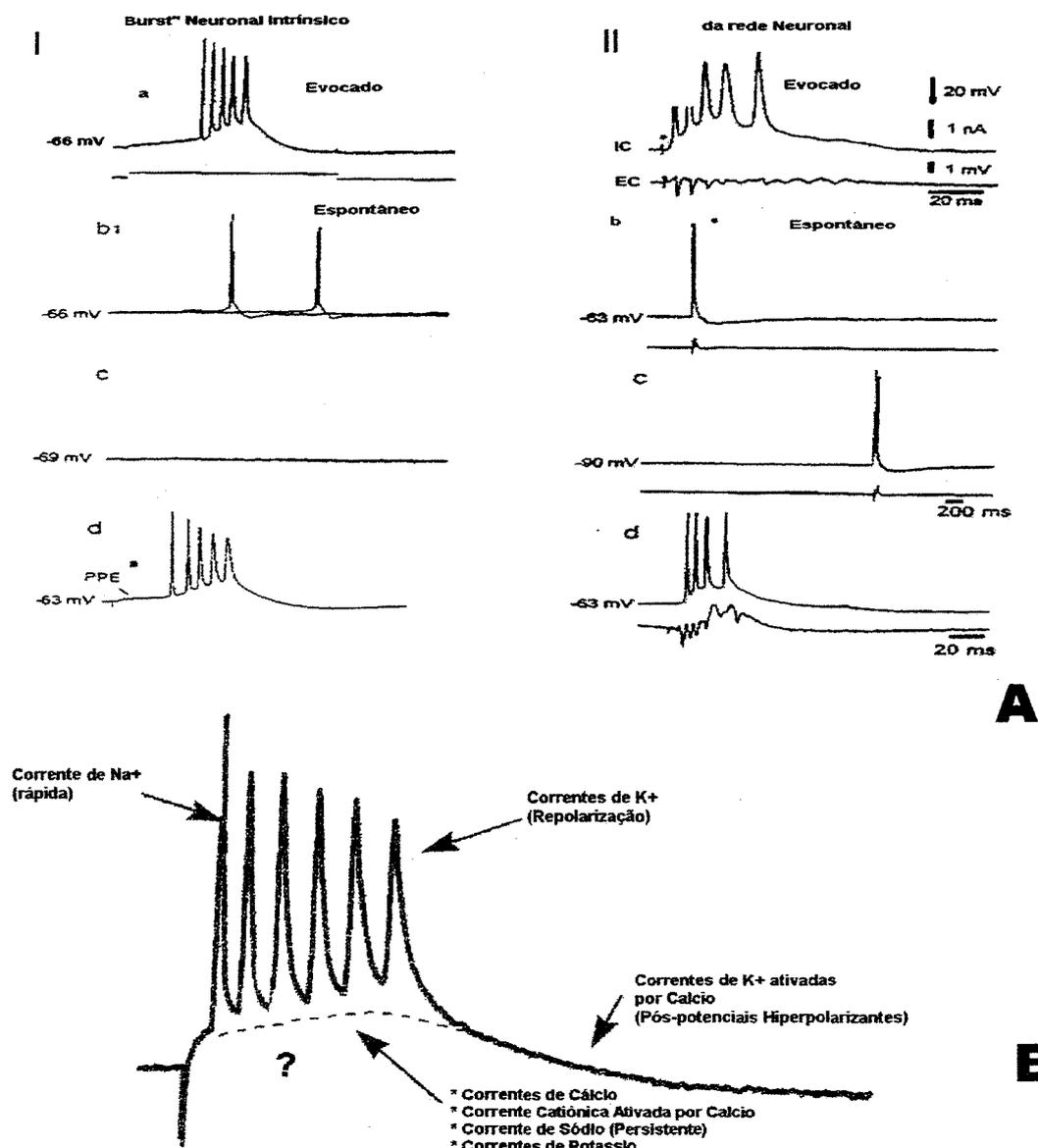


Fig 5. A) Gênese das descargas em salva neuronais intrínsecas (I) e descargas em salva (“burst”) da rede neuronal (II) . A parte I mostra a gênese da descarga em salva após estimulação com corrente despolarizante que atinge o limiar (I-a), espontaneamente (I-b), ou por PPE (I-d) . Uma ligeira hiperpolarização da MP pode bloquear a gênese das DS endógeno (I-c). (II) Apresenta uma descarga em salva evocada na rede neuronal após estimulação ortodrômico (II-a) ou espontâneo (II-b). Nota-se que a descarga em salva B) Mostra uma DS onde são mostradas as correntes iônicas que participam da gênese desta atividade.

4.1.2.3 CLASSIFICAÇÃO DO DISPARO NEURONAL:

A primeira classificação eletrofisiológica detalhada dos neurônios piramidais de CA1 foi feita por Kandel e Spencer na década de 60 em hipocampo de gatos (Kandel & Spencer 1961). Os autores usaram a técnica de registro IC “*in vivo*” e comprovaram a existência de diferentes variantes eletrofisiológicas de neurônios do hipocampo conforme o quadro 3.

QUADRO 3 – Resumo das observações de Kandel e Spencer (Kandel e Spencer 1961)

-
- Os neurônios com disparos espontâneos foram classificados em :① neurônios que disparam um PA único e ② neurônios que disparam em forma de salva (“burst”) de PA com amplitude decrescente
 - Mesmo no grupo ② existiam diferenças qualitativas: os que disparavam espontaneamente de forma repetitiva (400/seg) com salva de PA de duração breve (10-20 ms, 2-4 espículas); outros com disparos de duração moderada (20-40, 5-8 espículas) e outros que disparavam uma salva de PA mais prolongada (mais de 100 , e um número maior de espículas).
 - Este último geralmente pode ser observado após potenciais inibitórios evocados.
-

No início dos anos 70 O’ Keefe and Dostrovski mostraram através de técnicas EC *in vivo* a existência de um padrão característico de descarga neuronal em forma de salva de PA no hipocampo (Keefe & Dostrovski 1971). Este fenômeno estava presente enquanto os animais, no caso ratos, realizavam um teste comportamental específico (Rank 1973). O

padrão de disparos era extremamente complexo, formado por diversos PA. Fox e Ranck denominaram estas células geradoras de descargas de células de espícula complexa, sendo abundantes em CA1 do hipocampo (Fox & Ranck 1981).

Alguns estudos demonstraram que algumas células piramidais de CA1 poderiam disparar em salva em resposta a injeção de corrente no soma (Schwartzkroin 1975). Posteriormente verificaram que esta resposta era mais frequente nos neurônios de CA3, os quais respondem em condições normais geralmente em forma de salva com 2-7 espículas. A diferença observada nos neurônios de ambas as áreas reside no fato de que em CA1 a DS endógena no soma era pouco frequente *in vivo* (Feder & Ranck 1973) e *in vitro* (Schwartzkroin 1978; Wong & Prince 1978). Os autores mostraram ainda que as células hipocâmpais de CA1 possuem um diferencial de disparo de PA a nível dendrítico. O soma, por sua vez, gerava quase absolutamente disparos repetitivos de PA, únicos e isolados. Ao ser estimulado diretamente, as terminações dendríticas apresentavam predisposição para originar DS, que poderiam ser registrados no soma

Jensen e colaboradores (1997) caracterizaram eletrofisiologicamente os neurônios de CA1 em condições normais e em condições onde foi induzida a atividade epileptiforme pelo aumento da concentração de potássio EC (Jensen & Yaari 1997). Assim, foi possível detectar experimentalmente uma acentuada predisposição para a origem da DS intrínseca somática e este fenômeno estava associado ao aparecimento e manutenção da atividade epileptiforme. Além disto foi demonstrada a existência de uma diversidade eletrofisiológica e pela primeira vez os neurônios de CA1 foram classificados detalhadamente.

A classificação dos neurônios piramidais de CA1 em neurônios com descarga em salva (CDS) e neurônios sem descarga em salva (CSDS) foi ampliada de acordo com as respostas eletrofisiológicas por Jensen e colaboradores. Assim, estes autores classificaram

de modo geral em 3 grupos (vide quadro abaixo) baseados na resposta eletrofisiológica dos pulsos de correntes despolarizantes aplicados na célula, especificamente no soma celular (.Jensen e colaboradores 1994)

Quadro 4 – classificação dos neurônios de acordo com Jensen e colaboradores 1994)

NEURONIOS							
Neurônios sem descarga em salva							
	Células que geram PA simples e independentes e que apresentam acomodação como resposta a todos os estímulos supralimiare.						
Neurônios com descarga em salva (CDS)	<ul style="list-style-type: none"> • De alto limiar: Apresentam DS com estímulos supralimiare de alta intensidade • Baixo limiar: apresentam DS a qualquer estímulo supralimiar 						
	<table border="1"> <tr> <td>✓ Grau I</td> <td>Células que disparam espículas simples a um pulso de corrente despolarizante de curta duração</td> </tr> <tr> <td>✓ Grau II</td> <td>Células que disparam uma salva de PA com um mesmo estímulo</td> </tr> <tr> <td>✓ Grau III</td> <td>Células que disparam uma salva de PA espontaneamente na ausência de qualquer estímulo exógeno.</td> </tr> </table>	✓ Grau I	Células que disparam espículas simples a um pulso de corrente despolarizante de curta duração	✓ Grau II	Células que disparam uma salva de PA com um mesmo estímulo	✓ Grau III	Células que disparam uma salva de PA espontaneamente na ausência de qualquer estímulo exógeno.
	✓ Grau I	Células que disparam espículas simples a um pulso de corrente despolarizante de curta duração					
	✓ Grau II	Células que disparam uma salva de PA com um mesmo estímulo					
✓ Grau III	Células que disparam uma salva de PA espontaneamente na ausência de qualquer estímulo exógeno.						

Na área CA1 existem pouco neurônios CDS em condições “normais” , porém se houver modificação do meio estes neurônios dito como CSDS começam a gerar salvas de PA.

4.2. AGREGADO NEURONAL:

4.2.1 HIPERFUNÇÃO DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS:

A hiperexcitabilidade na ELT foi atribuída, pelo menos em parte, à função aumentada de uma subpopulação de sinapses glutamatérgicas que utilizam receptores NMDA (Mody e Heinemann 1987; Martin e colaboradores 1992; Köhr & Mody 1994; Bernard 1997). A base pode estar relacionada a uma alteração na fosforilação do receptor, no caso do receptor NMDA (Köhr e Mody 1994), gerando mudanças na expressão de subunidades do receptor específico para glutamato, observada em pacientes com ELT (Babb e colaboradores 1996, Blüncke e colaboradores 1996, Mathern e colaboradores 1996c, 1997c) e em modelos experimentais de epilepsia (Mathern e colaboradores 1997b).

Essas mudanças na composição das subunidades de receptores glutamatérgicos poderiam ter conseqüências importantes nas propriedades cinéticas assim como na permeabilidade aos íons cálcio (Nakanishi 1992; Westbrook 1994). Recentemente foi demonstrado que na ELT uma alteração de receptores tipo AMPA, e participação de circuitos polisinápticos na gênese da atividade epileptiforme (Köhling e colaboradores 1998).

4.2.2.1 ALTERAÇÕES FUNCIONAIS:

As alterações poderiam ser geradas por aberrações funcionais, modificando a composição estrutural dos receptores glutamatérgicos (Jensen e colaboradores 1997), mudanças nas propriedades biofísicas dos receptores NMDA e AMPA (aumento de

sensibilidade; alterações no fluxo iônico, aumento exagerado na permeabilidade ao Ca^{2+} ou Na^+) (Isokawa & Levesque 1991; Kohr e colaboradores 1993; Urban e colaboradores 1990), aumento da sensibilidade de neurônios à aplicação de NMDA (Martin e colaboradores 1992) e alterações plásticas nos receptores NMDA e AMPA têm sido propostas no curso da ELT experimental (Bernard & Wheal 1995).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram potenciais sinápticos anormais em tecido epiléptico crônico, bem como o aumento da frequência dos mesmos, de modo que aparentemente existem anormalidades variadas nos receptores glutamatérgicos que podem explicar a hiperexcitabilidade do tecido epiléptico crônico (Hwa & Avoli 1992; Louvel e colaboradores 1996 Louvel e colaboradores 1987; Avoli & Olivier 1987; Isokawa & Levesque 1991; Kohr e colaboradores 1993; Kraus e colaboradores 1994).

4.2.2. DEFEITO DOS MECANISMOS INIBITÓRIOS MEDIADOS PELO GABA:

Há muito tempo sugere-se a existência de uma hipofunção dos sistemas inibitórios nas epilepsias, fundamentalmente nos sistemas de neurotransmissão mediados pelo GABA. A facilidade em localizar neurônios inibitórios Gabaérgicos por detecção da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) levou muitos autores a pesquisar se as epilepsias são acompanhadas pela perda de neurônios GAD-positivos (Ribak e colaboradores 1979).

Estudos imuno-histoquímicos para GAD demonstraram uma diminuição significativa de terminais GAD-positivos no foco epiléptico induzido experimentalmente em macacos por aplicação cortical de gel de AlCl_3 (Ribak e colaboradores 1979). Esses estudos levaram a hipótese de que exista uma redução do controle sináptico inibitório de neurônios piramidais proporcionando uma hipersensibilidade dos mesmos ao influxo

excitatório normal. Provavelmente, este é o elemento fundamental da teoria do GABA na epilepsia (Avanzini e colaboradores 1985; Lloyd e colaboradores 1986; Loscher 1993).

Além disso podem ocorrer alterações das propriedades intrínsecas de afinidade dos receptores GABA_A, que resultaria em falha na sua atuação inibitória (Brooks-Kayal 1998). Outra característica observada foi um decréscimo na proporção relativa de terminais gabaérgicos. Esta propriedade foi observada em córtex de macacos epilépticos com creme de alumínio.

4.2.2.1 HIPÓTESE DAS CÉLULAS DORMENTES (FIG. 6A):

Baseia-se no fato de que muitos neurônios excitatórios tem a potencialidade de determinar a morte de neurônios com os quais normalmente se “comunicam” (células alvo) (Sloviter 1999, 1991). Este princípio básico e primordial da excitotoxicidade foi usado pelo autor para elaborar a sua hipótese. De fato, a hiperatividade subsequente a um episódio de SE pode levar à morte um grande grupo de neurônios nas estruturas envolvidas (Olney e colaboradores 1986).

As observações que levaram à hipótese das células em cesto “dormentes” foram desenvolvidas originalmente no Giro Denteado usando o modelo de epilepsia induzido por estimulação da via perforante (Sloviter 1991). O autor sugeriu que descargas repetitivas das células granulares durante atividade epileptiforme lesava as células que deveriam, em condições normais, excitar interneurônios inibitórios (Ribak 1992; Sloviter 1999).

A análise imunocitoquímica no hipocampo revelou que algumas células imunorreativas para o GABA eram relativamente resistentes às crises epilépticas. Um

outro grupo de células GABA-positivas, incluindo as células musgosas no hilo do GD e interneurônios somatostatina-positivos na mesma região, foram irreversivelmente lesados (Sloviter 1999). Entretanto, a preservação de certos interneurônios indica que eles seriam hipofuncionantes por não serem devidamente ativados. O autor, tomando como referência os dados fisiológicos disponíveis da circuitaria do GD, sugeriram uma diminuição da inibição, mas o aumento da atividade epileptiforme nessa área poderia ser o resultado do dano de células que normalmente excitam neurônios inibitórios (Sloviter 1999). Sendo assim, os neurônios GABAérgicos, embora não fossem lesados, eram “hipofuncionantes”, por terem perdido uma aferência excitatória crítica (Sloviter 1999).

Essa hipótese foi formulada inicialmente para a circuitaria do GD, mas estudos posteriores demonstraram que este fenômeno também estaria também presente na área CA1 (Sloviter 1999). Sendo que, a perda do controle inibitório das células piramidais de CA1, dependia de uma diminuição da ativação direta das células em “cesto” da área CA1, devido a um dano irreversível de células piramidais de CA3, as quais inervavam neurônios inibitórios de CA1. A hipótese de Sloviter foi de certa forma sustentada por um trabalho de eletrofisiologia “*in vitro*” que indicou a existência de uma fraca conexão entre células piramidais e interneurônios (“desacoplamento”) no modelo do ácido cáinico, o que poderia explicar a perda de inibição previamente descrita nesse modelo (Nakajima e colaboradores 1991).

Na análise da conectividade sináptica entre pares de células piramidais não foram observadas interações excitatórias ou inibitórias em fatias obtidas de animais tratados com ácido cáinico. Estes dados foram posteriormente refutados por diversos trabalhos experimentais que demonstraram a conservação de interações neuronais entre neurônios excitatórios e interneurônios no tecido epiléptico crônico no modelo de ácido cáinico (Williams e colaboradores 1993), assim como no modelo crônico *pós-Status epilepticus*

(PSE) induzido por estimulação de via perforante (Mangan e colaboradores 1995; Lothman e colaboradores 1996). Além disso, estudos fisiológicos em fatias hipocâmpais (Rempe, e colaboradores 1997) demonstraram que, contrariamente à teoria das células “dormentes”, os interneurônios da área CA1 de animais epilépticos crônicos permanecem funcionalmente interconectados vias excitatórias na rede neuronal local.

Demonstrou-se a chegada de potenciais pós sinápticos excitatórios (PPSE) espontâneos em interneurônios do *stratum oriens* no hipocampo epiléptico, sendo este fenômeno, atenuado por antagonistas glutamatérgicos. Adicionalmente, estas células foram também hiper-responsivas à estimulação aferente, disparando em muitos casos salvas de Potenciais de Ação (PA) em forma de salva, o que indicava uma hiperatividade dos neurônios GABAérgicos.

Embora a inibição esteja defeituosa quando estudada por protocolos de pulsos pareados, existe uma preservação da funcionalidade dos interneurônios da área CA1 hipocâmpal nos modelos de epilepsia crônica induzida por ácido cáinico e por pilocarpina (Esclapez e colaboradores 1997). Nesse trabalho os autores registraram pares de neurônios piramidais e interneurônios (inclusive células musgosas) em condições normais e durante atividade interictal. Os interneurônios no tecido epiléptico crônico responderam aos estímulos excitatórios de outros neurônios da rede neuronal. A estimulação direta dos interneurônios pôde inclusive hiperpolarizar a membrana e bloquear, em muitos casos, a gênese de PAs nas células piramidais. O destaque principal desses experimentos foi que, durante os fenômenos epileptogênicos, os interneurônios ficavam ativos, disparando de forma sincrônica durante a descarga paroxística da rede neuronal, de forma que enormes Potenciais pós sinápticos inibitórios (PIPS) puderam ser detectados nas células piramidais. A aplicação de um antagonista de receptores GABA_A, a bicuculina, prolongou ainda mais a duração dos eventos epileptiformes, demonstrando a parcial eficácia e funcionalidade dos

PIPSs. Para reconciliar o fato de existir inibição defeituosa e atividade epileptiforme espontânea, apesar do sistema GABAérgico se manter aparentemente funcional, os autores propuseram que o brotamento local de fibras axonais e a formação de novas sinapses glutamatérgicas na área (que podem escapar do efeito inibitório dos PIPS) podem levar a um aumento de influxos excitatórios nos neurônios e conseqüentemente propiciar a gênese dessa hiperexcitabilidade.

Outra possibilidade é que os PIPSs sejam “mascarados” por um excesso de estimulação excitatória nas células piramidais (Rempe e colaboradores 1997). Assim, foi verificado em fatias hipocâmpais que esse efeito de desconexão não existe, já que, quando eram realizados registros pareados de neurônios piramidais e interneurônios, a injeção de corrente e a estimulação da célula piramidal produzia invariavelmente vários PEPS no interneurônio (Esclapez e colaboradores 1997). Além disso, podem ser registrados potenciais inibitórios espontâneos sensíveis a bicuculina (10 mM) e de freqüência dentro de faixas normais nos neurônios piramidais de CA1 em animais epiléticos crônicos.

Da mesma forma, os neurônios piramidais seriam responsivos à aplicação exógena de GABA (Franck e colaboradores 1988). Estes achados sugerem que o fenômeno de desinibição não pode ser explicado completamente por uma simples alteração da conectividade neuronal (diminuição da ativação direta de células em cesto da área CA1). Outros mecanismos propostos foram: a diminuição da liberação de GABA pelas terminações pré-sinápticas e um mecanismo pós-sináptico, como por exemplo a modificação da eficácia do receptor pelo zinco, como foi referido em trabalho anterior, (Buhl e colaboradores 1996) ou Ca^{2+} (Mozrzymas & Cherubini 1998), ou ainda diminuição da densidade de receptores $GABA_A$.

Trabalhos experimentais em fatias hipocâmpais de animais com ELT induzida pelo modelo de SE límbico provocado por estimulação da via perforante (Stringer 1989;

Lothman 1990) comprovaram que no tecido epiléptico podem-se detectar PIPS dependentes da ativação de receptores GABA_A (Mangan e colaboradores 1995). Um achado importante foi o da existência de uma redução em 50% na duração do potencial sináptico inibitório dependente de ativação de receptores GABA_A na área CA1 nesse modelo de ELT (Mangan & Bertram 1997).

A magnitude da diminuição estaria diretamente relacionada ao grau de hiperexcitabilidade dos neurônios piramidais após a estimulação aferente dessa área hipocampal. A aplicação de um agonista dos receptores benzodiazepínicos tipo I (Zolpidem) apenas diminuiu a hiperexcitabilidade. Baseados nesses resultados, os autores propuseram diferentes mecanismos para explicar essa disfunção crônica dos potenciais inibitórios na ELT: (i) morte de interneurônios (Matsuda e colaboradores 1994), diminuição no número de sinapses GABAérgicas na proximidade distal do soma de células piramidais, (iii) desconexão de interneurônios (“dormentes”) do influxo excitatório, (iv) alterações induzidas por fosforilação do canal iônico do receptor GABA_A (ex: modificações das propriedade cinéticas).

Alguns desses itens podem favorecer a hipótese das células inibitórias “dormentes”(Sloviter 1999), mas o trabalho por si só a contradiz, uma vez que foram detectados PIPSS em neurônios piramidais. A hipótese mais adequada para a explicação desse paradoxo é a de alterações estruturais levando a mudanças nas propriedades do receptor GABA_A, reforçada pelo fato de haver uma sensibilidade alterada ao zolpidem. A sensibilidade alterada ao zolpidem depende de sua ligação à subunidade α1 do receptor (McKernan & Whiting 1996). Uma disfunção do receptor GABA_A também foi sugerida para explicar o fato paradoxal de que embora estejam presentes os potenciais inibitórios nas células piramidais, eles não possam efetivamente sobrepujar a hiperexcitabilidade e a atividade epileptiforme gerada.

Notoriamente, alterações na síntese de subunidades de receptores GABA_A têm sido descritas em animais epilépticos segundo o método de abrasamento (Kokaia e colaboradores 1994). Mais uma vez, estamos diante de evidências que apontam para a teoria do “canal iônico epiléptico” (Mody 1998).

Alterações na sensibilidade dos receptores GABAérgicos foram demonstradas recentemente em neurônios corticais do lobo temporal de pacientes com ELT (Gibbs e colaboradores 1996) assim como no modelo da pilocarpina (Gibbs e colaboradores 1997) e em modelo crônico em cultura de células (Gibbs e colaboradores 1997). E pela primeira vez foi evidenciado pela primeira vez defeito funcional do receptores GABA_A, além de que essas alterações eram área-dependentes, sendo diferentes em CA1 e no GD (Gibbs e colaboradores 1997).

Na área CA3 existem, em condições normais, circuitos recorrentes ou reverberativos (polissinápticos) locais (MacVicar & Dudek 1980). Esses circuitos parecem não existir na área CA1 (Schwartzkroin 1975; Knowles & Schwartzkroin 1981). Os circuitos de reentrada excitatória local ou polissinápticos em CA3 e a presença de neurônios que disparam em salva em condições normais nessa mesma área tem levado muitos pesquisadores a considerar a área de CA3 como uma região crítica na gênese da atividade epileptiforme hipocampal. Ela é considerada como área “marca passo” (“pacemaker”) ou geradora da atividade epileptiforme que atingiria, por propagação, outras áreas como por exemplo CA1, que é considerada como área seguidora (“follower”) da atividade epileptiforme hipocampal (MacVicar & Dudek 1979; Traub 1982; Wong & Traub 1983). Porém, a epilepsia crônica parece induzir alterações difusas na circuitaria local, atingindo outras áreas além de CA3. A circuitaria local apresenta diferentes anormalidades no tecido epiléptico crônico, especificamente na esclerose mesial hipocampal.

Acompanhando o severo dano neuronal, gliose e atrofia, existem sinais de reorganização de circuitos axonais excitatórios e inibitórios (Babb 1997). Muitas alterações têm sido escritas na ELT. O fato principal e mais polêmico é a existência de uma reorganização sináptica ou neo-sinaptogênese. Esse fenômeno foi muito bem descrito no GD, onde as fibras musgosas parecem reinervar a área dendrítica da camada supragranular (Babb 1997).

A existência de reorganização sináptica em modelos experimentais de ELT também tem sido sugerida ou demonstrada em outras áreas hipocâmpais como CA3 (Represa & Ben Ari 1992) e CA1 (Nadler e colaboradores 1980; Perez e colaboradores_1996). Mas ainda se discute a relevância desse fenômeno na fisiopatologia da ELT. Alguns autores propõem que essa reorganização é de pouca importância na epileptogênese crônica já que o bloqueio da mesma (ex. usando bloqueadores da síntese proteica) não altera o número de crises espontâneas nos animais (Long & Mello 1997).

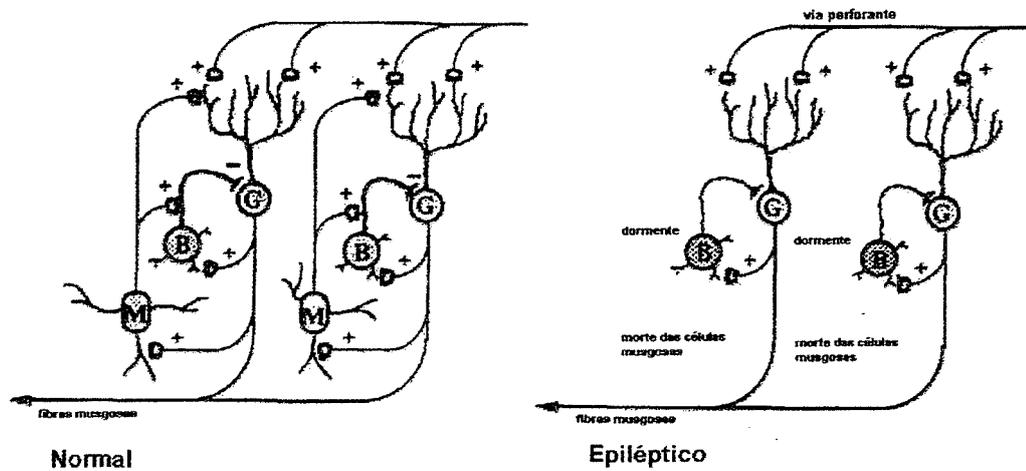
Entretanto, estudos recentes mostram evidências eletrofisiológicas e morfológicas indicando que essa reorganização é potencialmente funcional e pode desempenhar um papel importante na gênese de atividade epileptiforme (Buckmaster & Dudek 1997; Patrylo & Dudek 1998). O fato é que a reorganização sináptica “existe” e que a circuitaria hipocâmpal é estrutural e funcionalmente diferente (“anormal”) no tecido epilético crônico. Talvez esta reorganização sináptica caracterizada pela proliferação excessiva dos terminais sinápticos (brotamento do inglês “sprouting”) seja responsável pela manutenção da hiperexcitabilidade local com a formação de circuitos recorrentes.

4.2.2.2 CIRCUITOS RECORRENTES: BROTAMENTO (“SPROUTING”).

Essa hipótese defende a idéia de que a hiperexcitabilidade das células granulares seria uma consequência de um rearranjo patológico de uma circuitaria neuronal, na qual as células granulares emitiriam colaterais axônicas para o seu próprio campo dendrítico, resultando num circuito excitatório recorrente (Fig.6.B) (Tauck & Nadler 1985; Okazaki e colaboradores 1995). Esse rearranjo é resultante da eliminação sináptica em decorrência da morte de neurônios (células musgosas) que, normalmente, projetam axônios para o terço proximal da camada molecular do giro denteado (McNamara 1994). As sinapses eliminadas são então substituídas pelos axônios das células granulares, as fibras musgosas. Os axônios das fibras musgosas contêm altas concentrações de zinco e podem ser facilmente identificados pelo método de Timm.

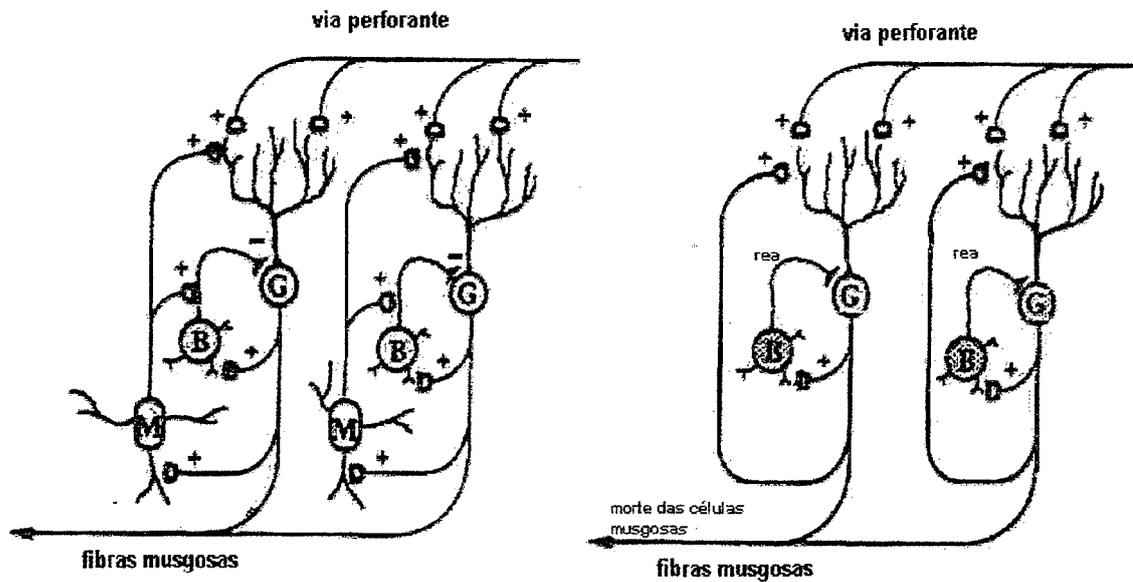
Uma marcação anormal de terminais Timm positivos na camada molecular interna tem sido observada em hipocampos de pacientes com esclerose hipocampal (Babb e colaboradores 1991) e modelos animais de epilepsia temporal (Fig. 6B). Acredita-se que, para ocorrer esse processo plástico, haveria a necessidade de síntese de fatores tróficos que seriam responsáveis pelo brotamento e manutenção desses novos circuitos (Gall e Isackson 1989).

Hipótese das Células Dormentes



A

Hipótese dos circuitos Recorrentes



B

Fig. 6 Representação de 2 Hipóteses que tentam explicar a excitabilidade das células granulares nos modelos de epilepsia: A) Hipótese das células dormentes e B) Hipótese do Rearranjo Sináptico. Em animais normais e epilépticos. M- células musgosas; B- células em cesto (do inglês “basket cells”), G- células granulares, REA rearranjo (adaptação de McNamara 1994)

4.2.4 HIPÓTESE DA SENSIBILIDADE DOS RECEPTORES GABA AO ZINCO ASSOCIADO AO BROTAMENTO (“SPROUTING”) DAS FIBRAS MUSGOSAS (Fig.7)

Coulter (1999) propôs uma nova hipótese para explicar a geração das crises, ele associou duas hipóteses a da modificação da sensibilidade dos receptores GABA associada ao brotamento (“sprouting”) das Fibras Musgosas. A sensibilidade ao Zn^{2+} parece ser importante no desenvolvimento da atividade patológica (Buhl e colaboradores 1996). O Zn^{2+} localiza-se junto as vesículas de glutamato , nos terminais das fibras musgosas e podem ser liberados em altas concentrações pela estimulação ($>100-300 \mu M$) (Assaf & Chung 1984; Howel e colaboradores 1984).

Normalmente as fibras musgosas não inervam as células do GD, após o SE, o brotamento (“sprouting”) das fibras e a densa inervação dentro da camada molecular do GD (Mello e colaboradores 1993; Tauck & Nadler 1985; Okazaki e colaboradores 1995). Como consequência permanente do episódio agudo , existe além do aumento da sensibilidade ao Zn pelos $GABA_{A}R$ nos arredores do “brotamento” das fibras musgosas a liberação do mesmo no interior da camada molecular, fenômeno que normalmente não ocorre (Fig.7).

A hipótese seria de que estes eventos causara uma catastrófica falha da inibição no GD (Buhl e colaboradores 1996; Heinemann e colaboradores 1992). Em condições normais as CGD funcionam como um filtro de entrada dos impulsos que chegam através da combinação das propriedades intrínsecas do GD e o forte mecanismo de inibição por “feedforward” e “feedback” (Heinemann e colaboradores 1992).

A ativação repetitiva do GD, que pode ocorrer no início da crise, mobiliza e libera o Zn^{2+} dos terminais das fibras musgosas (Assaf & Chung 1984; Howel e colaboradores 1984). Este é liberado em grandes quantidades na fenda sináptica excitatória no interior da camada molecular do GD. Foi hipotetizado ainda que o Zn^{2+} ao difundir-se bloquearia os receptores inibitórios das CDG (Soltesz e colaboradores 1995). O decréscimo da atividade inibitória durante a ativação repetitiva predispõe que as o GD pós SE perderiam sua função. Em estudos de fatias de tecido epiléptico humano (Franck e colaboradores 1995) e fatias de hipocampo de animais com ELT (Cronin e colaboradores 1992; Wuarin & Dudek 1996) essas patologias não parecem aumentar significativamente na ativação aferentes do GD, existindo um moderado grau de desinibição até que a atividade aberrante torna-se visível. Experimentos *In Vitro* a desinibição epileptogênica foi induzida pela perfusão de bicuculina em baixas concentrações ao passo que *In vivo* a liberação do Zn^{2+} provém a desinibição patológica iniciando a crise.

A hipótese da alteração dos receptores GABA_AR associada ao “brotamento” satisfaz 5 critérios para os mecanismos epileptogênicos:

1. O SE associado a alterações dos GABA_AR coincide com o desenvolvimento das CER, i.e. satisfaz o requerimento temporal para o mecanismo epileptogênico.
2. Envolvimento do “brotamento” das fibras musgosas para excitabilidade considerando o período latente evidente tanto em humanos quanto em modelos experimentais de ELT.
3. Alteração das propriedades funcionais das CGD consistentes com a recorrência, intermitente com o aumento da excitabilidade no sistema epiléptico límbico contra o “background” da função relativamente normal.
4. Diversas propriedades funcionais críticas da hipótese são evidentes no tecido humano cirurgicamente removido

5. A associação da sensibilidade ao zinco associado com o aparecimento do “sprouting” das fibras musgosas parecem ser evidentes em múltiplos modelos de ELT independentes.

Entretanto esta hipótese ainda é preliminar necessitando de experimentos no futuro para que reforcem a sua veracidade. Alguns pontos ainda não estão elucidados, por exemplo não está claro se a liberação do zinco no terminal excitatório das fibras musgosas se difunde suficientemente para interagir com os GABA_AR vizinhos. E também não foi demonstrada que o controle transcripcional da produção dos RNAm das subunidades de GABA_AR está alterada no GD do hipocampo epiléptico, embora existam evidências que corroboram estes dados.

Sabe-se que existem outros fatores atuantes nas diferentes áreas do hipocampo, além da existência de idéias conflitantes para examinar estas alterações e com isto explicar a epileptogênese.

HIPÓTESE DA SENSIBILIDADE DOS RECEPTORES GABA_A AO Zn²⁺ ASSOCIADO AO REARRANJO SINÁPTICO

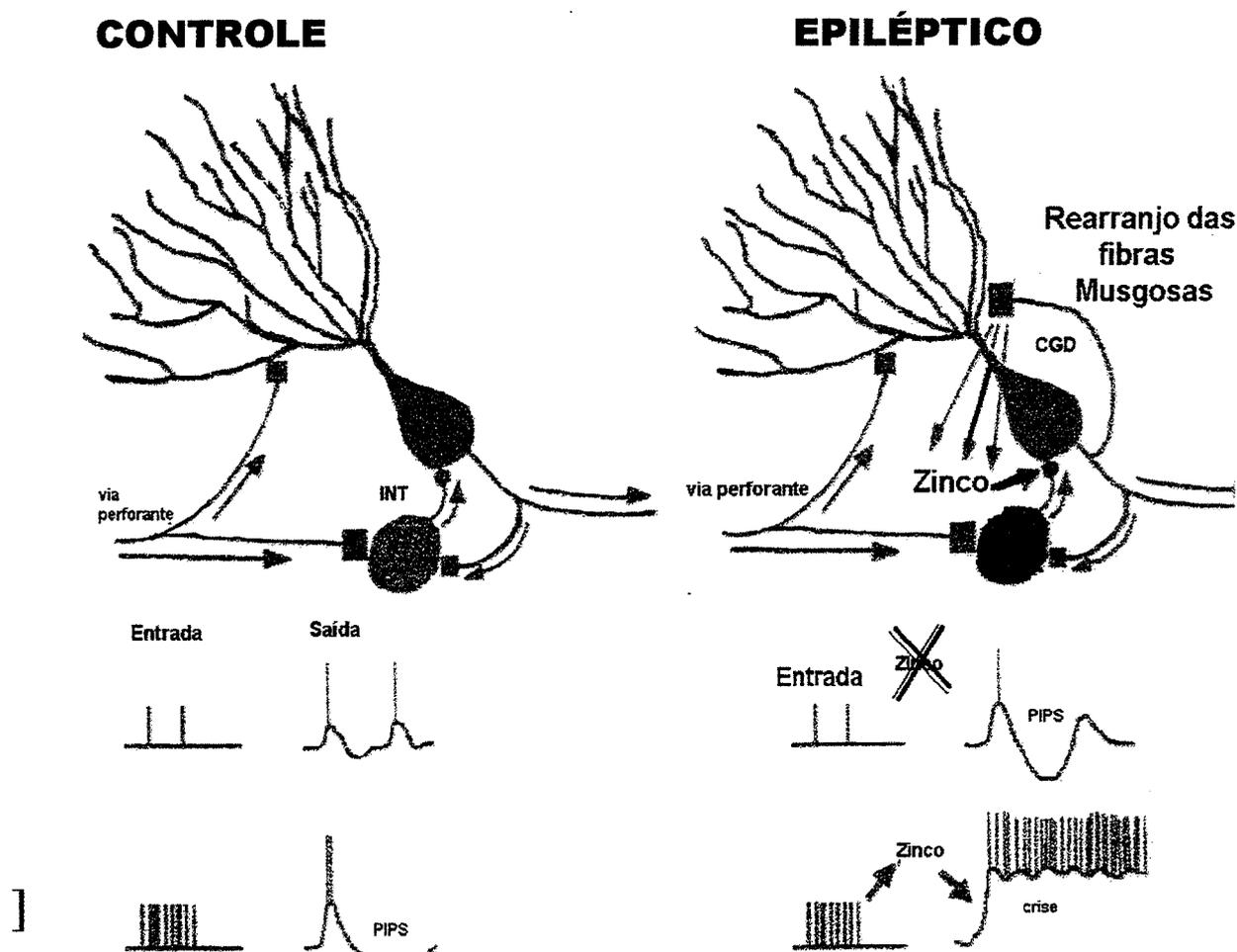


Fig.7 O diagrama mostra em detalhes a hipótese que concerne a possibilidade do impacto do aumento da sensibilidade ao Zn²⁺ nos GABA_AR das células granulares do giro denteado (CGD) associado com a recorrência das fibras musgosas do GD dos animais epilépticos. No animal **CONTROLE** sinais sinápticos de saída das CGD são controladas pelos interneurônios inibitórios. Tanto os sinais de alta frequência quanto baixa que chegam , pela via perforante, são filtrados antes de saírem e com isso o hipocampo é protegido. No animal **EPILÉPTICO** o giro denteado apresenta circuitos recorrentes e as fibras musgosas são ricas em Zn²⁺ , que pode ser liberado através de estímulos repetitivos de alta frequência. A liberação deste acarreta no bloqueio dos GABA_AR que predispõe o sistema a iniciar a crise e a propagação por todo o hipocampo. (extraído de Coulter 1999)

4.2.4 HIPÓTESE DA INTERAÇÃO DOS MECANISMOS SINÁPTICOS E NÃO SINÁPTICOS (FIG. 8):

Trainelis & Dingledine(1988), propuseram que ocorre a interação de fatores sinápticos e não-sinápticos em uma alça de “feedback” que precipita a crise (Fig. 8). Essa hipótese é uma extensão das idéias de Green (1964), Dichter (1972) e Yaari (1986) e para formula-la, os autores utilizaram o modelo de alta concentração de potássio para a indução da atividade epileptiforme. A idéia fundamental que a elevação da concentração do potássio imposta artificialmente geram conseqüências múltiplas que se interrelacionam para aumentar o número e/ou resposta sincrônica dos disparos dos neurônios piramidais de CA1 ocasionadas pelas descargas em salva interictal das células de CA3 (Fig.2).

O ciclo do aumentos dos disparos de CA1 em conseqüência da elevação extracelular do K torna-se regenerativo até que o limiar da crise (denotada na seta pontilhada-Fig.8) é excedido. As conseqüências múltiplas de se atingir a linha de bases são mostrados nos 5 quadros recebendo as setas do lado esquerdo (Fig.8 e estão em **negrito e itálico** no texto que segue) A elevação do K^+ produz uma mudança positiva no potencial reverso do K, *despolarização parcial da membrana* (Alger 1983), esta mudança está *estritamente relacionado ao limiar do PA*. Essa mudança positiva no potencial reverso do K diminui o efluxo até o PM, que colide c/ as diversas condutâncias que regulam a excitabilidade das células piramidais de CA1. Potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS) mediados pelo GABA são disparados pelo mecanismo de feedback inibitório das células em cesto para CA1 e consiste numa resposta bifásica , a primeira de curta latência de receptores $GABA_A$ ($GABA_{AR}$) envolvendo o íon cloro (Dingledine & Gjerstad, 1980) e a outra de longa latência mediado pelos receptores $GABA_B$ ($GABA_{BR}$) e envolvendo o íon potássio (Dutar & Nicoll 1988; Solis & Nicoll 1992). A elevação do K^+ extracelular

deveria reduzir a curta latência do componente GABA_A do PIPS, provavelmente pela modificação do potencial reverso do cloreto (Chamberlin & Dingledine 1988). Depois das prolongadas DS os neurônios exibem uma longa hiperpolarização tardia (AHP) que limita o disparo repetitivo; acredita-se que o AHP é gerado pela condutância de potássio cálcio-dependente (Alger & Nicoll 1980). O efluxo diminuído de K reduziria a amplitude do AHP limitando a sua efetividade. Finalmente no aumento de K⁺ os *neurônios podem* “*aumentar de volume*” através do efluxo do mesmo íon (Dietzel e colaboradores 1980) e “*aumento de volume da glia*” pela captura dos íons e água (Kimmelberg & Frangakis 1985). Com o *aumento de volume dos neurônios e glia* espera-se uma diminuição do espaço extracelular (Nicholson 1983; Lux e colaboradores 1986; Hablitz & Heinemann 1989) e o aumento transitório de K⁺ e outros íons pela redução do espaço (trajeto) dos mesmos até o interior da célula. A redução do espaço extracelular deve ocasionar um aumento dos potenciais efáticos pela aproximação do soma dos neurônios piramidais com os neurônios vizinhos; esse efeito de campo (efático) poderia ser suficiente para despolarizar os neurônios vizinhos até o limiar do PA (“spike”) e contribuir para a sincronia da população das células piramidais de CA1 com DS mesmo na ausência de atividade sináptica (Jefferis 1981; Jefferis & Haas 1982; Taylor & Dudeck 1984). Estes últimos fatores podem estar combinados e determinam o estímulo limiar que chega das células de CA3 e disparam intensa despolarização tônica da população das células piramidais de CA1, iniciando a crise.

Cada uma das várias conseqüências listadas nos parágrafos anteriores podem diretamente ou indiretamente aumentar o número e/ou a sincronia dos disparos de CA1 em resposta de um “input sináptico originados das DS interictais produzidos em CA3.

Os receptores NMDA (NMDAR) apresentam um bloqueio de Mg²⁺, que é voltagem dependente (Mayer 1984; Nowack 1984), e poderiam mediar alguns dos efeitos indiretos

aludidos acima. A *despolarização* juntamente com a atenuação do *PIPS* e *AHP* poderiam promover a ativação dos NMDAR através da liberação do bloqueio do Mg^{2+} , resultando numa ampla despolarização (Dingledine e colaboradores 1990) e aumentando a resposta dos neurônios piramidais de CA1 à estímulos excitatórios (“input” sináptico excitatório).

INTERAÇÃO DOS MECANISMOS SINÁPTICOS E NÃO SINÁPTICOS

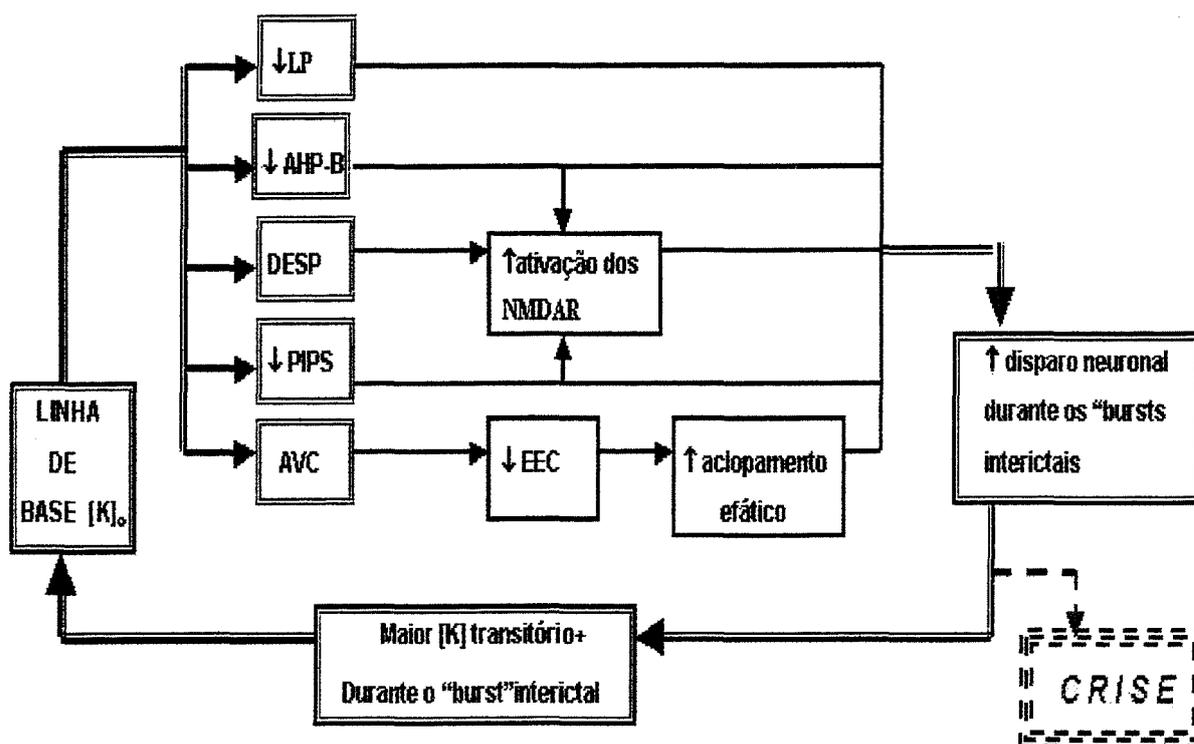


Fig.8. Esquema da hipótese de interação dos mecanismos sinápticos e não sinápticos com o modelo do aumento de potássio externo, na geração das crises evocados nas células piramidais de CA1 – ver explicação no texto. Limiar das “spikes” (LP); hiperpolarização tardia dos burst (AHP-B); despolarização (DESP), Potencial inibitório pós-sináptico (PIPS), aumento de volume celular (AVC), receptores NMDA (NMDAR), espaço extracelular (EEC), concentração de potássio externo, $[K]_o$; concentração de potássio externo, $[K]$; diminuição (\downarrow), aumento (\uparrow)- (baseado em Traynelis e Dingledine 1988).

5. MODELOS DE EPILEPSIA EM ANIMAIS :

Grande parte do conhecimento dos mecanismos básicos das epilepsias provêm dos estudos em modelos de animais. Com isto, existe a necessidade do entendimento entre estes modelos e a situação crítica real. Devido a complexidade da epilepsia humana não existe um modelo que explique a totalidade de suas manifestações clínicas

Os modelos experimentais de epilepsia podem ser classificados didaticamente em: modelos de epilepsia focal e generalizada, sendo que cada um destes grupos é dividido em modelos com patogenia genética (idiopáticos) ou com patogenia de origem ambiental (sintomáticos) (Moraes 1995). Além disso os modelos de epilepsia focal são subdivididos em categorias com crises parciais simples ou complexas , enquanto os modelos de epilepsia generalizadas tônico-clônicas ou crises de ausência. Um terceiro grupo é o dedicado aos modelos de estado de mal-epiléptico.

Nos deteremos especificamente na classificação envolvendo: Modelo Experimental de epilepsia focal e Modelos de estado de mal epiléptico (SE), conforme quadro abaixo:

❖ **MODELOS EXPERIMENTAIS DE CRISES OU DE EPILEPSIA FOCAL**

A .COM CRISES PARCIAIS SIMPLES:

1. Modelos com crises parciais simples de patogenia genética (idiopática)

- Fotoepilepsia do Babuíno Papio-papio Sendo um modelo também para epilepsia generalizada.

2. Modelos com crises parciais simples de Patogenia Ambiental

- Modelos Agudos:

1. Neurotoxinas:

- Penicilina focal

- Bicuculina ; picrotoxina , estriçnina tópicas
 - Colinérgicos tópicos
 - Anticolinérgicos
2. Estimulação Elétrica
 3. Retirada do GABA
 4. Fatias isoladas Cerebrais
- **Modelos subagudos:** Apresentam crises epilépticas que se repetem por um período limitado:
 1. Modelos por aplicação tópicã de metais :
 - Cobalto
 - Ácido tungstico
 - Sais de ferro
 2. Modelo por Congelamento :
 3. Modelos por aplicação de Neurotoxinas:
 - Ácido ibotênico
 - Bicuculina + Irradiação
 4. Anticorpos anti-gangliosídeos cerebrais
 - **Modelos Crônicos:**
 1. Modelo por aplicação tópicã de metais
 - Creme de alumínio

B COM CRISES PARCIAIS COMPLEXAS:

1. Modelos Com Crises Parciais Complexas de Patogenia Ambiental (sintomáticas)

- Modelos agudos e Subagudos por aplicação de Neurotoxinas:
 - Toxina Tetânica
 - Injeções na “área tempesta”
- Modelos Crônicos:

-
1. Abrasamento (Kindling) (Goddard 1967)
 2. Fatias ("Slices") de Cérebro:
 - Fatias ("Slices") de hipocampo
 - Estudo em tecido neurocirúrgico humano .
 3. Injeção de Neurotoxinas:
 - Pilocarpina
 - Ácido cainico ,
-

❖ **MODELOS DE ESTADO DE MAL EPILEPTICO (SE)**

- Pilocarpina
 - Ácido cainico
 - Lítio-Pilocarpina
 - Homocisteína sistêmica + cobalto
 - Paradigmas elétricas : estímulo do hipocampo; estímulo do hipocampo com abrasamento prévio
-

Baseado na revisão feita por Moraes, 1995.

Em certos modelos a atividade epileptiforme pode ser gerada em determinadas estruturas como por exemplo naquelas que reproduzem a ELT humana. A maioria dos modelos com ELT tem como denominador comum a indução de uma condição inicial de *status epilepticus* (SE). Uma série de fatores, ainda desconhecidos , parece ser responsável pelas mudanças que ocorrem a longo prazo após o SE. O insulto excitotóxico secundário a hiperatividade neuronal induzida por um tempo prolongado , além da morte neuronal em áreas susceptíveis, induz uma cascata de eventos que levam a modificações nas propriedades intrínsecas neuronais, bem como das redes neuronais, tornando-as epileptogênicas.

Nesses modelos, o tempo de latência até a aparição das primeiras crises epiléticas espontâneas é denominado de período silencioso (Sanabria e Cavalheiro 2000). Dentre os

modelos induzidos farmacologicamente o modelo da pilocarpina é um dos que melhor cumpre essas condições no momento (Mello e colaboradores 1991, 1993, 1996; Sanabria & Cavalheiro 2000).

5.1 MODELO DE EPILEPSIA CRÔNICA INDUZIDA PELA PILOCARPINA:

A pilocarpina é uma droga extraída de uma planta brasileira *Pilocarpus Jaborandi* que atua nos receptores colinérgicos muscarínicos. Ao receber pilocarpina, os ratos apresentam uma série de alterações comportamentais, tais como acinesia, tremor automatismo bucofaciais, movimentos das orelhas e de extremidades. Após um período latente de 2 a 3 semanas, surgem as manifestações de crises espontâneas recorrentes (CER). Uma série de fatores, ainda desconhecidos, parece ser responsável pelas mudanças que ocorrem a longo prazo após o SE. O insulto excitotóxico secundário a hiperatividade neuronal induzida por um tempo prolongado, além da morte neuronal em áreas susceptíveis, induz uma cascata de eventos que levam a modificações nas propriedades intrínsecas neuronais, bem como das redes neuronais, tornando epileptogênicas. Nesses modelos, o tempo de latência até a aparição das primeiras crises epiléticas espontânea é denominada de período silencioso (Sanabria e Cavalheiro 2000). A análise histológica do complexo hipocampal evidencia alterações anatômicas semelhantes àquelas de outros modelos de epilepsia experimental e àquelas de pacientes com epilepsia do lobo temporal.

Estudos anteriores utilizando-se deste modelo mostraram que embora as crises espontâneas e recorrentes sejam bem controladas com algumas drogas antiepiléticas (ex. carbamazepina, fenobarbital, etc.), uma certa percentagem de animais não apresenta remissão completa das crises parciais simples e/ou complexas (Leite & Cavalheiro 1995),

Esta característica também é uma vantagem do modelo para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da ELT.

6. CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA DESTE TRABALHO:

No presente estudo, esperamos fazer uma contribuição significativa para o entendimento dos mecanismos celulares das epilepsias, especificamente da ELT. Para isto serão apresentados os resultados dos estudos realizados com ratos com epilepsia crônica no modelo da pilocarpina e de células de tecido hipocampal humano oriundos de pacientes que se submetam a cirurgia no tratamento de epilepsias refratárias.

Uma abordagem comparativa do estudo eletrofisiológico entre o modelo de epilepsia crônica pela pilocarpina e tecido humano epilético “in vitro”, poderá permitir a elucidação de muitas dúvidas que envolvem os mecanismos celulares da epilepsia refratária do lobo temporal mesial.

2. OBJETIVOS:

I. GERAL: Estudo eletrofisiológico da atividade epileptiforme espontânea e/ou induzida nas fatias de hipocampo de ratos com epilepsia crônica induzida pela pilocarpina e hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal refratária ao tratamento clínico no modelo do zero-magnésio. A utilização deste modelo de indução da atividade epileptiforme *in vitro* permite avaliar as respostas das propriedades neuronais sob efeito do zero-magnésio

II. ESPECÍFICOS:

1. Caracterização e quantificação das variáveis eletrofisiológicas (propriedades ativas e passivas) dos neurônios de CA1 do hipocampo de rato e tecido hipocampal humano antes, durante e depois a perfusão com o zero magnésio..
2. Comparar os achados eletrofisiológicos (propriedades passivas e ativas) dos neurônios de CA1 do hipocampo de ratos normais, ratos epiléticos (modelo de pilocarpina) e humanos (epilepsia do lobo temporal refratária ao tratamento clínico).
3. Avaliação das propriedades eletrofisiológicas ativas e passivas dos neurônios de CA1 em 3 grupos após perfusão com Ringer sem magnésio.
4. Avaliação das características eletrofisiológicas dos neurônios de CA1 utilizando o padrão de acomodação nesta diferenciação.

3. MATERIAL & MÉTODOS:

1. GRUPOS DE ESTUDO:

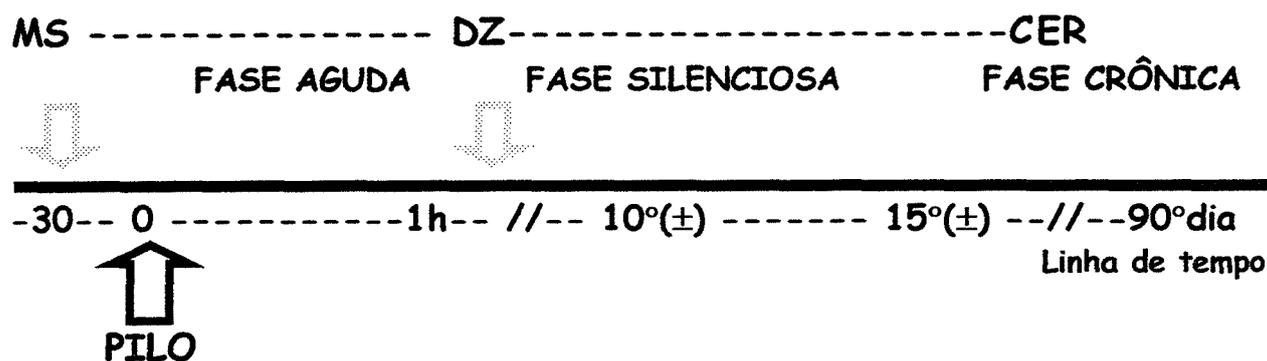
O presente estudo eletrofisiológico comparativo de células hipocampais é constituído de três grupos:

GRUPO:	
❖ Grupo 1	RATOS NORMAIS
❖ Grupo 2	RATOS EPILÉPTICOS
❖ Grupo 3	TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

- **GRUPOS 1 e 2 :**

Foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar com ciclo claro-escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*, provenientes do biotério do IPB, distribuídos em dois grupos de estudo conforme será visto nos próximos itens. A linhagem utilizada não apresentou nenhuma propensão genética a crises convulsivas espontâneas.

1.1 MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO PELA PILOCARPINA:



ESQUEMA 1 –Delineamento experimental do modelo da Pilocarpina

MS- metil scopolamina

DZ- diazepam

PILO- Pilocarpina

CER- crises espontâneas recorrentes

O grupo consistiu de 25 ratos com 30-35 dias com peso mínimo de 100 gr que receberam uma dose de metilscopolamina (MS) (1mg/kg) injetada intraperitonealmente, 30 min antes da administração da pilocarpina, que induz o *status epilepticus* (SE). O pré-tratamento com metilscopolamina, um antagonista colinérgico que não ultrapassa a barreira hematoencefálica, serviu como atenuador das manifestações periféricas da pilocarpina.

Decorridos 30 minutos, injetou-se 380 mg/kg de cloridrato de pilocarpina via intraperitoneal, conforme protocolo desenvolvido por Cavalheiro (Cavalheiro, 1991) A partir deste momento iniciou-se a observação comportamental destes ratos. Os animais

foram colocados em caixas de acrílico transparentes para que pudessem ser feitas as observações das primeiras manifestações de crise.

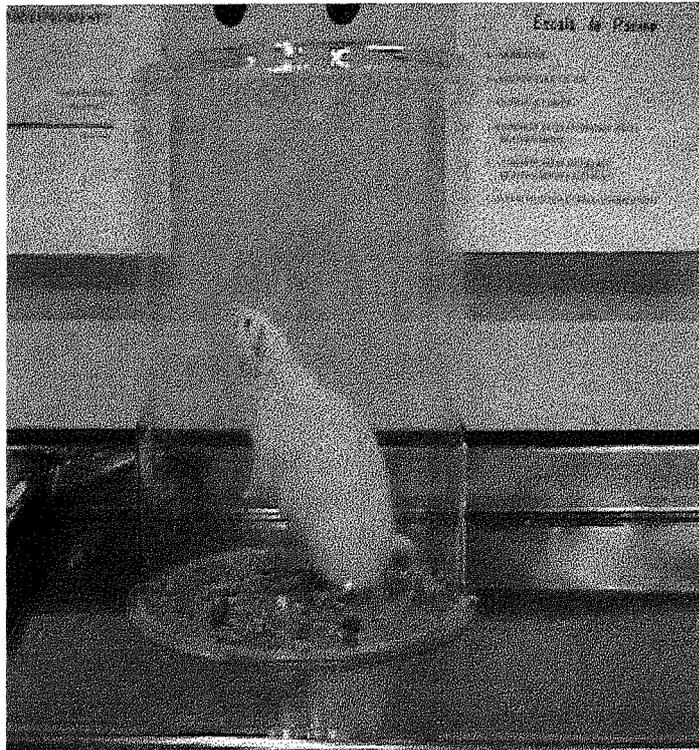
Em torno dos 5 minutos após a injeção da pilocarpina, os ratos apresentaram acinesia, ereção do pelo, automatismos orofaciais e de extremidades; sacudidas da cabeça, tremores e clonias nas 4 patas, elevação das patas dianteiras e queda. (FIG.1) (comportamentos límbicos classificados na escala de Racine) (Racine, 1972) Além disso os animais apresentaram salivação, incontinência urinária. Considerou-se, como critério de SE, a persistência de crises contínuas por no mínimo 30 minutos (Cavalheiro 1991, Mello 1993).

Aproximadamente 1 hora após a instalação do SE, injetou-se 4 mg/kg de diazepam (valium) intraperitonealmente para interromper a crise (Mello 1993). Mesmo administrando o diazepam a maioria dos ratos continuou em crise. Os animais ainda receberam uma dose de soro fisiológico e nos dois dias seguintes adicionou-se na dieta alimentar banana esmagada para a reposição do potássio.

A maioria dos ratos que apresenta crises tônico-clônicas evolui para óbito, sendo esse um modelo de alta mortalidade. No nosso caso dos 23 ratos injetados apenas 3 morreram no decorrer do experimento. 80 % dos ratos injetados sobreviventes evoluíram para o SE. Os animais que receberam pilocarpina mas não desenvolveram o SE foram excluídos do presente estudo.

Decorridos 2 meses, período em que se verificou através de observações comportamentais o surgimento de manifestações de crises espontâneas recorrentes (CER), os animais foram sacrificados para o estudo eletrofisiológico através da técnica de fatias de hipocampo. A metodologia aplicada será discutida posteriormente no item 4.2.1.

Modelo Experimental de Epilepsia Induzida pela Pilocarpina



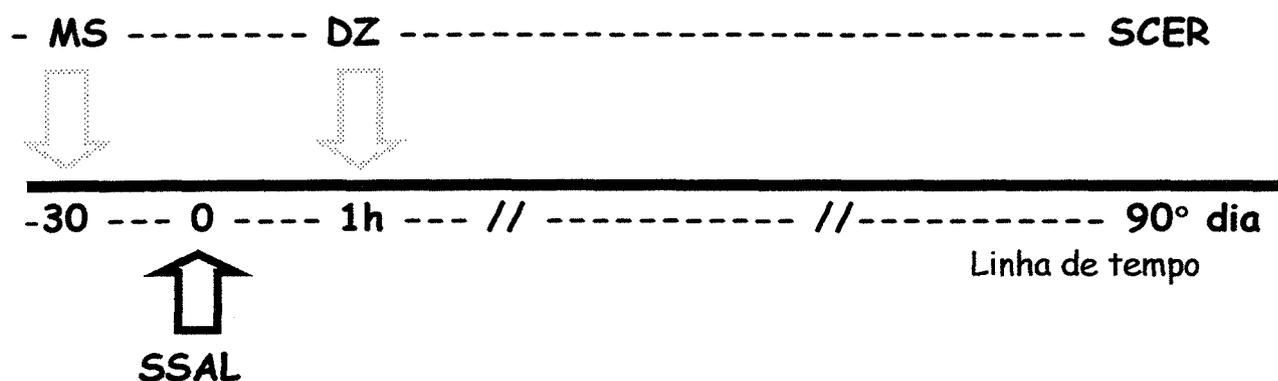
ESCALA DE RACINE

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

Racine, 1972

Fig.1 A figura mostra um Rato na fase crônica. Logo após a injeção de pilocarpina, apresentou os primeiros sinais da crise. Este rato apresentou grau 5 na escala de Racine.

1.2. RATOS NORMAIS:



ESQUEMA 2: Delineamento Experimental de Ratos Normais

MS- metil scopolamina

DZ- diazepam

SSAL- solução salina (NaCl 0,9 %)

SCER- Sem crises espontâneas recorrentes

O grupo consistiu de 23 ratos com 30-35 dias que receberam uma dose de metilescopolamina (1mg/kg) injetada intraperitonealmente, 30 min antes da administração de solução salina (soro fisiológico 0,9%) e 1 hora após a injeção da mesma receberam uma dose de 4 mg/kg de diazepam. Assim como os animais do grupo 1, nas primeiras 48 horas após a injeção os animais receberam uma dieta acrescida de banana.

Estes animais permaneceram no biotério do IB-PUCRS por mais 60 dias quando então foram sacrificados conforme metodologia do item 4.2.1.

1.3 GRUPO DE TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

Os fragmentos de tecido foram obtidos de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, cuja investigação, no Programa de Cirurgia da Epilepsia do Hospital São Lucas da PUCRS, demonstrou origem temporal das crises. Estes pacientes foram selecionados no programa específico (Programa de Cirurgia da Epilepsia) para avaliação de candidatos à cirurgia, sendo todos portadores de epilepsia com refratariedade ao tratamento medicamentoso.

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

O processo de avaliação pré-cirúrgica inclui os procedimentos padronizados no serviço de neurologia do Hospital São Lucas da PUCRS e que estão de acordo com as normas preconizadas pelo Ministério da Saúde e Comissão de Cirurgia de Epilepsia da Liga Brasileira de Epilepsia (de Paola e colaboradores, 2001). A indicação cirúrgica seguiu critérios como: a área de origem dos estímulos epileptogênicos deve ser localizada e unilateral, e deve permitir a ressecção sem causar danos neurológicos importantes, as epilepsias do lobo temporal são as que mais frequentemente preenchem estes critérios. É fundamental esta avaliação para determinar se a área afetada pode ser retirada adequadamente. Para isto existe um protocolo mínimo de avaliação que inclui de acordo com a Comissão de Cirurgia de Epilepsia da Liga Brasileira de Epilepsia (de Paola e colaboradores, 2001).

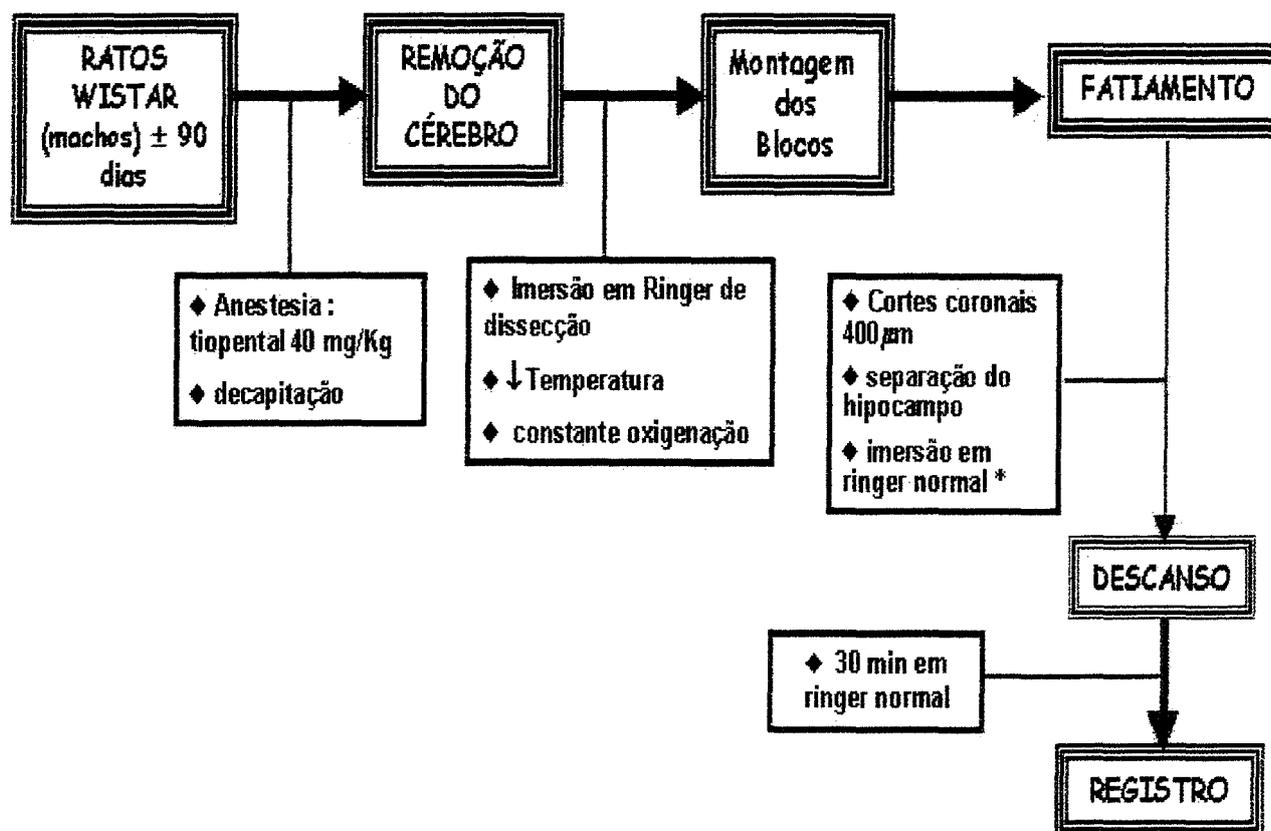
- EEG monitorizado por vídeo por no mínimo 24 horas com registro inequívoco de pelo menos 1 crise epiléptica habitual.
- Ressonância Magnética encefálica, tomografia computadorizada,
- Testes neuropsicológicos
- Se necessário, EEG com eletrodos subdurais e ainda, pelo EEG pré-cirúrgico com a localização dos focos de onda lenta, pode-se estimar as funções de memória do lado não ressecado no pós-cirúrgico.

2. ÉTICA:

Os protocolos experimentais para a utilização de ratos e tecido humano oriundos da cirurgia foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, processo nº 259/01-CEP.

3 TÉCNICA DE OBTENÇÃO DAS FATIAS CEREBRAIS

OBTENÇÃO DAS FATIAS DOS GRUPOS 1 E 2



ESQUEMA 3- RESUMO das principais etapas da obtenção das fatias dos grupos 1 e 2

3.1. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA A TÉCNICA DE FATIAS:

3.1.1. EQUIPAMENTOS:

- Guilhotina (Insight Equipamentos)
- micrótomo tipo “vibroslice” (vibrátomo) (Campden Instruments, EUA- modelo Vibroslice 752M)
- microscópio estereoscópico (Jena, Alemanha):

3.2 TÉCNICA DO FATIAMENTO CEREBRAL: RATOS

Tanto os animais do grupo normal quanto do epiléptico foram sacrificados para a remoção e fatiamento do cérebro (esquema 3):

Os animais foram pesados (Fig.2) e anestesiados com Tiopental (40 mg por Kg) (Fig.3). Imediatamente após, foram decapitados com uma guilhotina especial para este fim.

Após a decapitação iniciou-se o processo de abertura do crânio (Fig.4) para remoção do cérebro. Este procedimento não ultrapassou 3 min para que o mesmo não sofresse hipóxia isquemia. Com auxílio de uma pinça, os ossos parietais foram afastados a partir da sutura sagital (Fig.4 e 5) e o encéfalo foi removido utilizando-se de uma espátula curva (Fig.6). O encéfalo foi então imerso numa solução Ringer de dissecação * mantida sob temperaturas de 4°C, sob constante oxigenação por aproximadamente 20 segundos para aumentar a consistência do tecido, tornando-o mais apto ao corte.

*Nota: ver no item meio de perfusão.

A obtenção das fatias deu-se através da montagem de blocos com o cérebro e o fatiamento foi feito utilizando-se de vibrátomo (sentido do corte: coronal/ espessura : 400 μ) (Avoli e colaboradores 1989; Lorenzon & Foehring, 1992; Kohling e colaboradores 1996) (Fig.s. 7-11).

Uma vez que o presente estudo visa comparar as respostas eletrofisiológicas de hipocampos de ratos com os de seres humanos tomou-se o cuidado de deixá-los em condições semelhantes. No caso de humanos têm-se a perda das aferências pela própria ressecção cirúrgica. Quanto aos ratos houve a necessidade de isolarmos o hipocampo (Fig.. 12 e 13). Os hipocampos foram separados do restante da fatia, imersas no Ringer normal em temperatura ambiente sob constante oxigenação permanecendo por 1 hora descansando (Fig..11). Decorrido este período o material foi levado à câmara de incubação para os registros eletrofisiológicos .

Técnica de Brain Slices- Grupos 1 e 2

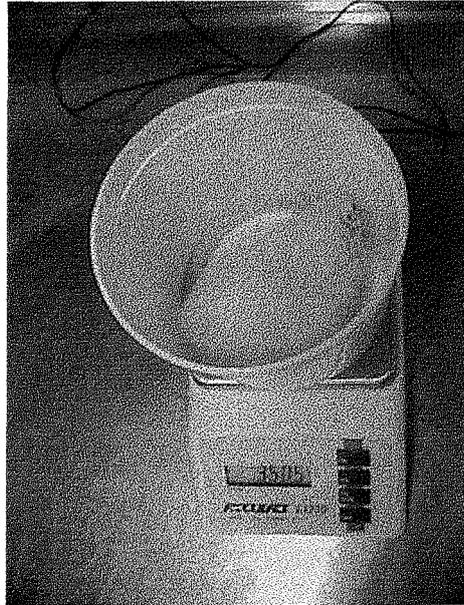


Fig. 2. Pesagem do rato

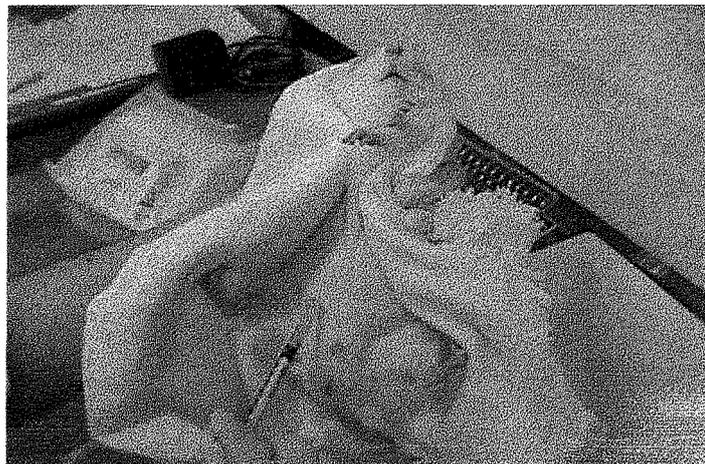


Fig.3. Anestesia intraperitoneal (40 mg/Kg de tipopental).

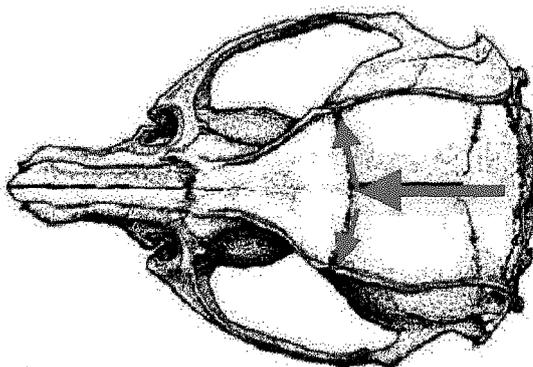


Fig.4. As setas mostram o sentido da abertura da calota craniana

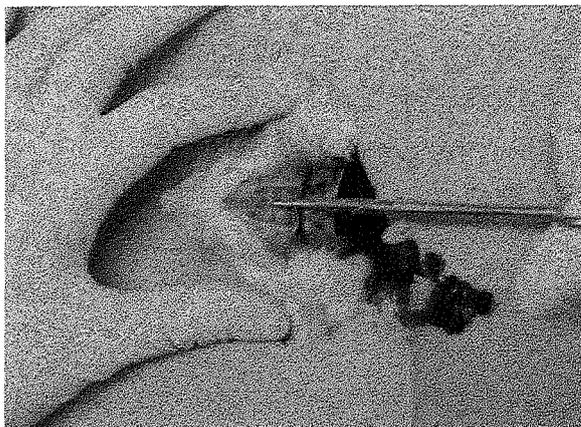


Fig.5 abertura do crânio do rato



Fig.6. Remoção do cérebro, com auxílio de uma espátula; o mesmo foi imerso numa solução de Ringer de dissecação constantemente oxigenado

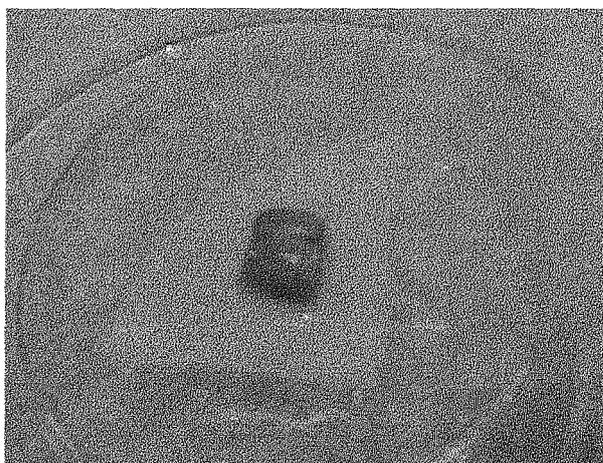


Fig.7: O cérebro é retirado do Becker contendo o Ringer de dissecação e colocado numa placa de Petri com gelo para a montagem do bloco que é levado ao vibrátomo

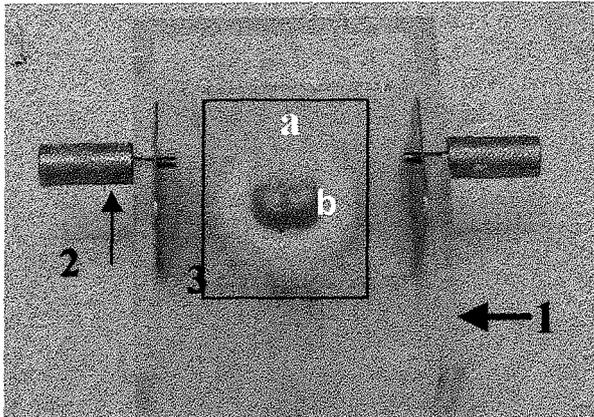


Fig.8: A figura mostra a cuba contendo o bloco com o cérebro pronto para ser fatiado.

1. cuba de fatiamento
2. suporte
3. Bloco cerebral:
 - a. Gelatina
 - b. Cérebro

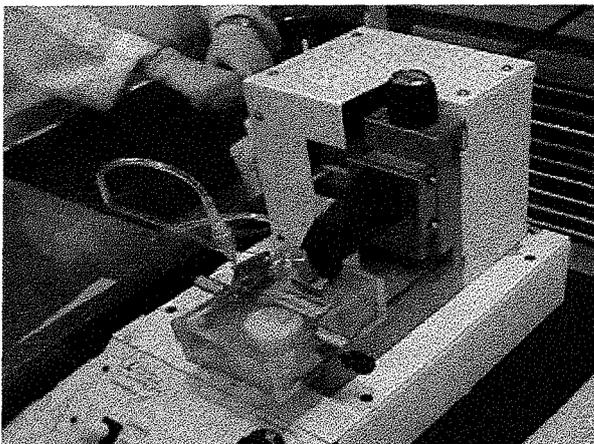


Fig.9 . A cuba é levada ao vibrátomo para obtenção de fatias de 400 μm (cortes coronais)

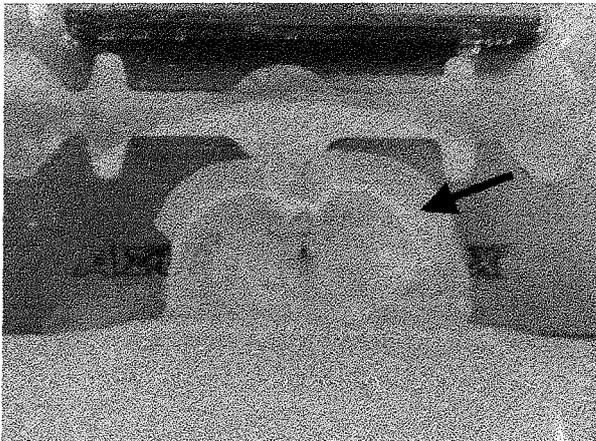


Fig.10 Detalhe do fatiamento, notar hipocampo (seta).

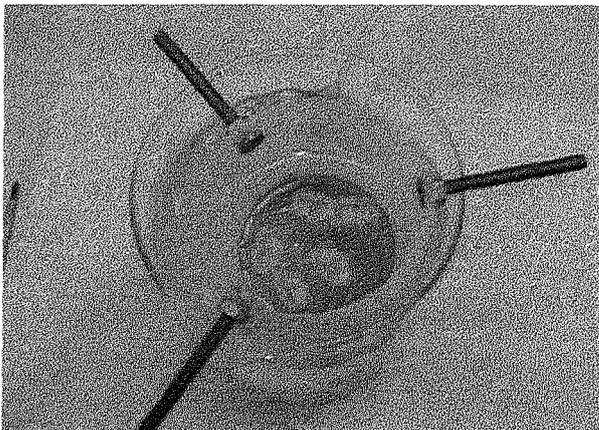


Fig.11 Após o fatiamento as fatias foram colocadas em um Becker contendo Ringer normal

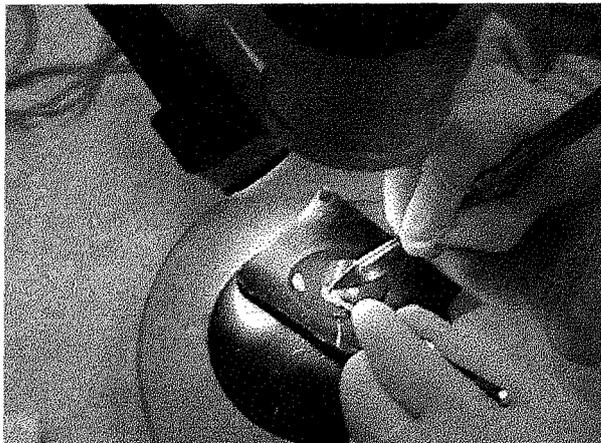


Fig.12. Imediatamente após a obtenção das fatias, foram realizados, sob microscópio estereoscópico, o isolamento do hipocampo

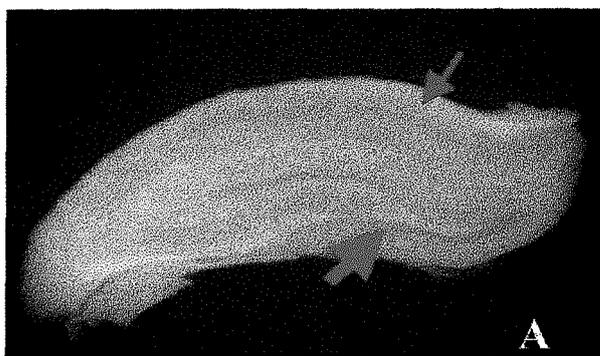
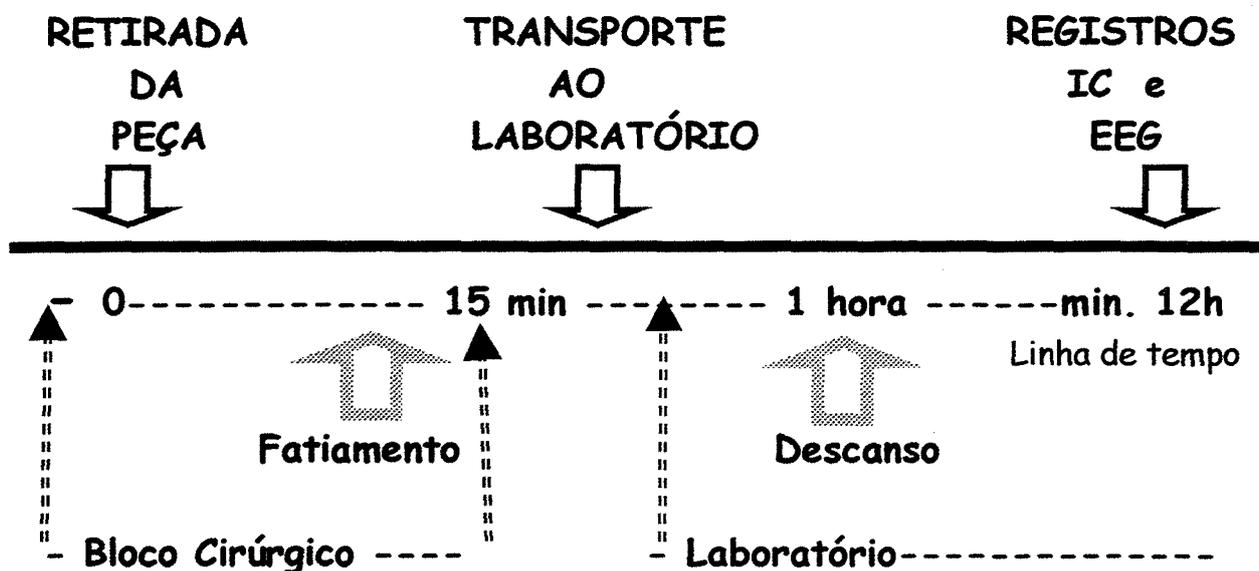


Fig.13. A) A figura mostra o hipocampo de rato normal já isolado da fatia. O isolamento foi feito sob um microscópio estereoscópico.. Notar a linha evidente de CA1 (seta fina) e o GD (seta grossa)



B) mostra uma fatia de hipocampo de rato epiléptico já isolado da fatia. Notar que CA1 não está visível (seta fina) e o GD apresenta um aspecto disforme (seta grossa)

3.3. OBTENÇÃO DAS FATIAS DE TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO



ESQUEMA 4: Delineamento Experimental de obtenção das células Humanas

Durante a cirurgia, o neurocirurgião retirou o fragmento de tecido hipocampal, dividindo-o numa parte para o patologista avaliar o grau de esclerose hipocampal e outra para o registro eletrofisiológico.

A técnica para a obtenção das fatias de tecido cerebral humana é semelhante da utilizada em ratos , porém a espessura é um pouco maior (500 μm) (Connors & Amitai, 1993) A seguir o material foi transportado ao laboratório imerso em um recipiente contendo Ringer normal sob constante oxigenação, permanecendo em descanso por 1 hora. Decorrido este período, elas foram levadas à câmara de registros, onde foram submetidas a estímulos elétricos .

NOTA: O meio de incubação para as fatias tanto dos grupos 1 e 2 quanto tecido humano incluiu uma composição, oxigenação, osmolaridade, pH e temperatura adequadas (Gutierrez 1999 e Avoli 1989). A perfusão das mesmas na câmara de incubação será com Ringer (composição descrita na nota do item IV) aquecido a 35°C e continuamente oxigenados (95% de O_2 e 5% CO_2), ver item de meios de perfusão.

OBTENÇÃO DAS FATIAS DE HIPOCAMPO HUMANO

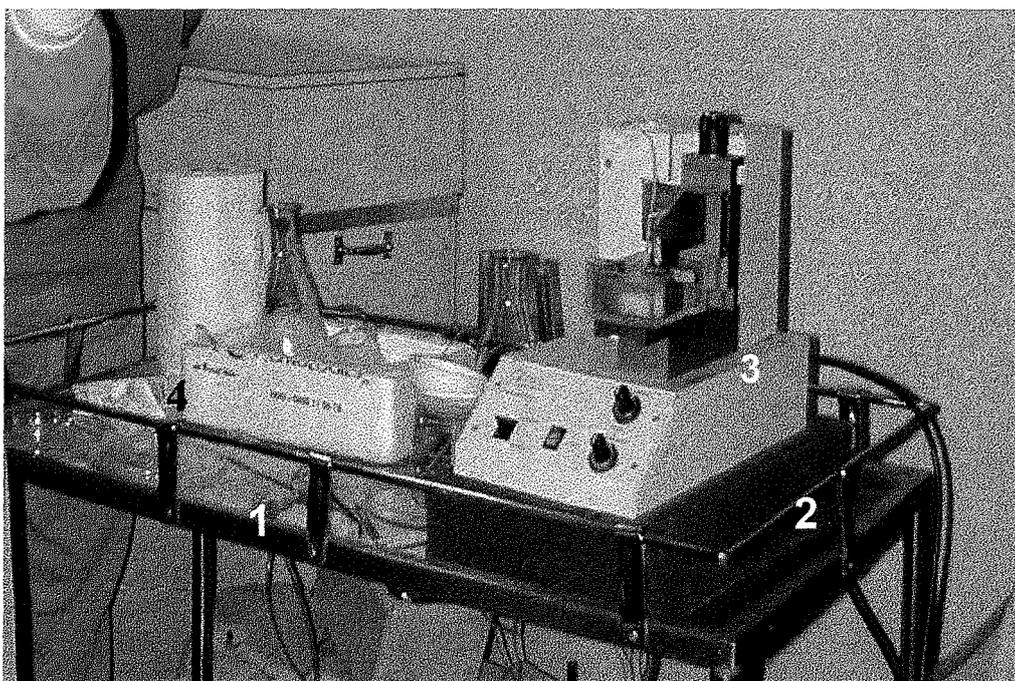


Fig.13. A figura mostra os Equipamentos e instrumentos necessários para a obtenção das fatias no bloco Cirúrgico.

- 1) Carrinho (“Baby”), onde encontramos os instrumentos para o fatiamento dos hipocampos
- 2) “Vibroslice”
- 3) Cuba de fatiamento
- 4) Instrumentos : pinças, bisturis, placas de Petri, bisturi, super cola, caixa com gelo, Beckers e papel filtro



Fig.14 A figura mostra de como são obtidas as fatias de hipocampo no bloco cirúrgico



Fig.15. fatiamento no “vibroslice”



Fig. 16 Detalhe do fatiamento do hipocampo

4. REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS:

4.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS: (fig.17):

O equipamento de registro e estimulação é composto por: 1 Câmara de perfusão e registro de interface, osciloscópio Tektromix, estimulador Master 8, amplificador Cyber Amp 380 e “fixador de corrente” (current clamp) AxoClamp 2B e monitorizados e armazenados em PC, com o programa AxoScope e posteriormente analisados com o “Software” Origin 5.0. Para a visualização das camadas do hipocampo utilizou-se um microscópio estereoscópio.

4.2 MEIO DE PERFUSÃO E MODELOS INDUTOR DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME *IN VITRO*:

A solução salina de Ringer é também referida como líquido cefalorraquidiano artificial (Henderson, 1984) e durante o procedimento houveram algumas variações tanto nas concentrações do íon Mg^{2+} .

A composição a ser utilizada para a dissecação em mM: NaCl., 124; KCl, 2; KH_2PO_4 , 1,25, $NaHCO_3$, 26; glicose, 10; $MgSO_4$, 5 e $CaCl_2$, 0,2 ; e pH: 7.4 . Essas concentrações de Mg^{2+} e Ca^{2+} evitam o estresse celular. Já para o descanso do hipocampo o material foi imerso numa solução contendo Ringer normal, composto de em mM: NaCl., 124; KCl, 2; KH_2PO_4 , 1,25, $NaHCO_3$, 26; glicose, 10; $MgSO_4$, 2 e $CaCl_2$, 2 ; pH: 7.4 (Avoli e colaboradores 1989; Gutierrez, 1999) Durante o registro as fatias cerebrais foram constantemente perfundidas com Ringer normal, cuja a fórmula já foi descrita anteriormente porém pré-aquecido (34°C) e constantemente oxigenado.

Para a indução da atividade epileptiforme utilizou-se o modelo induzido pela ausência do íon Mg^{2+} (Anderson e colaboradores, 1986) onde no meio de perfusão. O Mg^{2+}

produz um bloqueio dependente de voltagem no complexo receptor NMDA. A falta deste íon condiciona um estado de hiperexcitabilidade neuronal pelo aumento da condutância destes receptores, aumentando a liberação sináptica destes neurotransmissores (Mody 1988).

EQUIPAMENTO DE REGISTRO

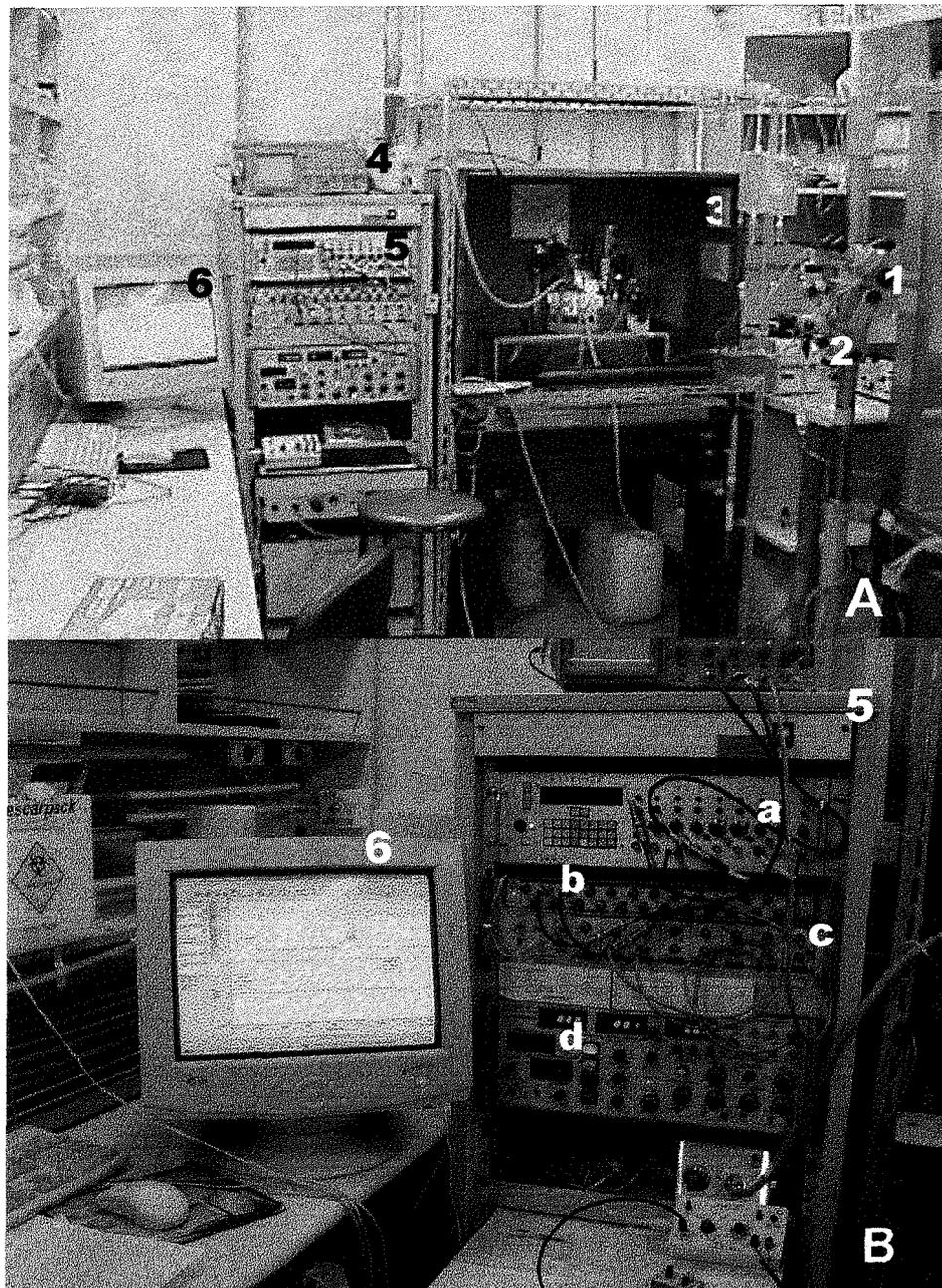


FIG.17 Equipamento de registros: A) Aspecto geral ; B) Detalhe dos equipamentos. 1) microscópio estereoscópico; 2) Bomba peristáltica (Gilson); 3) Câmara de registro; 4) osciloscópio. 5) Equipamento: a) estimulador Master 8, b) conversor analógico-digital DigiData 1200, c) amplificador Cyber Amp 380, c) AxoClamp 2B e monitorizados e armazenados em PC (6)

EQUIPAMENTO DE REGISTRO

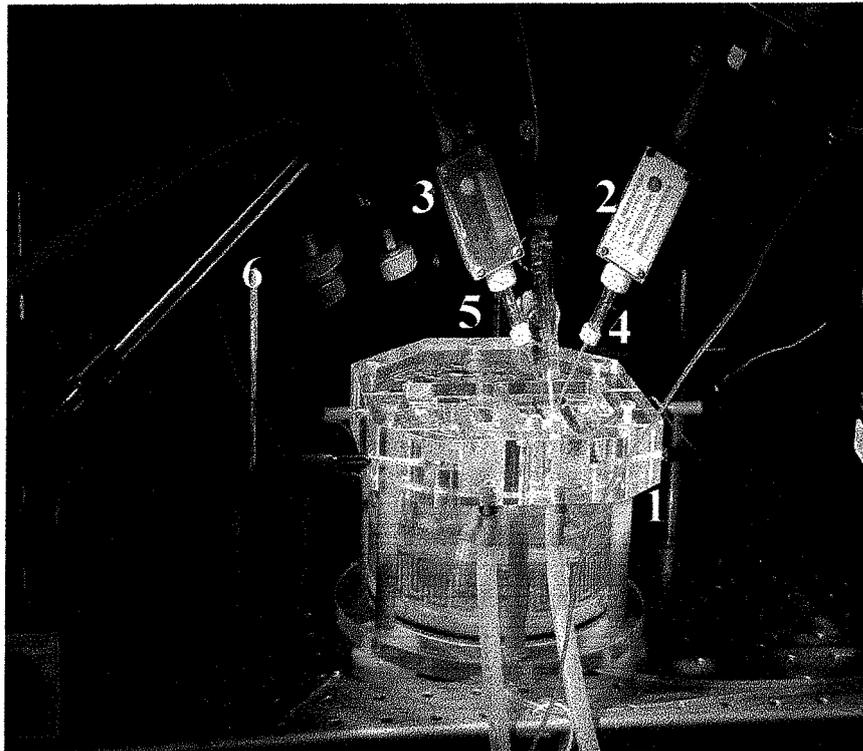


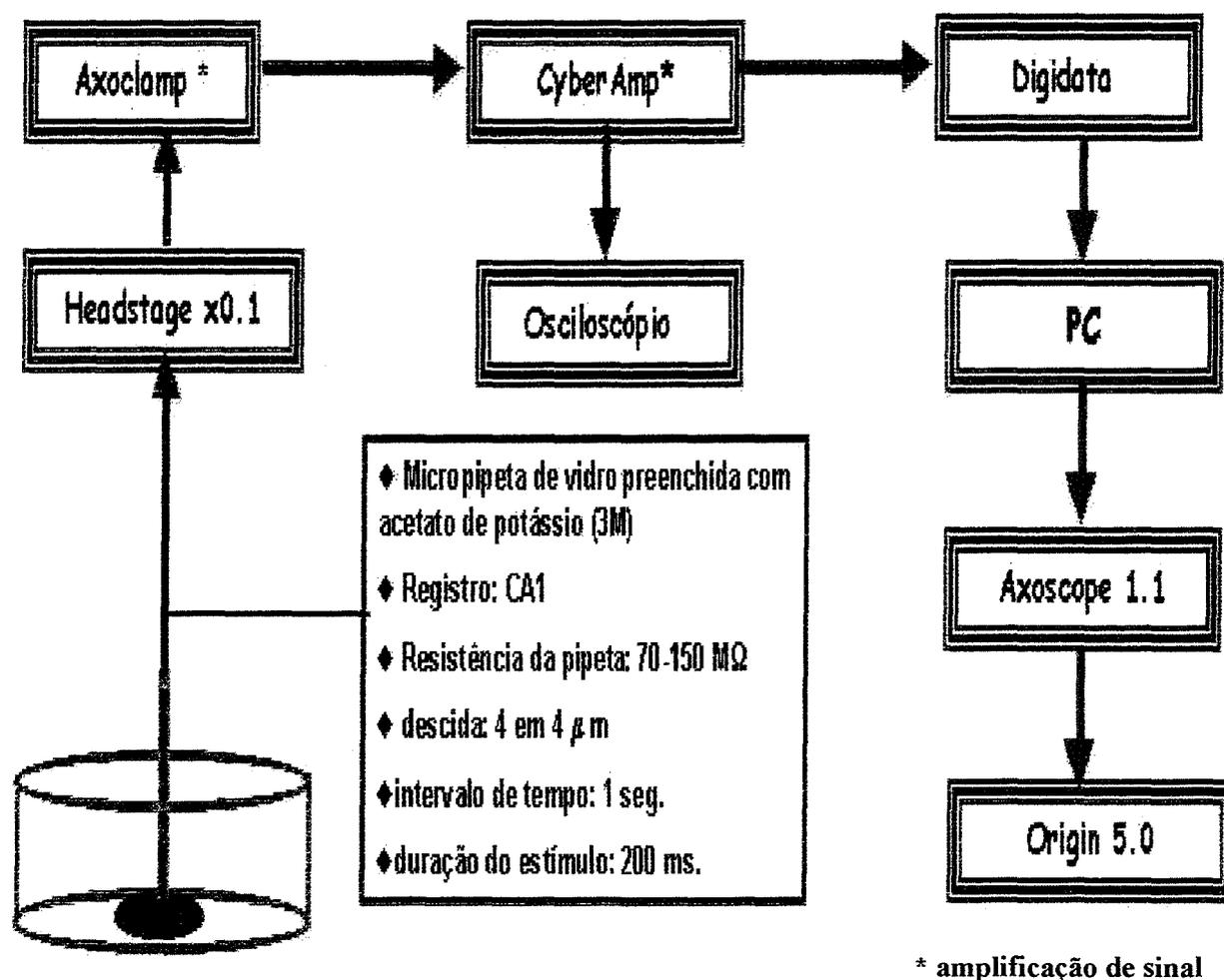
Fig.18 A figura mostra em detalhes a câmara de registro. Em 1) a câmara de registro de interface; 2) pré-amplificador (headstage 1X) para registro intracelular (IC); 3) pré-amplificador (headstage 0,1X) para registro extracelular (EC); 4) microeletrodo de registro IC; 5) microeletrodo de registro EC; 6) micromanipuladores

4.4 MICROELETRODOS PARA REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS:

Os registros dos potenciais intracelulares foram realizados com microeletrodos de vidro (micropipetas) construídos de tubos capilares de vidro de boro silicato (*WPI Inc*) com diâmetro externo de 1,5 mm e interno de 0,86 mm. Estes foram distendidos com o auxílio de um estirador de pipetas (pipete Sutter) preenchido com acetato de potássio 3 M (Avoli, 1989), mantendo-se a resistência DC entre 70-150 M Ω (Avoli e colaboradores 1989; Kohling e colaboradores 1996; Gutierrez & Heinemann, 1999).

No caso dos registros EEG também foram utilizados microeletrodos de vidro (micropipetas). Construídos de tubos capilares de vidro de boro silicato com diâmetro externo de 1,5 mm e interno de 1,12 mm (*WPI Inc*), distendidos com estirador de pipetas (pipete Sutter) só que preenchido com Ringer: a resistência destas pipetas ficou entre 5-10 M Ω

4.5 METODOLOGIA USADA PARA OS REGISTROS INTRACELULARES (IC)



ESQUEMA 5: Resumo das principais etapas da obtenção dos registros intracelulares

Para o registro IC, a micropipeta foi posicionada verticalmente ao “slice” e com auxílio de um micromanipulador (*WPI INC*), buscou-se a penetração de uma célula-alvo da área de CA1, para isto começou um processo de descida da micropipeta de 4 em 4 μm. Foram passados pulsos retangulares de 200 ms de corrente (-0,2 nA) aplicados em

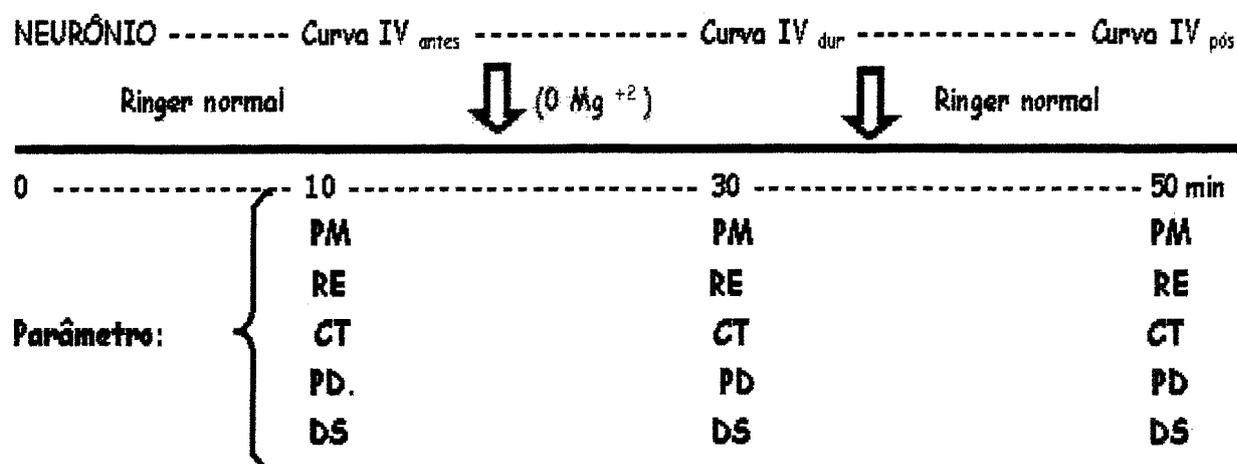
intervalos de 1 segundo através da pipeta de registro. Com isto o sinal eletrofisiológico foi constantemente monitorado tanto com o osciloscópio quanto com o monitor do PC, via “software” Axo Scope 1.1.

Para introduzir o microeletrodo na célula foram feitas pequenas vibrações no mesmo, a medida em que se descia com o micropipeta. Estas vibrações foram realizadas com auxílio de um circuito elétrico do amplificador Axoclamp 2 B –(*Axon instrument, INC*) acoplado a micropipeta, denominado “Buzz”

Ao penetrar na célula, observou-se uma descida brusca no potencial elétrico (V_m) a valores do Potencial de membrana (PM) da célula em questão. A seguir passou-se um pulso hiperpolarizante, durante 2-3 min para que houvesse a recuperação da célula (aderência à micropipeta). Após 10 minutos do “descanso” avaliou-se as diferentes propriedades celulares através dos protocolos descritos a seguir.

Os registros IC foram realizados com o método eletrofisiológico por fixação de corrente (“current clamp”). Este permite a injeção de corrente (pulsos retangulares, etc.) constantes na célula e conseqüentemente observar e registrar as variações na voltagem em resposta a essa corrente (Axon 1993). Foram considerados válidos aqueles registros estáveis por mais de 10 min e potencial de membrana maior que -50 mV.

4.6 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA:



As setas largas correspondem a troca dos Ringers imediatamente após obtenção da curva IV, o Ringer demorava 10 minutos para chegar a cuba.

ESQUEMA 6- Resumo do protocolo de estimulação

Os sinais eletrofisiológicos foram captados e pré amplificados inicialmente com pré-amplificadores para registros IC e EC (“headstages”) (Fig.18) e amplificados pelo equipamento de registro, já descrito anteriormente e cuja metodologia foi resumida no esquema 5. Para análise posterior os registros foram armazenados com o “software” Axo Scope 1.1 (*Axon Instrument, Inc*).

Avaliou-se a partir destes dados a resistência de entrada, cujo o valor indicou a impedância (resistência) da membrana celular e seu valor foi calculado com o “software” Origin 5.0 (Branco- Neurolab-1999); além desta foram estudadas outras propriedades passivas da membrana, além da presença de descargas em salva e a caracterização

eletrofisiológica destas células que produzem esta atividade antes durante e após o tratamento com o modelo do 0-Mg²⁺.

4.7 PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICAS ANALISADOS:

A) PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA:

- **Potencial de membrana (PM):** Ele é determinado imediatamente após a penetração da célula, no presente estudo considerou-se o valor observado 10 minutos após o empalamento do neurônio. O potencial de membrana foi avaliado nas seguintes condições: antes do tratamento com Ringer 0-Mg²⁺ (PMMA); durante (PMMD) e depois (PMMP) (fig.19-B).

- **Resistência de entrada (RE):** Vários parâmetros podem ser utilizados para o estudo eletrofisiológico do neurônio mas um dos mais importantes é a chamada "Resistência de Entrada" (RE). Esse valor indica basicamente a impedância (resistência) da membrana plasmática (MP). Se o neurônio estiver com uma abertura (provocada pela pipeta) muito grande, por exemplo, haverá comunicação entre o ambiente intra e extra-celular e a RE estará diminuída.

Para a obtenção do valor de RE foram aplicadas ao neurônio "empalado" pulsos de correntes (I) hiperpolarizantes iniciadas em -0,7 até 0 nA e com 200 ms de duração. Estes dados foram armazenados com o software Axo Scope 1.1 no modo "high speed

osciloscópio” para que os dados adquiridos ficassem sobrepostos (Fig. 19.A) Para calcular o valor de RE os dados foram transferidos ao software Origin 5.0 a fim de que fossem “plotados”, e através da função “Fit linear” calculou-se o valor da RE (Fig.19.B).

Foram avaliados a RE: antes (REMA), durante (REMD) e após (REMP) da passagem do Ringer 0-Mg²⁺.

- **Constante de Tempo (CT):** A constante de tempo da membrana (τ_m) é a variação de como a variação do Pm é diminuída pela capacitância da MP. Após injetar um pulso retangular o tempo necessário para que seja atingido 63% da voltagem inicial é definida como a constante de tempo. Para este cálculo utilizou se a média de 3 medidas da τ_m . O protocolo consistiu da aplicação de correntes negativas (-0,3 até -0.1 nA), (fig.20.B) e estes dados foram obtidos no momento em que era realizado a aquisição dos dados para a curva I.V (fig.19.A). Para cada corrente foi calculado o valor de τ_m no programa Origin 5.0 na função “fit Exponential decay- first order”. (fig. 20)

Avaliou-se a constante de tempo nas condições: antes (CTMA); durante (CTMD) e após (CTMP) o tratamento com o 0-Mg²⁺.

PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA:

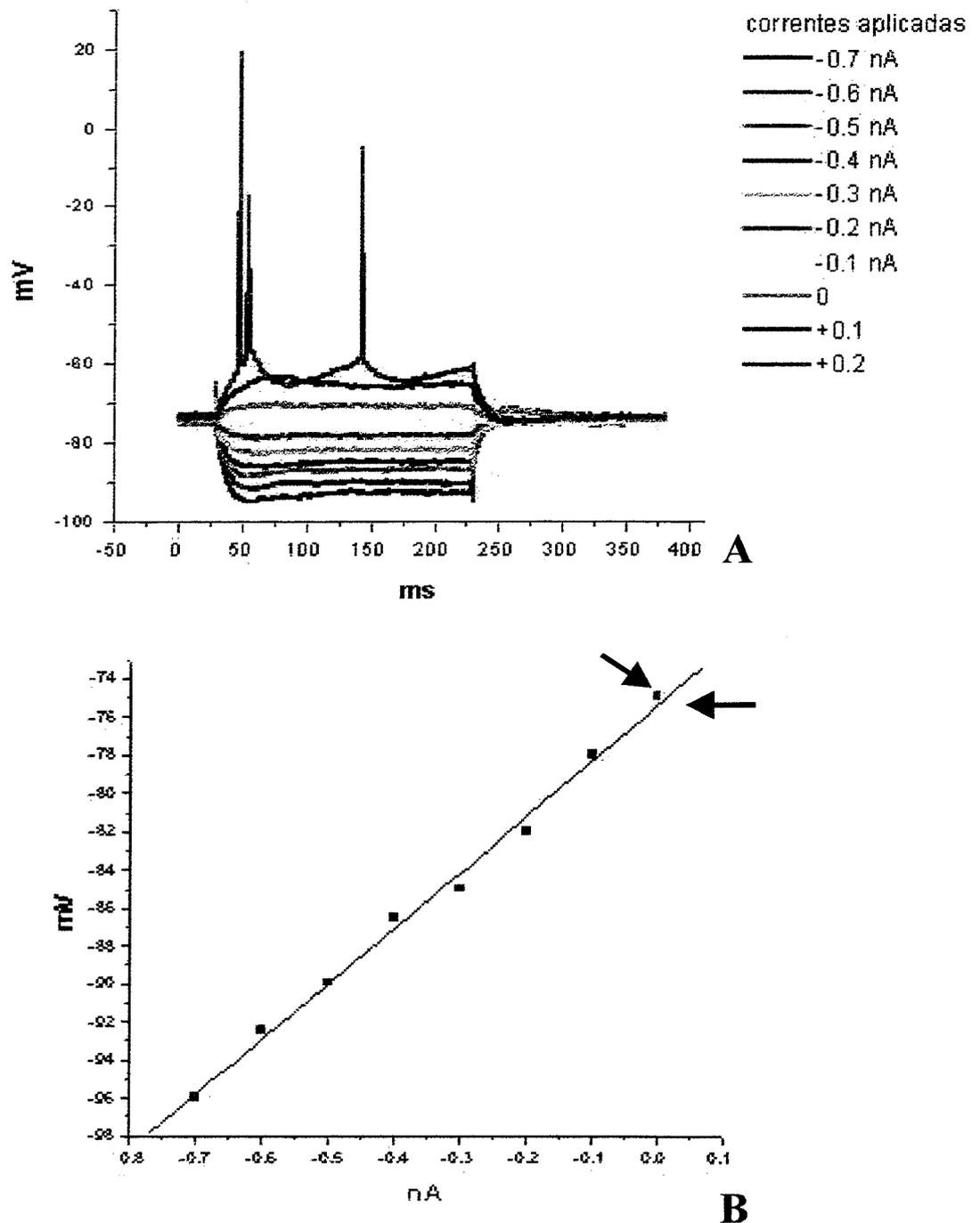


Fig.19. Cálculo da RE. A) Representam as correntes hiperpolarizantes (-0,7 nA - até zero) e correntes despolarizantes (aquisição desses dados no AxoScope 1.1). Através da aplicação de correntes podem ser obtidos os dados das análises das propriedades, tanto passivas quanto do disparo. B) Análise dados: mV representa o potencial de membrana no instante da aplicação de corrente (nA). No instante no qual temos 0 de corrente (setas) é medido o potencial de membrana.

PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA:

OBTENÇÃO DA CONSTANTE DE TEMPO

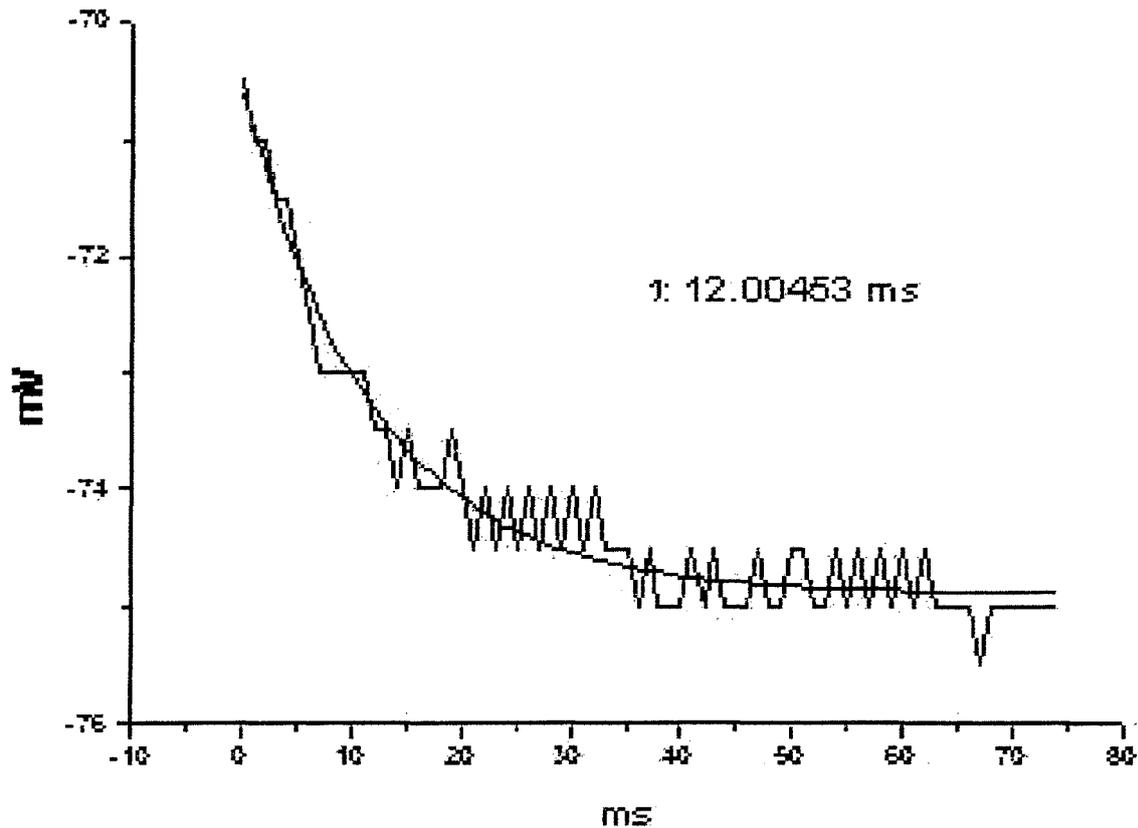


Fig. 20 Constante de Tempo da MP: Análise da constante de tempo da membrana (τ_m) da membrana, em A representa uma das respostas parciais eletrotônicas (80 ms) da membrana celular a pulsos negativos injetados de 0,1 nA e 200 ms de duração. A figura representa uma das 3 curvas de correntes utilizadas para o cálculo da (τ_m).

- **Propriedades do Disparo (PD) do Potencial de Ação (PA):**

- a) **Corrente injetada para o primeiro PA:** antes (CIPAA) durante (CIPAD) e após (CIPAP) a passagem do Ringer livre de Mg^{2+}
- b) **limiar do PA:** (21. a): antes (LAMA) durante (LAMD) e após (LAMP) o 0- Mg^{2+}
- c) **amplitude do PA** (fig 21.A Diferença de voltagem entre a e b): antes (AMA), durante (AMD) e após (AMP) passagem do 0- Mg^{2+}
- d) **duração do PA:** (fig 21.B-segmento entre a e b):antes (DPMA), durante (DPMD) e após (DPMP) a passagem do Ringer 0- Mg^{2+}
- e) **potencial de membrana ao final do PA (PPH):** potencial de repolarização, valor máximo do pós- potencial de hiperpolarização rápida (fig.21.a C) (PPHr), antes (PPHMA), durante (PPHMD) e após (PPHMP) a passagem de 0- Mg^{2+}

Propriedades do Disparo (PD) do Potencial de Ação (PA)

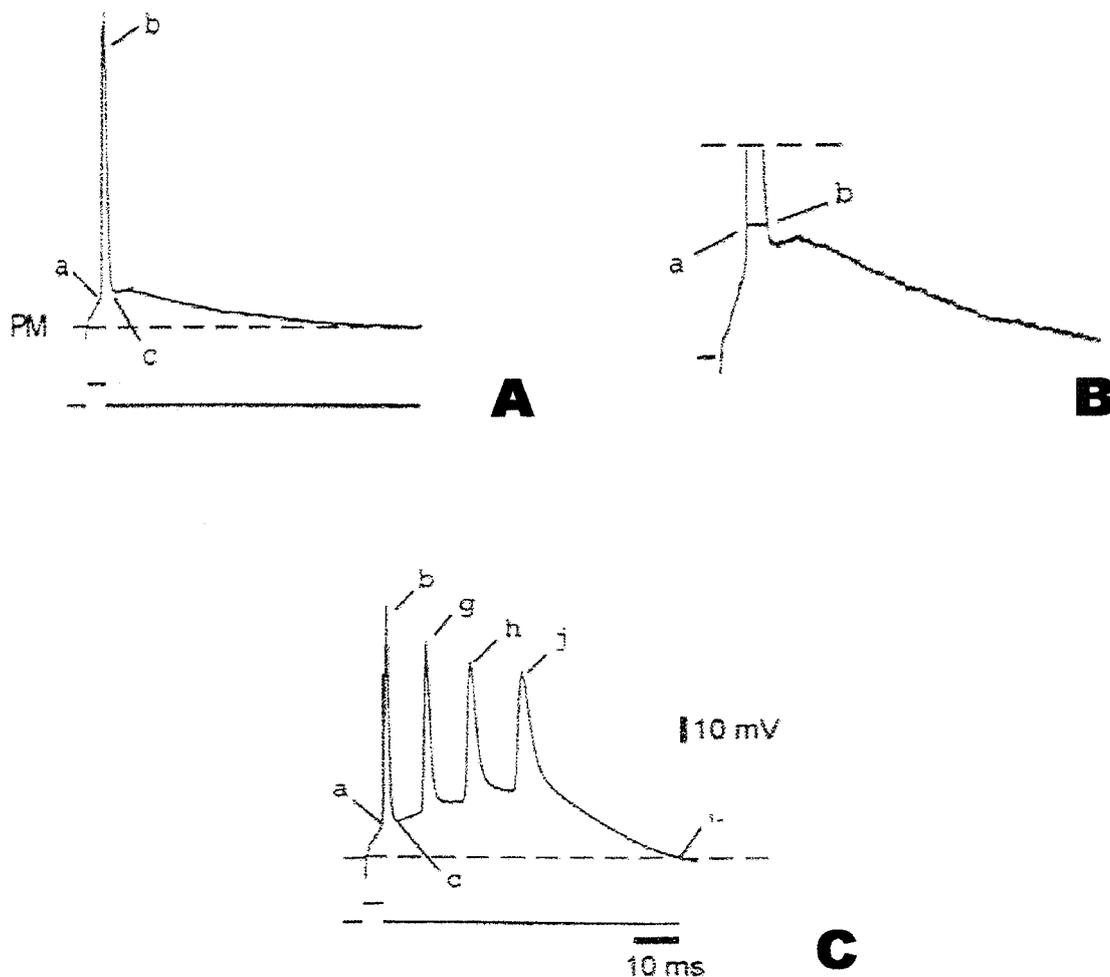


Fig21. Parâmetros Eletrofisiológicos das propriedades intrínsecas neuronais das células de CA1. **A)** mostra o PA e suas principais características eletrofisiológicas: a- limiar de disparo; b- ponto de amplitude máxima do PA(segmento a-b), c- valor do PPH. **B)** Cálculo da duração do PA; **C)** representa os parâmetros da descarga em salva intrínsecos : (a) limiar de disparo, (b) primeira espícula (PA), (c) PPH na primeira espícula (PA), (d), (e) e (f) espículas (Pas) consecutivas após o início da descarga em salva.

B) PADRÃO DE RESPOSTAS NEURONAIS:

Os neurônios tem sido classificados de acordo com a sua morfologia e por alguns critérios fisiológicos. Estudos recentes em eletrofisiologia revelaram que propriedades intrínsecas da membrana de neurônios neocorticais são sistematicamente diversas (Connors & Gutnick, 1990; Connors e Amitai, 1993). Outros estudos constataram que a grande maioria das células apresentavam um certo intervalo de tempo entre um potencial de ação e outro, recebendo por isso a denominação de **células com espículas de intervalos regulares** (“regular-spiking”) (RS). Ao fazerem a marcação destas células com marcadores intracelulares foi possível identificá-las como células piramidais com grande quantidade de espinhos. Um segundo tipo de célula identificada apresentou um espaço curto entre um potencial de ação e outro, classificada como **células com espículas de intervalos curtos** (“fast-spiking”) (FS). Através da marcação com corantes intra-celulares identificou-se como interneurônios Gabaérgicos com seu aspecto liso (McCormic e colaboradores 1985; Naegele & Katz, 1990). Huettner & Baughman (1988) mostraram em tecidos neocorticais em cultura que as células RS geravam respostas sinápticas excitatórias glutamatérgicas e as FS originavam potenciais pós-sinápticos inibitórios. Tanto as células RS quanto FS geravam disparos temporais repetitivos distintos. As RS se adaptavam após prolongada injeção de pulsos de correntes, já as células FS apresentavam uma pequena ou mesmo não apresentar adaptação aos mesmos pulsos de correntes. Existem evidências de que no hipocampo existam interneurônios que apresentam propriedades de disparo intrínsecas mais próximas ao disparo RS do que o FS (Lacaille & Schwartztroin, 1988). Foram observadas ainda no córtex um outro grupo com características semelhantes a RS mas que disparavam descargas em salva, sendo denominadas de **células com descargas em salva (DS)** (Connors e colaboradores 1982, McCormic, 1985). Estas células piramidais

se restringem as lâminas 4 e 5 do córtex (Foehring & Wyler, 1990, Connors & Amitai, 1993) enquanto que as células RS e FS são encontradas em todas as camadas do córtex.

No presente estudo utilizaremos esta classificação para identificar os diferentes tipos celulares. Para isto foram aplicados pulsos quadrados de 200 ms onde a corrente aplicada dependeu do aparecimento do número máximo de espículas (PA) sem que afetasse a amplitude dos mesmos. Estes dados foram analisados no programa Origin 5.0 através do cálculo da frequência instantânea e a curva de acomodação destes disparos.

Para a obtenção destes valores utilizou-se a fórmula: $1000/\text{diff}(\text{col}(\text{pkx}))$

Desse modo as células foram classificadas de acordo com as suas propriedades fisiológicas em:

Célula:	
RS	Células com Espículas (PA) de intervalos regulares
FS	Células com Espículas de intervalos curtos
DS	Células com descargas em salva

Na Introdução foi dada uma visão geral sobre a classificação das descargas em salva (descargas “burst”), porém se faz necessário o entendimento mais detalhado sobre este tipo de disparo. O do tipo intrínseco consiste de no mínimo 3 disparos de potenciais de ação (PA) com um intervalo inter-espícula de 5-15 ms, que emergem de uma onda lenta despolarizante. Os neurônios com descargas em salva têm como padrão de disparo uma “salva” de PAs.

As células piramidais foram classificadas de forma geral em 2 grandes grupos, conforme o quadro abaixo:

<p>Sem descargas em salva (CSDS)</p>	<p>Células que geram PA simples e independentes que apresentam acomodação como resposta a todos os estímulos supralimiarres</p>
<p>Com descargas em salva (CDS)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CDS de alto limiar (CDSAL): somente em resposta a estímulos supra-limiarres de alta intensidade. • CDS de baixo limiar (CDSBL): células que respondem com uma salva de PAs a qualquer estímulo. Foi subdividido em 3 diferentes subgrupos de sensibilidade crescente para gerar respostas em salva: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Grau I: células que disparam uma espícula simples a uma resposta a um pulso de corrente de curta duração (5 ms) (CDSBL-I) ➤ Grau II: células que geram resposta em salva a um estímulo curto(CDSBL-II) ➤ Grau III: células que disparam “salva” de Pas forma rítmica recorrente na ausência de qualquer estímulo exógeno ou de transmissão sináptica. (CDSBL-III)

Diversidade de Respostas das Células De CA1 Hipocampais

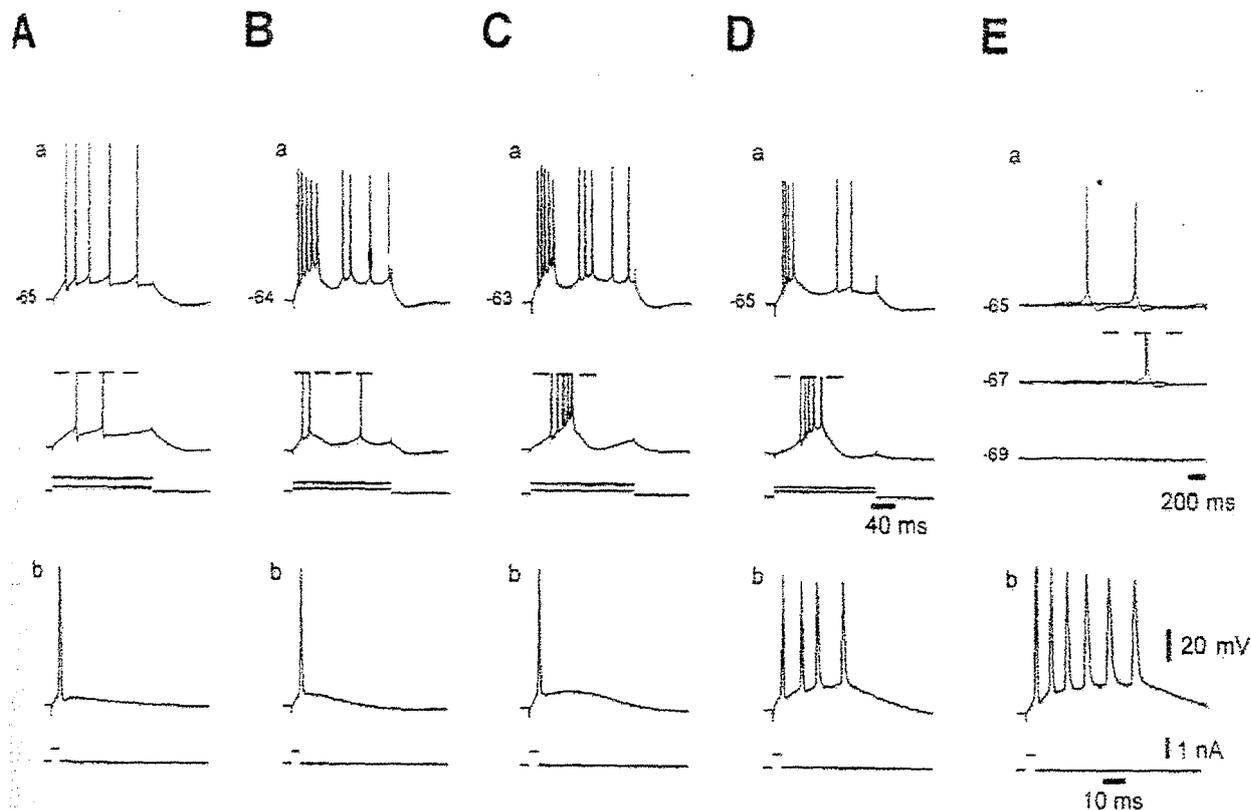


Fig.22 Diversidade eletrofisiológica no padrão de disparos neuronais de CA1. A) Célula sem descargas em salva; B) Célula com descargas em salva de alto limiar que responde a estímulos supralimiais; (B-a, traço superior). C) mostra um neurônio com descargas em salva de baixo (CDSBL-I) limiar que responde a qualquer estímulo despolarizante que atinge o limiar (C-a traço superior). D) mostra um neurônio com descargas em salva de baixo limiar do tipo II (CDSBL-II) que responde a estímulos limiares breves e longos (D-a) E) mostra um neurônio com descargas em salva de baixo (CDSBL-III) limiar que responde a qualquer estímulo despolarizante, esse difere do grau II por disparar espontaneamente, em E-a, mostra que esta atividade é dependente do PM

4.9. REGISTROS EXTRACELULARES (EEG):

Ao mesmo tempo que buscou-se o empalamento do neurônio de CA1, foi posicionado um segundo eletrodo para registro extracelular em CA1, próximo do eletrodo de registro intracelular, este serviu para o para o registro de EEG. Utilizou-se micropipetas de vidro preenchidas com uma solução Ringer ,para que evitassem que o vazamento provocasse o estresse celular (Avoli,1989) A resistência desta pipeta foi mantida entre 0,5-10 M Ω (Kohling, 1998).

O registro de EEG foi realizado utilizando-se o amplificador AxoClamp 2-B, e o pré-amplificador (headstage x 1). O microeletrodo foi posicionado com auxílio de micromanipulador do tipo mecânico modelo MB-K (*WPI INC*) próximo do registro intracelular. O sinal foi pré-amplificado com o headstage x1 (HS-2 A HEADSTAGE – *AXON INC*). O monitoramento de EEG serviu para avaliarmos a participação do neurônio no circuito neuronal (agregado e rede neuronal).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise a desses dados foram realizados com o auxílio dos programas: Excel (Microsoft ® Excel 97), Origin 5.0 (Microcal™ Software, Inc., EUA) e SPSS . Os resultados na análise das tabelas foram expressos como médias +/- o desvio padrão e o número de neurônios.. Os testes estatísticos a utilizados foram teste *t* pareado , análise de variância (one-way ANOVA) Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo .

A análise estatística serviu para detectar as diferenças nos diferentes parâmetros analisados e consistiu:

➔ Para os neurônios onde se conseguiu analisar temporalmente (antes, durante e após tratamento) o efeito do 0 Mg^{+2} : ANOVA. No caso de significância entre as resposta aplicou-se o teste Tukey

➔ Análise do cruzamento entre populações: Teste t de Student:

Dessa forma a análise estatística foi aplicada nos seguintes cruzamentos de dados:

Ratos Normais	Ratos Epilépticos	Tecido Hipocampal Humano
• Antes	• Antes	• Antes
• Durante	• Durante	• Durante
• Depois	• Depois	• Depois

Ratos Normais X Ratos Epilépticos

Ratos Normais X Tecido Hipocampal Humano

Ratos Epilépticos X Tecido Hipocampal Humano

4. RESULTADOS

Os animais injetados, que desenvolveram SE, apresentaram crises espontâneas recorrentes (CER) após o período silencioso. Dos 25 ratos injetados com a pilocarpina apenas 7 evoluíram ao óbito no decorrer do experimento e 80% dos sobreviventes manifestaram o CER ao longo dos 2 meses subsequentes. No presente estudo os animais que receberam pilocarpina mas não desenvolveram o SE foram excluídos (n=3). Obteve-se registros eletrofisiológicos em 15 animais (n=22 neurônios).

O grupo de ratos controle consistiu de 23 ratos e foram obtidos registros de 20 ratos (n= 40 neurônios). Para os grupos 1 e 2 tomou-se o cuidado de utilizar uma linhagem que não apresentasse nenhuma propensão genética a crises convulsivas espontâneas. Os grupos 1 e 2 foram usados como controles para o grupo de células humanas (tecido hipocampal humano).

No caso do tecido hipocampal humano obtido nas cirurgias foram estudados 10 hipocampos humanos (n= 30 neurônios).

Os resultados do estudo eletrofisiológico das células de CA1, que serão apresentados à seguir, mostram que as respostas das mesmas são diversificadas. Esta diversidade foi verificada tanto dentro dos próprios grupos como nas respostas ao tratamento com o Ringer 0-Mg⁺². Ao mesmo tempo buscou-se através de um estudo comparativo das combinações entre os grupos (grupo controle x grupo alvo) analisar os diferentes parâmetros eletrofisiológicos.

Desse modo fez-se um estudo das seguinte combinações entre os grupos:

Ratos Normais	X	Ratos Epilépticos
Ratos Normais	X	Tecido Hipocampal Humano
Ratos Epilépticos	X	Tecido Hipocampal Humano

1. ANÁLISE DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DAS CÉLULAS PIRAMIDAIAS DE CA1 POR GRUPO: ANTES DURANTE E DEPOIS DA PERFUSÃO COM O RINGER LIVRE DE Mg^{2+} .

Existem duas correntes que tentam explicar a gênese das crises epilépticas uma defende o chamado “neurônio epiléptico” e a outra , o “agregado neuronal”. Desse modo busca-se a compreensão dos mecanismos que envolvem a epilepsia e para isto nada melhor do que conhecer o comportamento das propriedades celulares mediante a modificação do meio no qual a célula esteja exposta.

1. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA E PROPRIEDADES DO DISPARO:

Para todos os grupos foram aplicadas correntes despolarizantes e hiperpolarizantes conforme as figuras 1 e 2). Considerou-se o estudo da caracterização das respostas eletrofisiológicas das células piramidais de CA1 em diferentes momentos: antes, durante e depois do tratamento do Ringer 0- Mg^{2+} . Através dessa análise buscou-se traçar um padrão de resposta. As diferenças foram consideradas significantes pela análise estatística ANOVA com um $p = < 0,005$.

A tabela 1 (p.121) mostra as propriedades intrínsecas dos neurônios de CA1 estudados do grupo de Ratos Normais. De posse destes dados foi possível a comparação dessas propriedades com aquelas obtidas após a infusão de Ringer sem magnésio. A partir de agora serão relatadas as observações realizadas e suas análises estatísticas.

- RESPOSTA AO 0-Mg²⁺: GRUPO DE HIPOCAMPO DE RATOS NORMAIS.

- I. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MP:

- * **Potencial de Membrana (PM):**

Conforme o protocolo descrito no item material e métodos, foram feitas medições do potencial de membrana dos neurônios de CA1 em diferentes momentos do experimento. A primeira medição foi realizada aos 10 minutos após a sua captura, enquanto eram aplicadas correntes para o cálculo da curva IV, considerou o instante 0 de corrente. A segunda medição foi aos 20 minutos após o início da perfusão com o Ringer sem o Mg²⁺ e a última, 20 minutos após a troca do Ringer 0-Mg²⁺ pelo Ringer normal i.e. com composição normal e portanto com Mg²⁺.

A tabela 1 e o gráfico 1 sintetizam os achados eletrofisiológicos dos neurônios de CA1 estudados (ver também tabela 1-ratos normais- anexo).

Durante a passagem do Ringer sem o Magnésio houve oscilações nos seus potenciais de membrana. Em alguns momentos o valor observado variou de -40 até -90 mV em questão de poucos segundos. Além disso algumas células durante a curva apresentaram alternância nos PMs , algumas células chegaram ao final do experimento com potenciais mais ou menos polarizados, outros se mantiveram constantes nos três momentos. Mas a maioria dos PMs tenderam a ficar mais polarizados até o final do experimento.

Tanto as médias dos potenciais de membrana na tabela 1 quanto gráfico 1 evidenciam que nos três instantes estudados houve uma tendência a uma hiperpolarização destas células. Inicialmente a médias dos PMMAs (média dos potenciais de membrana inicial) medido foi de $-67,524$ mV (**dp: $\pm 7,46$**), na segunda medição, já com o Ringer sem Mg^{2+} , a média dos PMMDs (média dos potenciais de membrana durante a infusão do Ringer sem magnésio) foi de $-70,303$ mV (**dp: $\pm 9,531$**). Na última medição , com Ringer normal, o PMMP (média dos potenciais de membrana após o retorno ao Ringer normal), estava mais polarizado do que em reação as medições anteriores , $-75,225$ mV (**dp: $\pm 15,003$**). Estes resultados foram significantes pela análise de variância com **p= 0,027**.

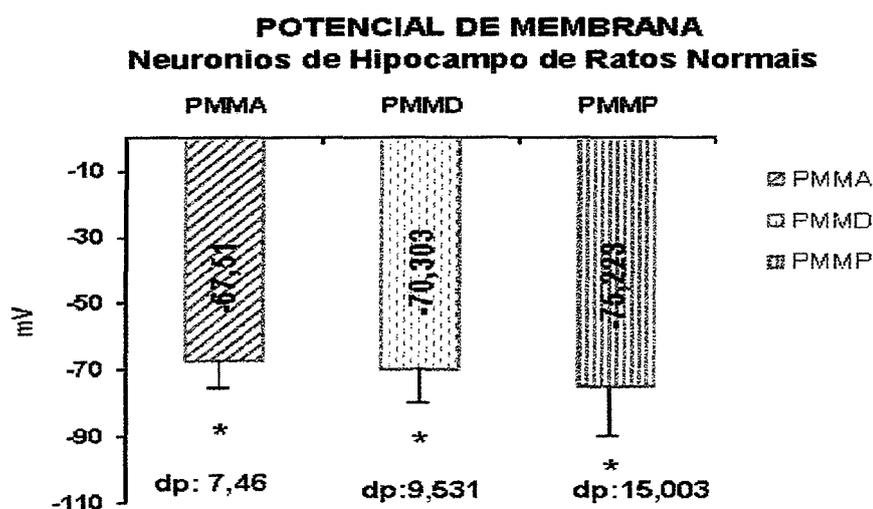


Gráfico 1: Representa as médias do potencial de membrana dos hipocampos de ratos normais estudados em função da voltagem (mV): antes (PMMA), durante (PMMD) e depois (PMMP) do tratamento com o Ringer sem o Mg^{2+} . Notar que existe diferença significativa nos diferentes momentos.

* **Resistência de Entrada (RE):**

Ao aplicarmos correntes hiperpolarizantes de $-0,7$ nA com decréscimo de $-0,1$ nA até o zero de correntes foi possível calcular a RE das células de CA1 nos ratos normais. Novamente, assim como no parâmetro descrito anteriormente, a resistência destas células variou com a modificação do meio de perfusão.

A tabela 1 e gráfico 2 (ver também anexo, tabela 2-ratos normais) demonstraram uma tendência do aumento da RE, mesmo após a reversão para o Ringer normal. A RE não retornou a sua condição do início do experimento. A primeira curva foi feita aos 10 minutos de perfusão com o Ringer normal, cuja a média dos valores de REMA

(Resistência de entrada antes ou basal) ficou em **43.558 MΩ (dp: ± 8,842)**. A segunda curva foi feita aos 20 minutos após o início da perfusão com o Ringer sem o Mg^{2+} , a média de REMD (Resistência de entrada durante a perfusão com 0- Mg^{2+}) calculada foi de **50.808 MΩ (dp: ± 17,069)**. A última curva foi aos 20 minutos após a reversão para o Ringer Normal cuja a média calculada para REMP (Resistência de entrada após o retorno ao Ringer normal) foi de **55.714 MΩ (dp: ± 23,310)**.

A variância das médias das REs calculadas foi significativa ($p= 0,016$). Embora estes valores demonstrem o comportamento da maioria das REs das células, houve exceções. Algumas células apresentaram o comportamento inverso ao invés de aumentar a sua resistência de entrada diminuíram. Outras, apresentaram uma diminuição da RE durante a perfusão (ver anexo: tabela 2 –ratos normais).

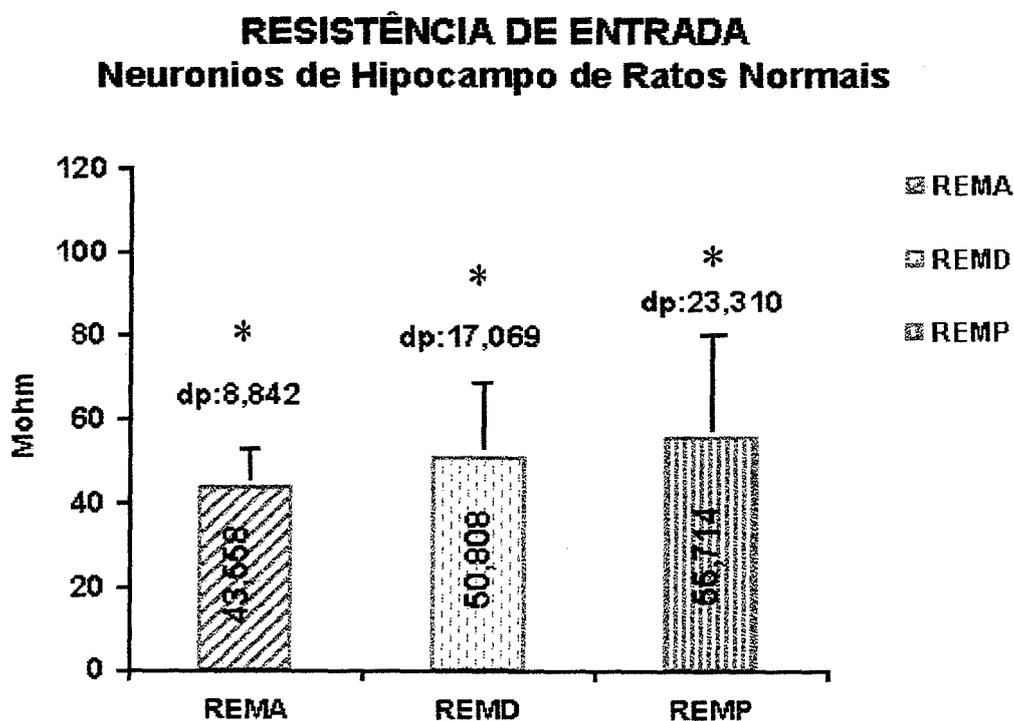


Gráfico 2: Representa as médias da RE dos neurônios de CA1 de ratos Normais nos diferentes momentos em função da resistência (MΩ): antes (REMA); durante (REMD) e

depois (REMP) do tratamento. Notar que existe diferença significativa entre as REs nos diferentes momentos (*).

* **Constante de Tempo (CT):**

No presente trabalho a obtenção e a análise dos dados foi feita no momento em que eram aplicadas correntes negativas de 200 ms de duração (a mesma para a Curva de RE). O cálculo da CT foi realizado (“off line”), e seu valor apresentado na tabela 3 do anexo de ratos normais é resultado da média de três valores que correspondem a aplicação de três correntes negativas (-0,3 → 0,1 nA). A tabela 1 e o gráfico 3, correspondente a esse parâmetro, mostra a média dos valores das constante de tempo nos 3 instantes, e que o valor de CT final é semelhante ao inicial e durante a perfusão com o Ringer sem o Mg^{2+} a constante de tempo teve o seu valor diminuído. A média da CTMA (Constante de tempo antes ou basal) foi de **9,460 ms (dp: ±3,736)**, a CTMD (Constante de tempo durante o Ringer 0- Mg^{2+}), **7,949 ms (dp: ±4,913)** e a CTMP (Constante de tempo após o retorno ao Ringer normal) foi de **10,85 ms (dp: ±3,593)**. Embora ocorra uma tendência a diminuição durante a passagem do Ringer sem o magnésio e um aumento da constante de tempo após a reversão estas observações não se traduziram em diferenças significativas na análise de variância com **p= 0,181**.

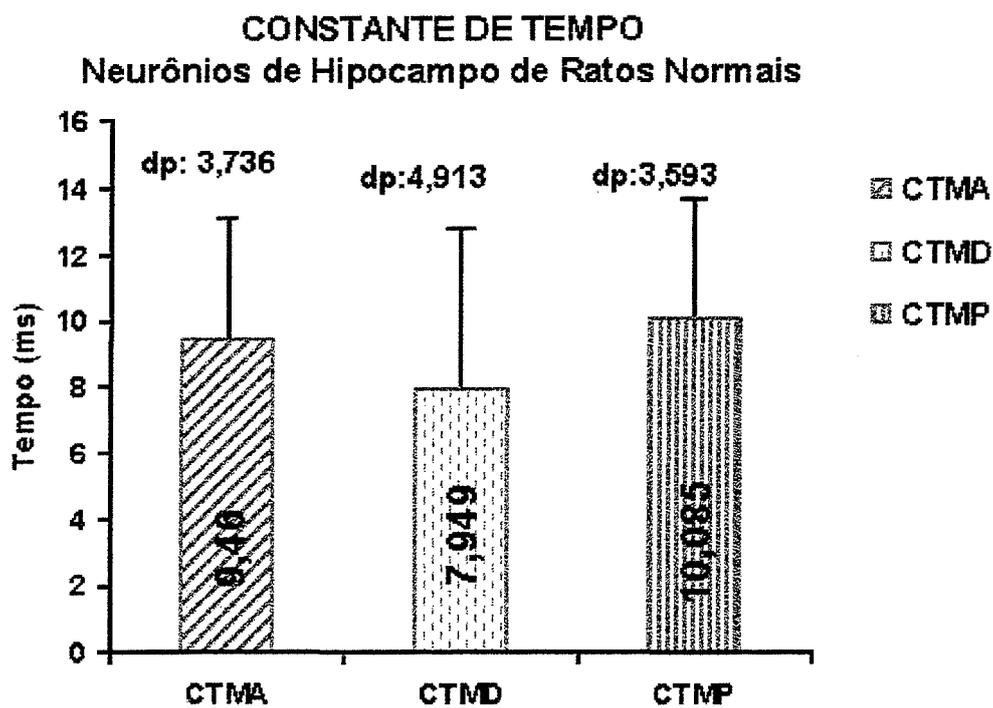


Grafico3-Representa as médias da constante de tempo de CA1 de ratos normais nos diferentes momentos analisados em função do tempo (ms): antes (CTMA), durante (CTMD) e depois do tratamento (CTMP). Não há diferença entre os instantes.

PROPRIEDADES DA MEMBRANA

Correntes Aplicadas

- -0,7 nA
- -0,6 nA
- -0,5 nA
- -0,4 nA
- -0,3 nA
- -0,2 nA
- -0,1 nA
- 0
- 0,1 nA
- 0,2 nA
- 0,3* nA

* primeiro PA

PM = -67 mV

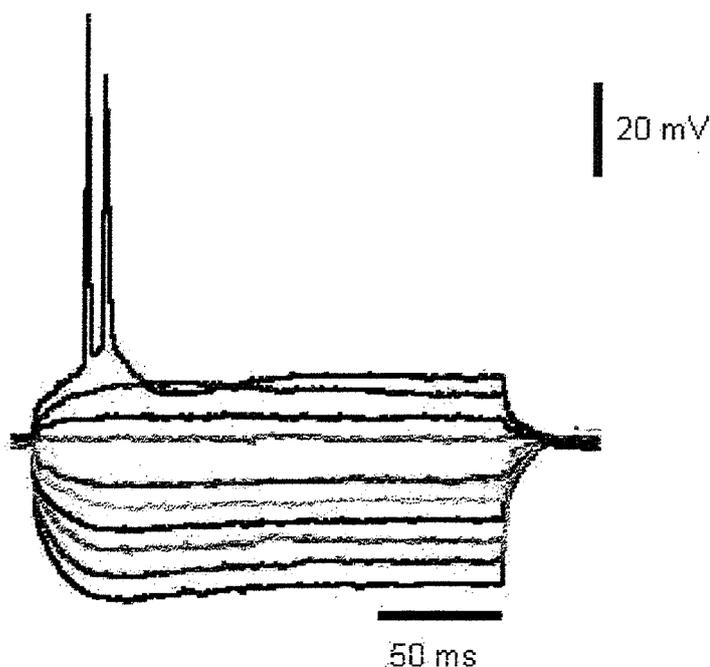


Fig.1. Propriedades da membrana de um neurônio de Rato normal, antes do tratamento com o Ringer sem o Mg^{2+} : As correntes injetadas para a obtenção da curva IV, serviram também para o estudo de tanto as propriedades passivas mas também as propriedades do disparo. São mostradas as correntes injetadas e a resposta do neurônio mediante a mesma. A partir da aplicação de correntes positivas pôde-se avaliar as propriedades do disparo, neste caso o neurônio disparou um duplo PA

PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA: RESISTÊNCIA DE ENTRADA E POTENCIA DE MEMBRANA

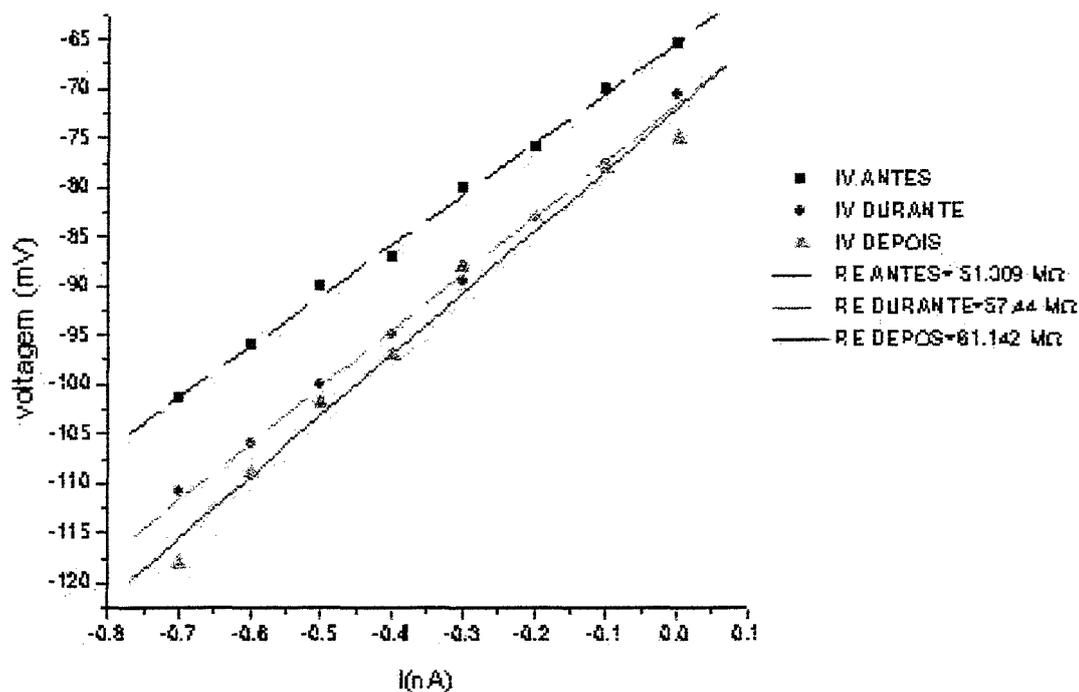


Fig. 2. A figura mostra as curvas IV do mesmo neurônio da figura 1 de um rato normal antes, durante e depois da perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺. Cada símbolo do gráfico corresponde ao instante de injeção de corrente (nA) e a sua voltagem correspondente (mV). As linhas representam a RE (MΩ). O padrão de resposta deste neurônio corresponde ao comportamento observado da maioria das células estudadas, onde nitidamente o tratamento provocou um aumento da resistência mesmo após a reversão com o Ringer normal..

II. PROPRIEDADES DO DISPARO:

Através da aplicação de correntes despolarizantes até o disparo do 1º potencial de ação permitiu que se avaliasse diversos parâmetros desse disparo.

* Corrente Injetada para o primeiro Potencial de Ação (CIPA):

Os ratos normais apresentaram diferenças na indução do disparo, principalmente a aplicação de correntes despolarizantes durante a perfusão de Ringer sem o Magnésio. Correntes que até então eram sublimiares passaram a disparar potenciais de ação.

A tabela 1 e o gráfico 4 apresentam as médias das correntes necessárias para o disparo dos potenciais de ação. Observou-se que de modo geral as correntes que promovem o primeiro PA durante a perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺ eram bem menores, que no instante anterior e posterior ao tratamento. A corrente necessária para o disparo no instante posterior ao tratamento, por sua vez demonstrou ser ainda ser maior do que a observada antes do tratamento. Estas diferenças foram altamente significativas pela análise de variância ANOVA (p= 0,0002). As medias calculadas foram **0,35 nA (dp:±0,247) nA**, para CIPAA (corrente injetada antes ou basal obtida com Ringer normal), **0,09 nA (dp:±0,376)** para CIPAD (corrente injetada durante a perfusão com Ringer 0-Mg²⁺) e **0,44 nA (dp:±0,19) nA** para CIPAP (corrente injetada após o retorno ao Ringer normal).

CORRENTES INJETADAS PARA O 1º POTENCIAL DE AÇÃO
Neurônios de Hipocampo de Ratos Normais

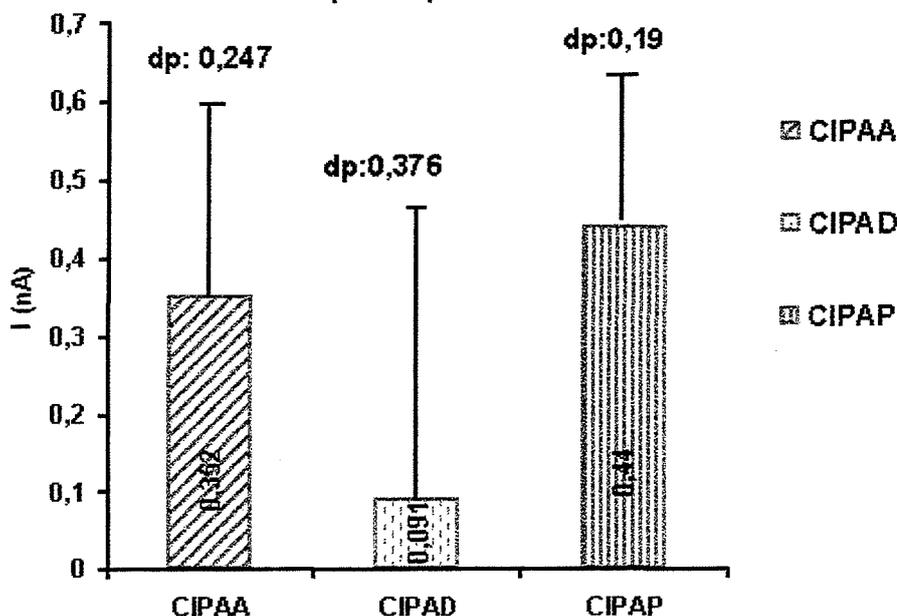


Gráfico 4 : Representa as médias das correntes injetadas dos neurônios de CA1 de ratos normais: antes (CIPAA), durante a perfusão do Ringer livre de Mg^{2+} (CIPAD) e depois do tratamento, já com o Ringer normal , (CIPAP), Notar a diferença entre as médias, onde o (*) representa o ponta de maior variância das mesmas.

* **Limiar de Disparo (LAM):**

Ao contrario do parâmetro anterior ,em que houve significância no estudo, não houve variação nos valores do limiar pela análise da variância ANOVA ($p= 0,358$)

Na tabela 1e gráfico 5 pode-se observar o comportamento deste parâmetro, onde a média antes do tratamento foi de - 54,429 mV (dp:± 9,955) mV, durante -54,608 mV (dp: ±10,014) mV e após -49,319 (± 9,014) mV (Ver também anexo –ratos normais- tabela 5).

LIMIAR DOS POTENCIAIS DE AÇÃO Neurônios de Hipocampo de Ratos Normais

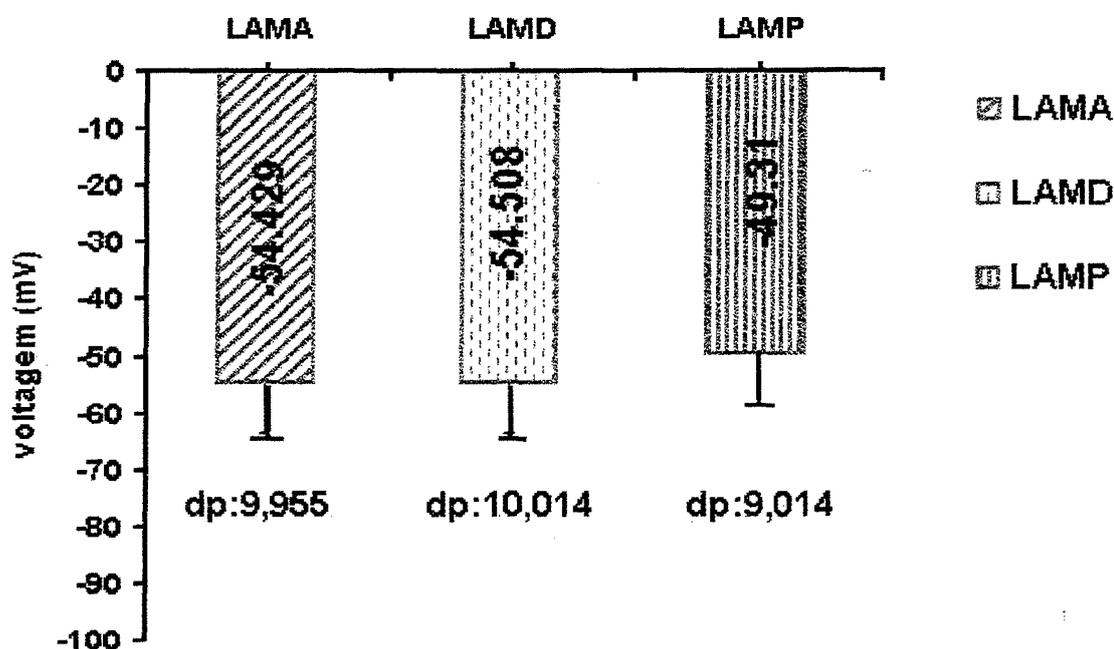


Gráfico 5: Representa as médias do limiar de disparo dos neurônios Hipocampais de CA1 de ratos normais nos diferentes instantes medidos: antes (LAMA), durante (LAMD) e depois (LAMP) da perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺. Notar que não há diferença significativa entre as médias.

* **Amplitude do PA (AM):**

A amplitude foi calculada da distância entre o limiar e o pico máximo do PA. Durante o tratamento observou-se um aumento da amplitude dos PAs, mas isto não se traduziu como uma grande diferença nos três momentos, a média deste parâmetro antes do tratamento foi de **82,515 mV (dp: ± 9,039)**. A figura 1 mostra um neurônio de rato normal que foi um dos poucos observados a gerar um potencial de ação com menos de 75 mV de amplitude, além de apresentar PA “duplo”. Algumas células dispararam descargas em

salva e estas de um modo geral apresentaram uma amplitude menor independentemente do tratamento.

A tabela 1 e o gráfico 6 (ver também no Anexo) demonstraram que durante e depois do tratamento a amplitude sofreu um ligeiro aumento e depois um decaimento dos mesmos. Os valores expressados nas médias durante e depois do tratamento foram respectivamente **85,083 mV (dp:± 9,912)** e **84,956 mV (dp:± 10,882)**, denotam que estas diferenças não foram significativas segundo a análise de Variância ($p= 0,482$).

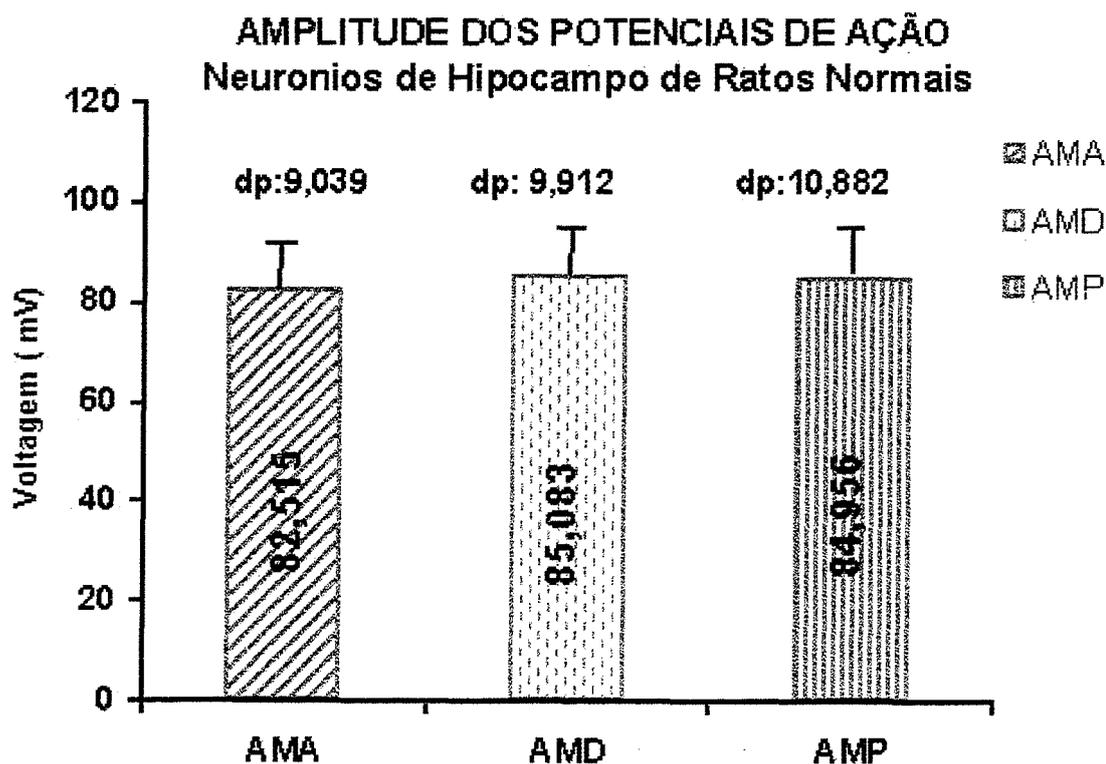


Gráfico 6: Representa a média da amplitude dos neurônios de CA1 de ratos normais nos diferentes momentos em função da voltagem. Notar que o valor das mesmas ficaram próximas, embora ocorra um ligeiro aumento durante a passagem do Ringer 0-Mg²⁺. Não houve diferença significativa entre as condições do tratamento.

* **Duração do PA (DPM):**

A duração do potencial de ação foi medida no primeiro disparo do neurônio. Antes do tratamento algumas células produziram potenciais com duração mais longas, e neste caso foram células que apresentaram como primeiro disparo descargas em salva com duração de 5 ms (n=5). Outras disparavam potenciais duplos com mais de 3 ms (n=4), mas a grande maioria dos neurônios dispararam potenciais simples com no máximo 3 ms de duração (n=31).

A tabela 1 e o gráfico 7 expressam o comportamento da maioria dos neurônios, com disparos de curta duração independente do momento observado. Todas as médias tiveram um valor muito próximo, média de DPMA (média da duração dos PA inicial) foi de **-2,89 ms (dp:± 0,916)**, a média de DPMD (média da duração dos PA durante a infusão de Ringer sem magnésio) foi de **-2,86 ms (dp:± 0,814)** e DPMP (média da duração dos PA após o retorno ao Ringer normal) foi de **-2,917 ms (dp:± 0,797)**. A análise estatística realizada não evidenciou diferença significativa (**p= 0,975**) (ver também anexo)

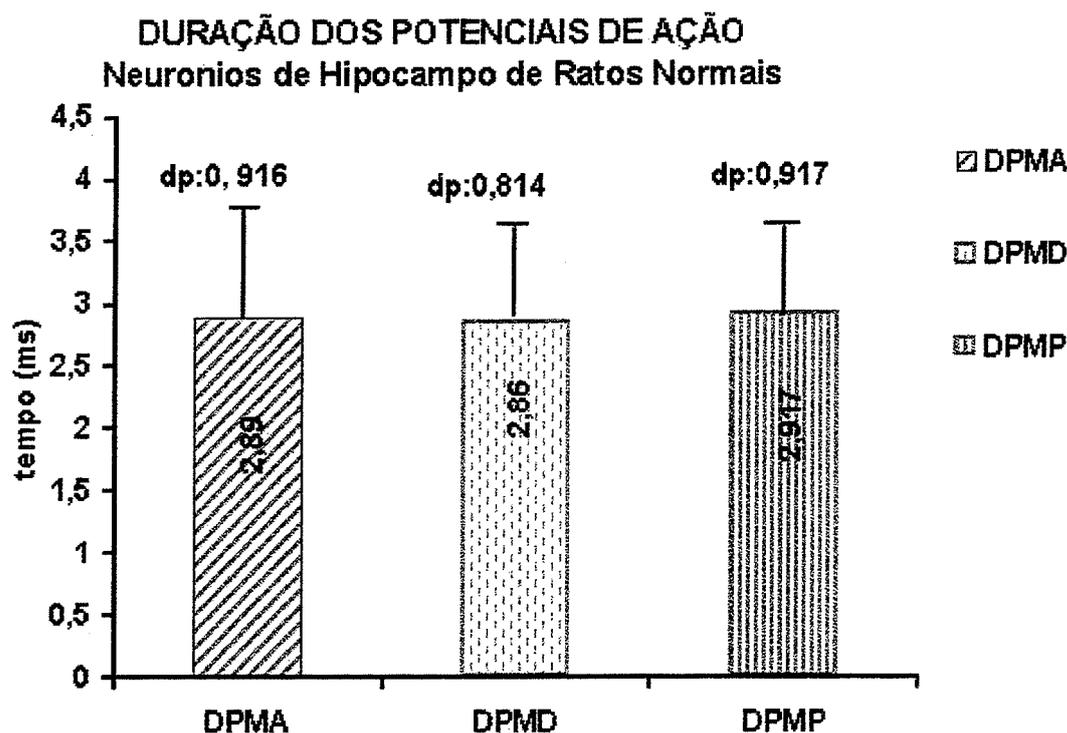


Gráfico 7: Representa a média da duração dos PAs de ratos normais em função do tempo (ms) de ratos normais. Não houve diferença significativa entre as médias (ver também tabela 1).

*** Potencial de Membrana ao final de PA, valor máximo do pós-potencial de hiperpolarização rápida (PPH):**

O PPH foi determinado em um número menor de células, pois nem todos os neurônios apresentaram esta característica. A análise individual dos neurônios estudados na sua maioria expressavam um caráter um pouco mais negativo que o limiar de disparo, não importando o momento (antes, durante e depois da infusão do Ringer 0-Mg^{2+}) (ver anexo- ratos normais), outras apresentaram valores iguais aos observados no limiar, também não importando o momento.

Não foram observadas diferenças entre as médias desses parâmetros (análise da variância) e não houve diferença nas médias obtidas nos diferentes momentos em que foram avaliados os PPHs ($p: 0,856$). As médias ficaram em $56,837 \text{ mV}$ ($dp:\pm 9,541$), antes da perfusão com o Ringer sem o Mg^{2+} , $-56,35 \text{ mV}$ ($dp:\pm 9,495$) e $55,44 \text{ mV}$ ($dp:\pm 9,173$) após a reversão

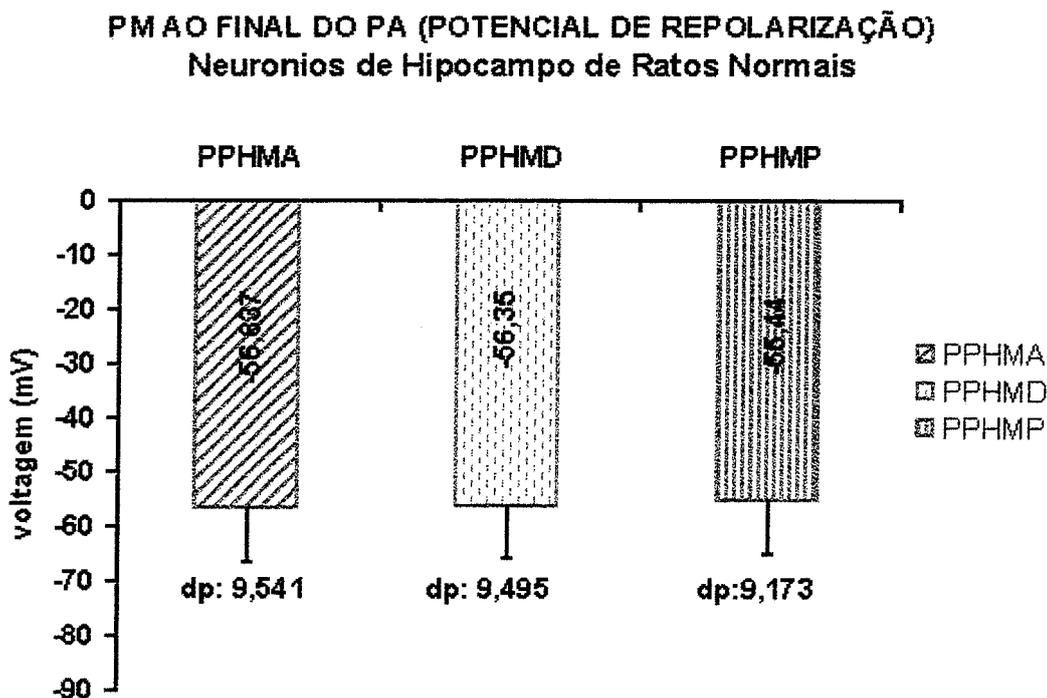


Gráfico 8: Representa a média dos PPHs em função da voltagem de ratos normais. Notar que não há diferenças significativas entre as médias de antes (PPHMA) e durante (PPHMD) a infusão do Ringer 0- Mg^{2+} e depois (PPHMP) do retorno ao Ringer normal.

Tabela 1: PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS AVALIADOS- RATOS NORMAIS

	PM	RE	CT	CIPA	LAMA	AM	DPM	PPH	
ANTES	- 67,514	43,558	9,46	0,35	-54,429	82,515	2,89	-56,837	
	±7,46)	±8,842	±3,736	±0,247	±9,955	±9,039	±0,916	±9,541	
	(40)	(40)	(40)	(40)	(40)	(40)	(40)	(30)	
DURANTE	-70,303	50,808	7,749	0,09	-54,608	85,08	2,86	-56,35	
	±9,531	±17,069	±4,913	±0,376	±10,014	±9,912	±0,814	±9,495	
	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(15)	
DEPOIS	-75,223	55,714	10,085	0,44	-49,319	84,956	2,917	-55,44	
	±15,003	±23,310	±3,593	±0,19	±9,014	±10,882	±0,797	±9,173	
	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(10)	
ANOVA one way P=0,05	F:	3,762	4,327	1,740	9,001	1,037	0,734	0,024	0,155
	Sig:	0,027*	0,016*	0,181	0,0004*	0,358	0,482	0,975	0,856

PM. Potencial de membrana RE. Resistência de Entrada CT. Constante de Tempo LAM. Limiar de Disparo
 CIPA- Corrente Injetada para o primeiro PA. AM. Amplitude do Potencial de Ação DPM. Duração do Potencial de Ação
 de Ação PPH. Potencial de membrana ao final do PA (potencial de Repolarização)

- **RESPOSTA AO RINGER 0-Mg²⁺: GRUPO DE HIPOCAMPO DE RATOS EPILÉPTICOS:**

O mesmo tipo de análise foi feita para os hipocampos de ratos epiléticos e serão apresentadas a seguir. A tabela 2 mostra as propriedades intrínsecas neuronais do grupo, nos diferentes momentos avaliados. Seguindo a mesma linha do grupo de ratos normais serão apresentados os resultados obtidos.

I. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MP:

- * **Potencial de Membrana (PM):**

A metodologia usada para os ratos epiléticos foi a mesma aplicada aos ratos normais. A tabela 2 e o gráfico 9 resumem os resultados dos registros eletrofisiológicos dos neurônios de CA1 estudados (ver também tabela 9-ratos epiléticos- anexo).

A passagem do Ringer sem o Magnésio permitiu que também se observassem oscilações nos seus potenciais de membrana. A maioria deles chegaram ao final do experimento com potenciais mais ou menos polarizados, outros se mantiveram constantes nos três momentos. Mas a maioria dos PMs tenderam a ficar mais polarizados até o final do experimento.

As médias dos potenciais de membrana na tabela 2 e gráfico 9 evidenciam que nos três instantes estudados houve uma tendência a uma hiperpolarização destes neurônios. Inicialmente a médias dos PMMAs (média dos potenciais de membrana inicial) medido foi de **-69,309 mV (dp: ±4,129) mV**, na segunda medição, a média dos PMMDs (média

dos potenciais de membrana durante a infusão do Ringer sem magnésio) foi de **-72,094 mV (dp: 9,248) mV**. Na última medição, o PMMP (média dos potenciais de membrana após o retorno ao Ringer normal), estava mais polarizado do que em reação as medições anteriores, **-78,23 mV (dp: 14,761) mV**. A análise da variância evidenciou significância nos três momentos medidos ($p= 0,0281$).

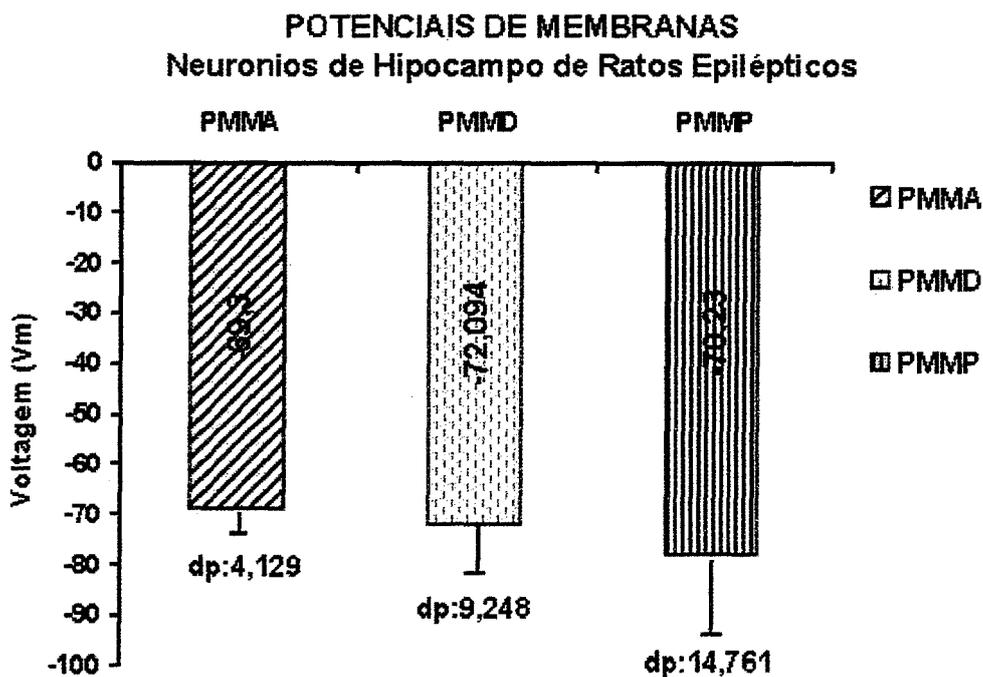


Gráfico9: Representa as médias do potencial de membrana do hipocampo de ratos epilépticos estudados: antes (PMMA), durante (PMMD) e depois (PMMP) do tratamento com o Ringer sem o Mg^{2+} . Existem diferenças significativas antes e depois do tratamento.

* **Resistência de Entrada (RE):**

Uma característica interessante, observada nos ratos epiléticos, foi que ao contrario do esperado, pela modificação do meio de perfusão não houve variação significativa da resistência destes neurônios .

A tabela 2 e gráfico 10 (ver também anexo, tabela 10) demonstraram uma tendência do aumento da RE, mesmo após a reversão para o Ringer normal, não retornando a sua condição do inicial. A média dos valores de REMA (Resistência de entrada antes ou basal) ficou em **49.531 MΩ(dp: ± 16,456)**. Na segunda curva a media de REMD (Resistência de entrada durante a perfusão com 0-Mg²⁺) calculada foi de **57,983 MΩ(dp: ± 23,753)**. A última curva, após a reversão, a média calculada para REMP (Resistência de entrada após o retorno ao Ringer normal) foi de **60,156 MΩ(dp: ± 31,095)**. A variância das médias das REs calculadas não foi significativa (**p= 0,344**). Alguns neurônios apresentaram valores acima de 100 MΩ de resistência de entrada: antes do tratamento (n=1), durante (n=2) e após (n=3). Dentre elas uma apresentou desde o inicio uma resistência acima de 100 MΩ, mas que durante a perfusão aumentou para 111 MΩ e que após a reversão retornou a um valor próximo do inicial (104 MΩ)

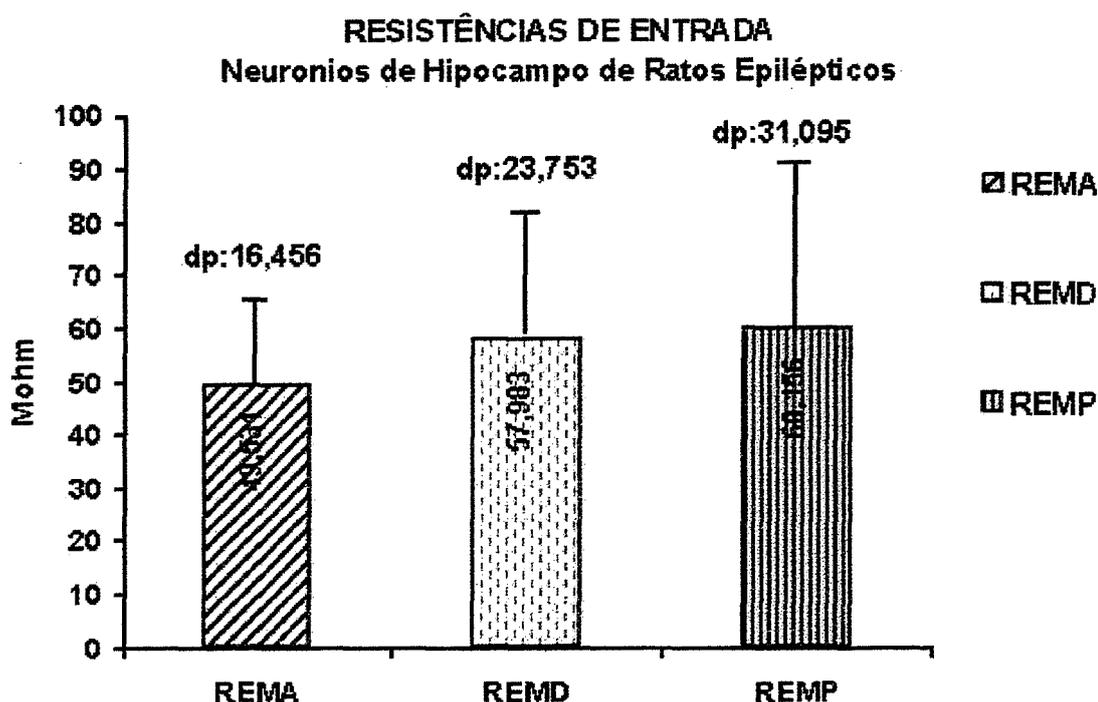


Gráfico 10: Representa as médias da RE de neurônios de CA1 de ratos epilépticos nos diferentes momentos: antes (REMA); durante (REMD) e depois (REMP) do tratamento. Não existe diferença significativa entre as REs nos diferentes momentos .

* **Constante de Tempo (CT):**

A tabela 2 e o gráfico 11 (ver também tabela 11 do anexo), mostram as médias dos valores das constante de tempo nos 3 instantes. Os valores dessas médias ficaram muito próximas não havendo praticamente variação alguma. A média da CTMA (Constante de tempo antes ou basal) foi de **10,209 ms (dp: $\pm 2,934$) ms**; a CTMD (Constante de tempo durante o Ringer 0-Mg²⁺), **8,397 ms (dp: $\pm 5,469$) ms** e a CTMP (Constante de tempo após o retorno ao Ringer normal) foi de **9,841 ms (dp: $\pm 3,593$) ms**. Ocorreu uma leve

tendência de diminuição do valor da CT, mas não se traduz em diferenças estatística na análise de variância ($p=0,384$).

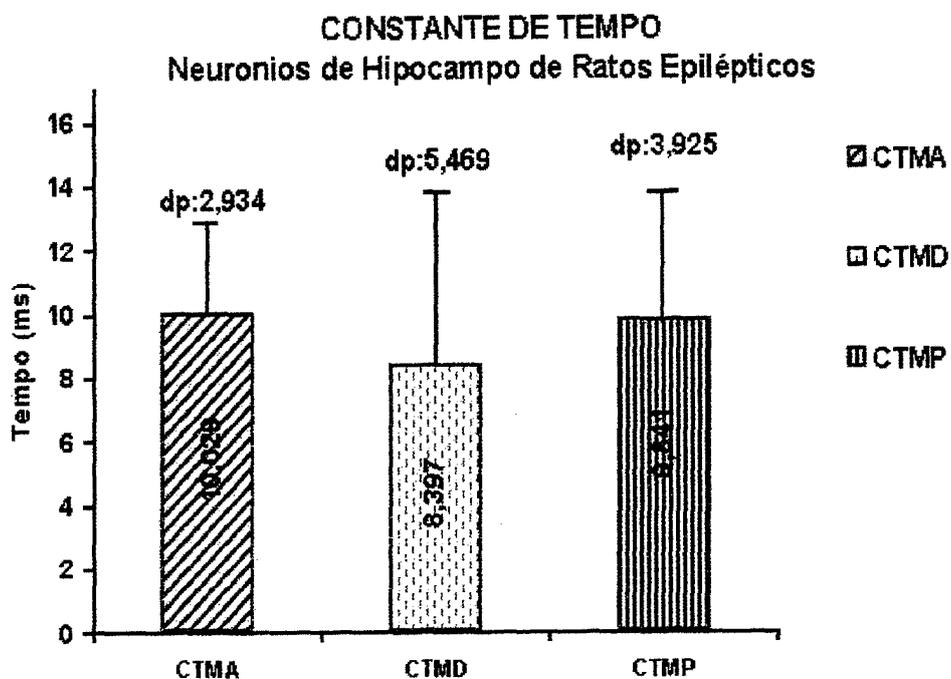


Gráfico 11: Representa as médias da constante de tempo de CA1 de ratos Epilépticos nos diferentes momentos analisados: antes (CTMA), durante (CTMD) e depois da perfusão (CTMP) com Ringer 0-Mg²⁺. Não há diferença significativa entre os 3 momentos do estudo.

II. PROPRIEDADES DO DISPARO:

Dos 15 neurônios estudados, em que foi feito todo o procedimento experimental, 7 apresentaram com a aplicação da corrente potenciais únicos por estímulo (200 ms de duração). Destes 4 durante a passagem do 0-Mg²⁺ passaram a disparar potenciais simples porém mais do que 1 disparo por estímulo. E após a reversão para o Ringer normal, dois neurônios continuaram com mais do que um disparo. Os demais neurônios (n=8) mesmo com o Ringer normal apresentaram desde o início mais do que um disparo.

* Corrente injetada para o primeiro PA (CIPA):

Os ratos epiléticos apresentaram diferenças na resposta de indução do disparo, principalmente na aplicação de correntes despolarizantes durante a perfusão de Ringer sem o Magnésio. Lembrando que correntes que eram até então eram sublimiares passaram a disparar potenciais de ação.

Na tabela 2 e o gráfico 12 (ver tabela 12-anexo) são mostradas as médias das correntes necessárias para o disparo dos potenciais de ação. De um modo geral as correntes que promoveram o primeiro PA durante a perfusão com o Ringer sem Mg²⁺ eram bem inferiores as utilizadas nos instantes anterior e posterior ao tratamento.

A corrente necessária para o disparo no instante posterior ao tratamento, por sua vez demonstrou ser ainda ser maior do que a observada antes do tratamento. Estas diferenças foram altamente significativas pela análise de variância (p= 0,0002). As médias calculadas

oram 0,15 nA (dp: $\pm 0,426$), para CIPAA, 0,029 nA (dp: $\pm 0,325$) para CIPAD e 0,393 nA (dp: $\pm 0,157$) para CIPAP.

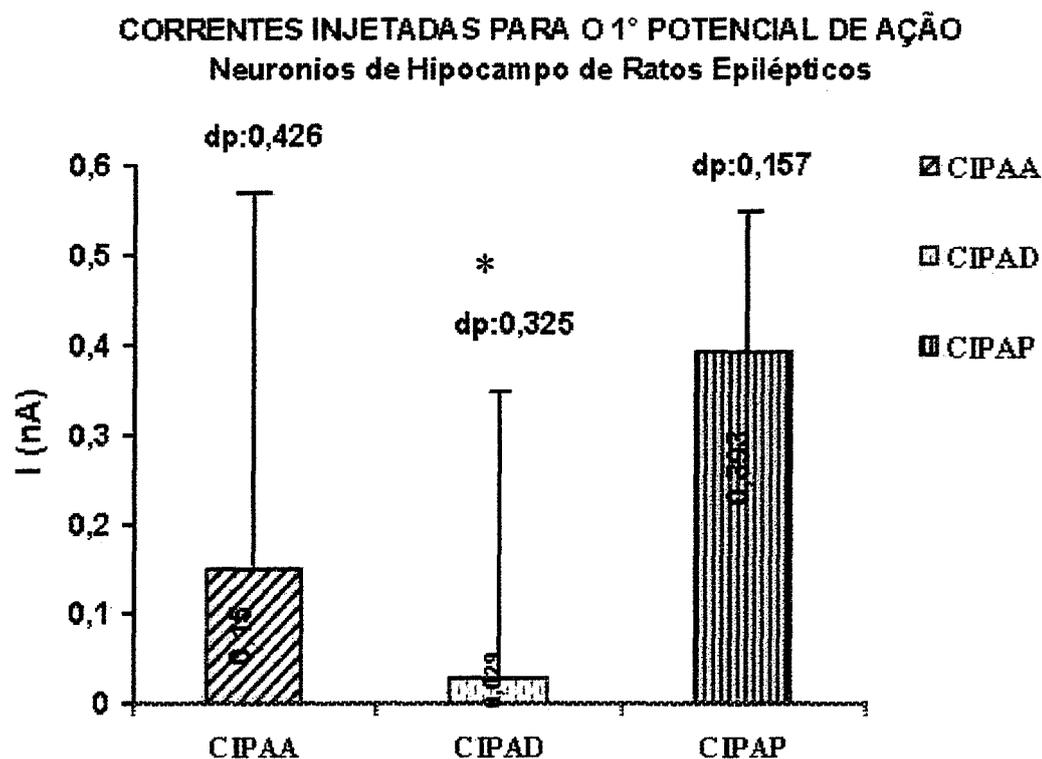


Gráfico 12: Representa as médias das correntes injetadas dos neurônios de CA1 de ratos epilépticos: antes (CIPAA), durante a perfusão do Ringer livre de Mg^{2+} (CIPAD) e depois do tratamento, já com o Ringer normal, (CIPAP), Notar a diferença significativa entre as médias (*) (ver tabela 2)

* **Limiar de Disparo (LAM):**

O fato de desta análise pertencer a um grupo de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina associado ao tratamento com o Ringer 0-Mg²⁺ os valores do limiar não sofreram modificações para um limiar mais negativo, ao contrário, os valores se mantiveram constantes. Este estudo não apresentou significância no estudo, pela análise da variância ANOVA ($p= 0,105$)

Na tabela 2 e gráfico 13 são mostrados o comportamento celular , onde a média antes do tratamento foi de $-57,025$ mV (dp: $\pm 9,955$) , durante $-55,576$ mV (dp: $\pm 10,499$) e após $-49,84$ mV (dp: $\pm 13,835$) (Ver também anexo — tabela 13).

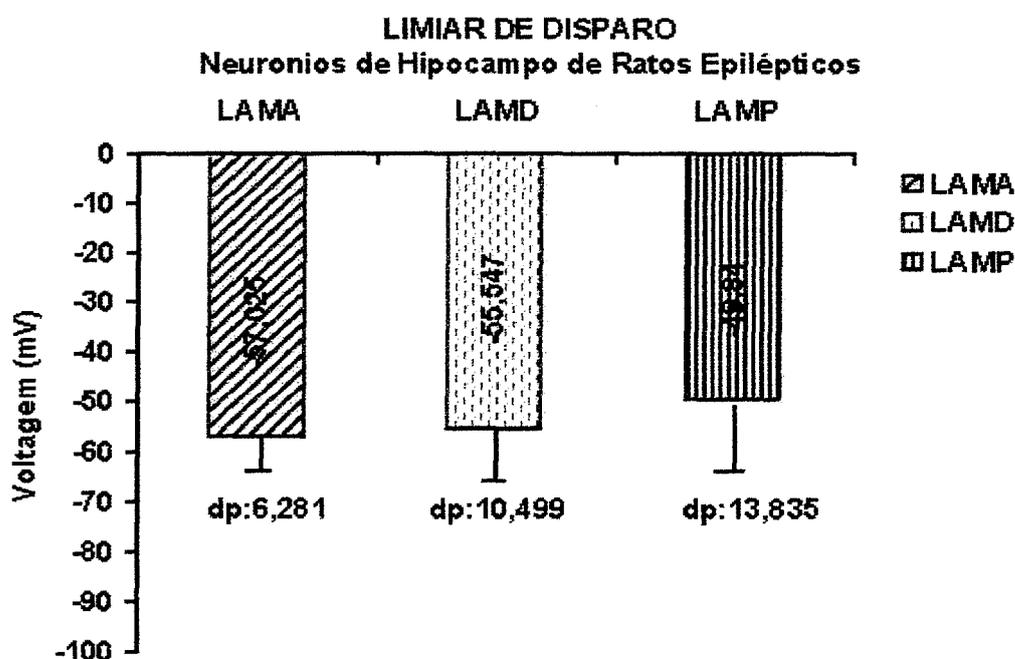


Gráfico 13: Representa as médias do limiar de disparo dos neurônios Hipocampais de CA1 de ratos epilépticos nos diferentes instantes medidos: antes (LAMA), durante

(LAMD) e depois (LAMP) da perfusão com o Ringer livre de Mg^{2+} . Notar que não há diferença significativa entre as médias (ver tabela 2).

* **Amplitude do PA (AM):**

Foram observadas nos ratos epiléticos um aumento significativo da amplitude do potencial de ação, e que estes foram quase na sua totalidade potenciais simples. Esta característica será abordada posteriormente quando caracterizarmos as diferentes morfologias destes disparos.

Inicialmente a média da amplitude foi calculada em **78,863 mV (dp: ±9,852)**. Durante a infusão com o Ringer 0- Mg^{2+} fez com que a média aumentasse para **87,294 (dp: ±9,86)** e ao final da reversão houve uma pequena queda desses valores, para **86,333 mV (dp: ±7,138)**. Durante a perfusão com o Ringer 0- Mg^{2+} algumas células chegaram ao mínimo de 100 mV de amplitude (n=4)

A análise estatística pelo método ANOVA mostrou significância (p=0,01).

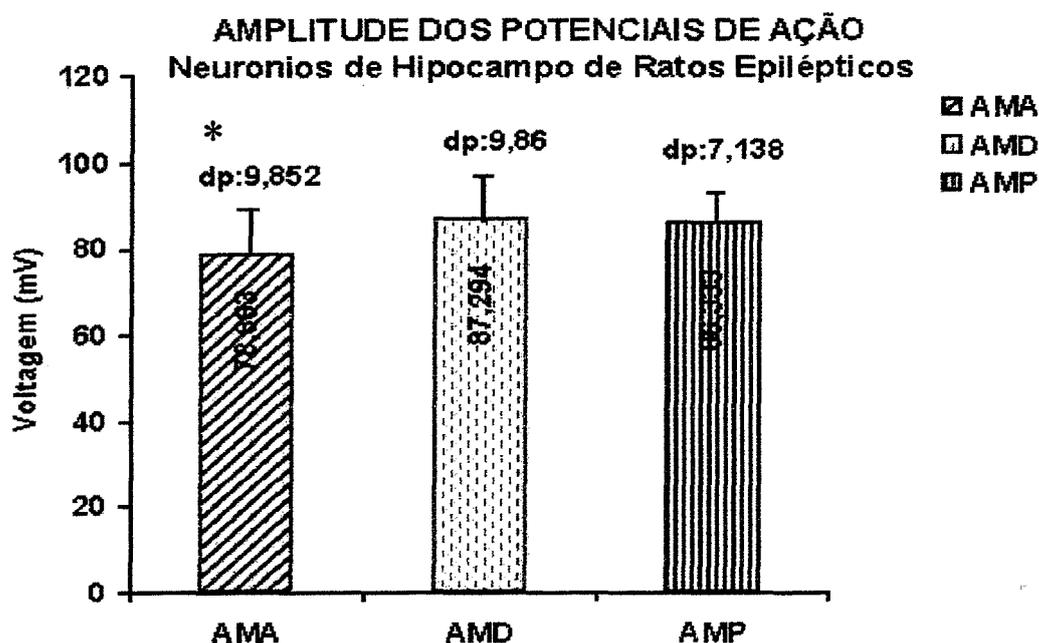


Gráfico 14: representa a média da amplitude nos diferentes momentos em função da voltagem de ratos epilépticos. A medida que transcorria o experimento, a amplitude aumentou com a infusão com o Ringer 0-Mg²⁺. Após a reversão houve uma discreta diminuição da amplitude. Foram observadas diferença significativas durante as trocas dos Ringers (*). (ver tabela 2)

*** Duração do PA (DUPM):**

De um modo geral a duração dos PAs dos neurônios de ratos epilépticos tiveram curta duração, e esta observação se refletiu na média destes parâmetro. Na sua condução inicial a média calculada foi de **2,86 ms (dp: ±0,823)**, durante **2,841 ms (dp: ±0,959)** e

depois **2,793 ms (dp: $\pm 0,783$)**. E esta diferença não foi significativa segundo a análise ANOVA, (**p=0,966**).

O resumo destes valores são observados tanto na tabela 2 quanto o gráfico 15 (ver também tabela 15 –anexo).

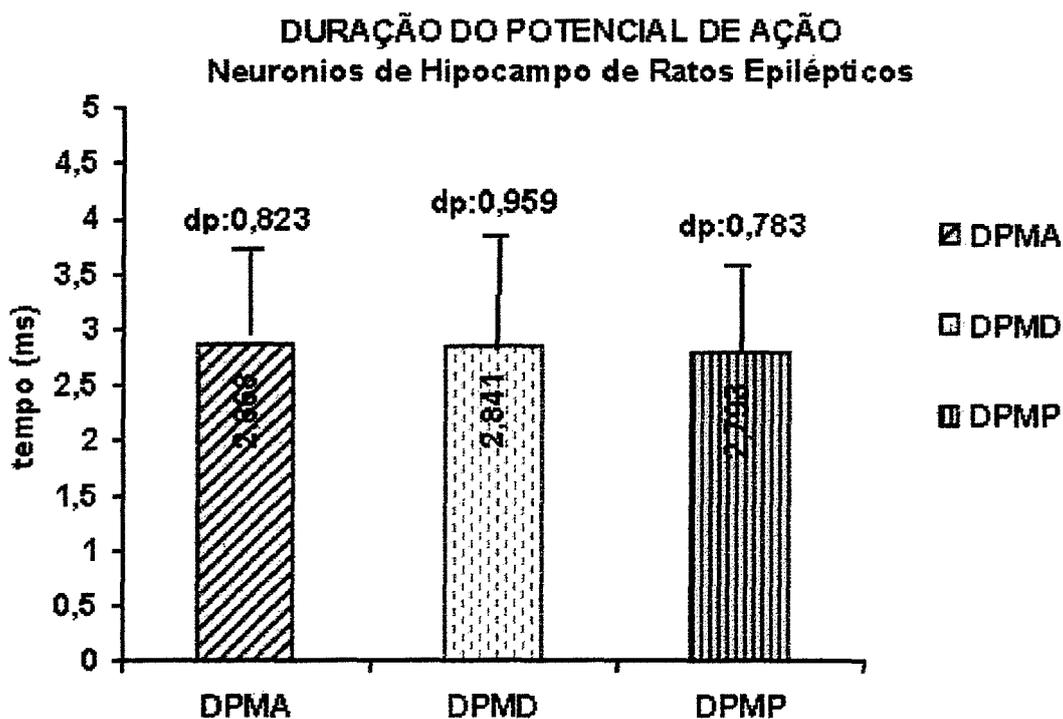


Gráfico 15: Neste gráfico são apresentadas as médias das durações dos PAs de ratos epilépticos em função do tempo (ms). Não houve diferença significativa entre as médias (ver também tabela 2).

* **Potencial de Membrana ao Final do Potencial de Ação (Potencial de Repolarização) (PPH):**

Não foi possível detectar alterações significativas no pós-potencial hiperpolarizantes. Além disso nem todas os neurônios foram medidas o seu valor. A tabela 2 e o gráfico 16 resumem os dados obtidos. A média antes do tratamento foi de $-53,181 \text{ mV}$ (dp: $\pm 7,39$), durante $-49,197 \text{ mV}$ (dp: $\pm 8,288$) e depois $-55,409 \text{ mV}$ (dp: $\pm 9,775$). Estas médias não foram significativamente diferentes ($p: 0,805$)(ver também anexo, gráfico 16).

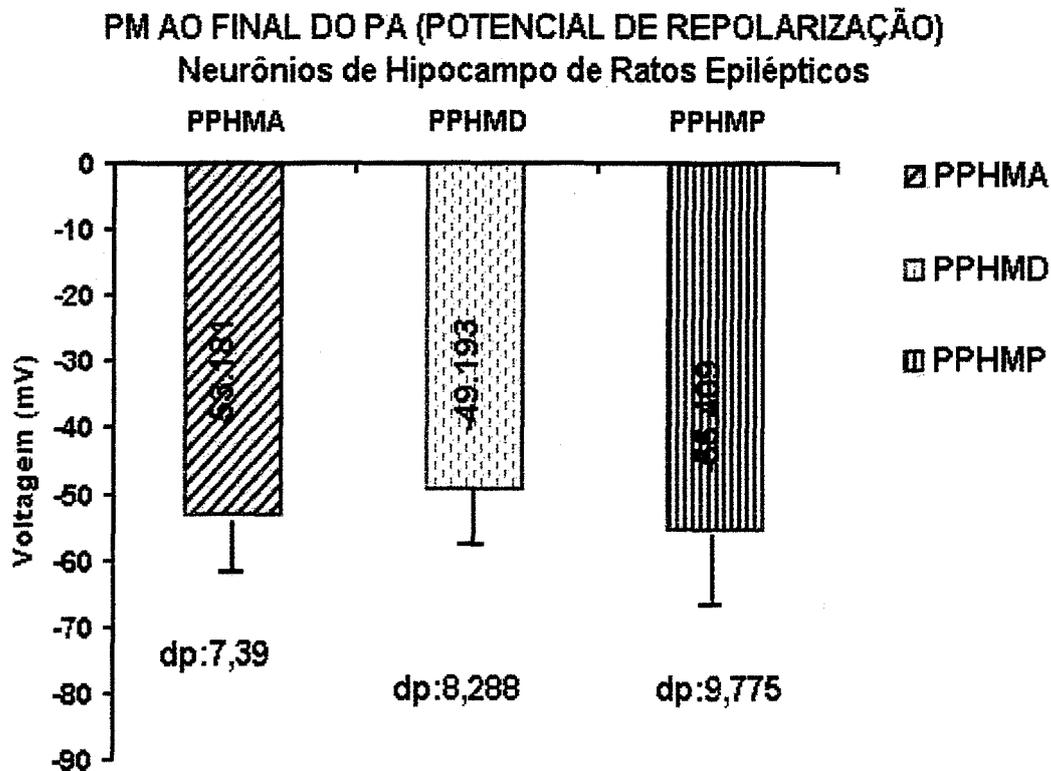


Gráfico 16: Representa a média dos PPHs de ratos epiléticos em função da voltagem.

Notar que não há diferenças significativas entre as médias (ver também tabela 2).

Tabela 2: PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS AVALIADOS - RATOS EPILÉPTICOS:

	PM	RE	CT	CIPA	LAMA	AM	DPM	PPH	
ANTES	-69,309	49,531	10,209	0,15	-57,025	78,863	2,868	-53,181	
	±4,129	±16,456	±2,934	±0,426	±6,281	±9,852	±0,823	±7,390	
	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(22)	(20)	
DURANTE	-72,094	57,983	8,397	0,029	-55,576	87,294	2,841	-49,84	
	±9,248	±23,753	±5,469	±0,325	±10,499	±9,86	±0,959	±8.288	
	(17)	(17)	(17)	(17)	(17)	(17)	(17)	(16)	
DEPOIS	-78,23	60,156	9,841	0,393	-49,84	86,333	2,793	-55,409	
	±14,761	±31,095	±3,925	±0,157	±13,835	±7.138	±0,783	±9,775	
	(15)	(15)	(15)	(15)	(15)	(15)	(15)	(11)	
ANOVA one way P=0,05	F:	3,831	1,08	0,974	4,734	2,347	4,958	0,034	2,216
	Sig:	0,0281*	0,344	0,384	0,013*	0,105	0,0107*	0,966	0,805

PM. Potencial de membrana RE. Resistência de Entrada CT. Constante de Tempo

CIPA- Corrente Injetada para o 1. PA. LAM. Limiar de Disparo AM. Amplitude do Potencial de Ação

DPM. Duração do Potencial de Ação PPH. Potencial de membrana ao final do PA (potencial de Repolarização)

- **RESPOSTA AO RINGER 0-Mg²⁺ NO GRUPO DE TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO**

Assim como nos grupos anteriores foram avaliados nos neurônios de CA1 do tecido hipocampal humano as respostas eletrofisiológicas em diferentes momentos: antes, durante e depois da perfusão com Ringer 0-Mg²⁺. As diferenças registradas e analisadas foram consideradas significativas pela análise estatística ANOVA para um p: < 0,005.

A tabela 3 mostra as propriedades intrínsecas dos neurônios de CA1 estudados no grupo “tecido hipocampal humano”. Neste estudo não encontramos diferenças significativas nessas propriedades quando estudadas antes, durante e depois a perfusão com Ringer 0-Mg²⁺.

I. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA:

- * **Potencial de Membrana (PM) dos neurônios hipocampais humanos:**

A primeira, medição do PM foi realizada aos 10 minutos após a sua captura, enquanto eram aplicadas correntes que serviram para a realização da curva IV, e o PM foi obtido no momento em que não era aplicada corrente alguma. A segunda medição foi aos 20 minutos após o início da perfusão com o Ringer sem 0-Mg²⁺ e a última, 20 minutos após a troca do Ringer 0-Mg²⁺ pelo Normal i.e. com composição normal e portanto com Mg²⁺.

A tabela 3 apresenta a análise estatística da variação dos potenciais de membrana nos diferentes instantes. Os resultados contidos não evidenciaram diferenças significativas (ANOVA, $p=0,981$).

A média dos potenciais de membrana antes do tratamento foi de $-68,29\text{mV}$ ($dp:\pm 8,975$) ao mesmo tempo durante a coleta verificou-se que alguns neurônios ($n=8$) apresentaram potenciais mais negativos com Ringer normal. Foi o caso do paciente JOS que apresentou dois neurônios com -90 mV .

Em experimentos em que foram possíveis medir os potenciais nos 3 momentos (antes, durante e depois), alguns neurônios apresentaram, além de um potencial inicial mais negativo, uma tendência a ficarem cada vez mais hiperpolarizadas. Um exemplo deste comportamento foi o neurônio nº1 (N1) do paciente JO, com um neurônio que inicialmente apresentou um PM de -83 mV chegando a -94 mV durante o tratamento e ao final de sua reversão para o Ringer normal a -110 mV . De um modo geral os potenciais de membrana durante a após não apresentaram diferenças estatísticas sendo -69 mV ($dp: \pm 10,482$) durante a perfusão e $-68,750\text{ mV}$ ($dp: \pm 14, 139$) após a troca para o Ringer Normal.

Observou-se que 70% dos neurônios que sobreviveram ao final da reversão tenderam a um valor de PM próximo do inicial.

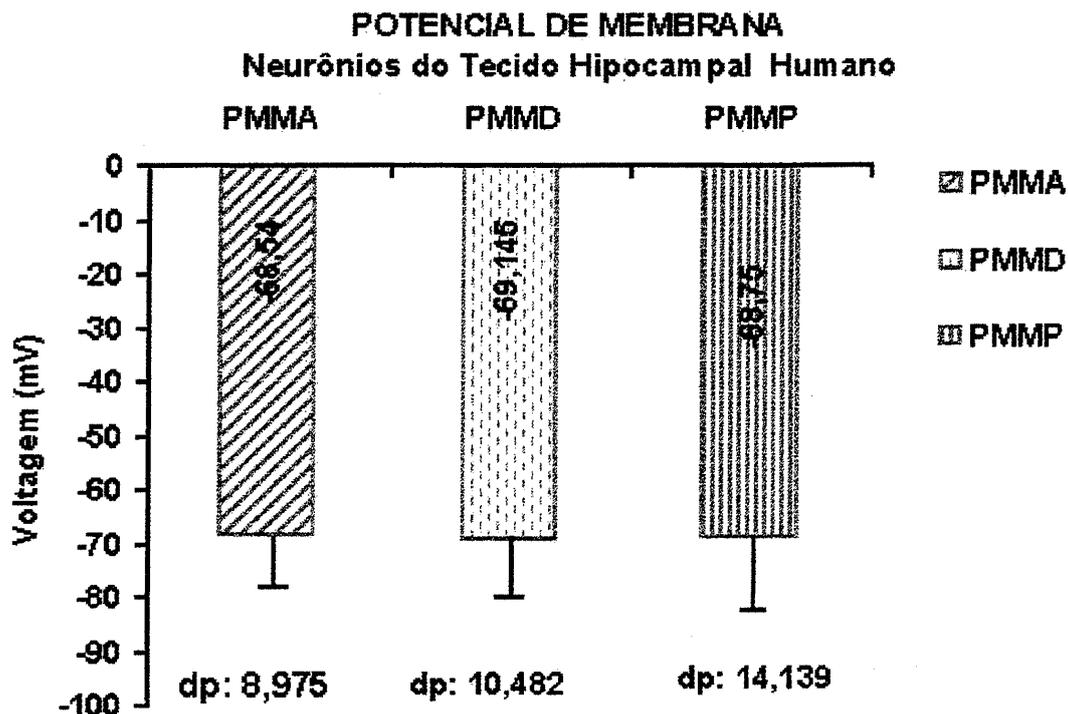


Gráfico 17. Representa as médias do potencial de membrana do hipocampo de tecido humano com ELT estudados em função da voltagem (mV): antes (PMMA), durante (PMMD) e depois (PMMP) do tratamento com o Ringer sem o Mg^{+2} . Notar que não existe diferença significativa nos diferentes momentos.

*** Resistência de entrada (RE) dos neurônios hipocampais humanos:**

Apesar da média das resistências de entrada não variarem nos três momentos estudados, houve neurônios cujos valores de REs foram muito superiores do que as médias calculadas. Assim, nestes neurônios, o RE antes do tratamento era de no mínimo $100 M\Omega$ ($n=4$) e chegaram ao final com resistências maiores ($n=3$) (ver tabela 18-anexo).

Anterior ao tratamento a média exibida foi de $52,269 M\Omega$ ($dp: \pm 28,244 M\Omega$), durante o mesmo a RE sofreu uma ligeira redução para $44,784 M\Omega$ ($dp: \pm 36,082$) e

após a reversão para o Ringer normal houve uma tendência ao valor inicial , $48,86 \text{ M}\Omega$ (dp: $\pm 38,334$)

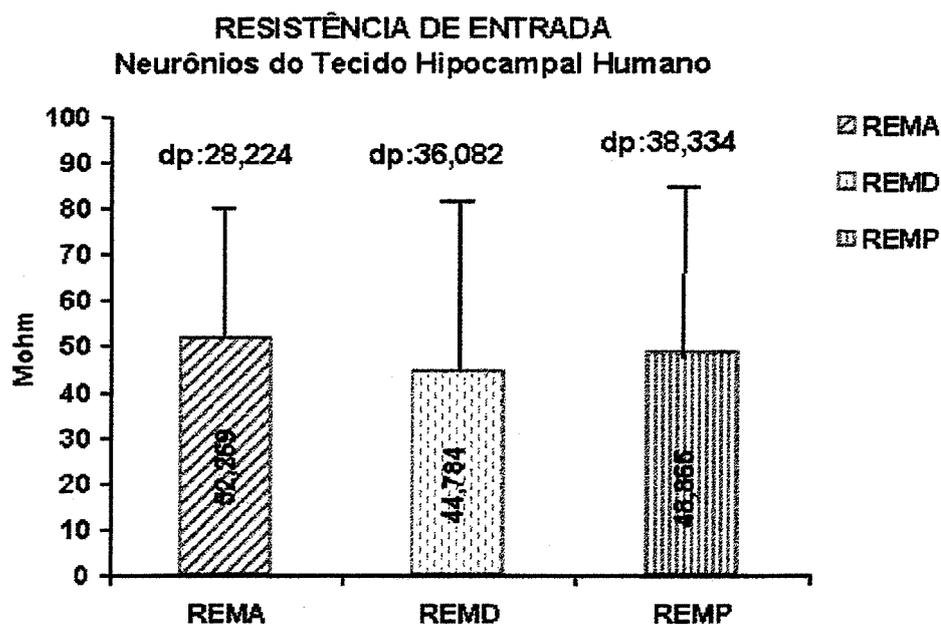


Gráfico 18. Representa as médias da RE de neurônios de CA1 de hipocampo de tecido humano com ELT estudados em função da resistência ($\text{M}\Omega$) nos diferentes momentos: antes (REMA); durante (REMD) e depois (REMP) do tratamento. Não existe diferença significativa entre as REs nos diferentes momentos

*** Constante de Tempo (CT) dos neurônios hipocampais humanos**

A média calculada da constante de tempo antes do tratamento exibiu valores mais baixos se comparado com os outros instantes. Constatou-se que 33,33% desses neurônios

apresentaram o valor da CT inferior a 4 ms (n=10) e 20 % dos neurônios obtiveram valores superiores a 10 ms (n=6).

Durante e após o tratamento houve um sensível aumento das CTs e apenas 3,3% durante o Ringer 0-Mg²⁺ apresentou um valor menor que 4 ms. (n=1); 30% (n=9) e 16,6% (n=5) apresentaram valores superiores a 10 ms, durante e depois da perfusão com 0-Mg²⁺.

As médias deste parâmetros ficaram em **7,528 ms (dp: ± 4,509)**; **9,941 ms (dp: ± 4,542)** e **10,926 ms (dp: ± 6,3381)**, para antes durante e depois da perfusão com 0-Mg²⁺ (ver tabela3, gráfico 19 e anexo, tabela 19).

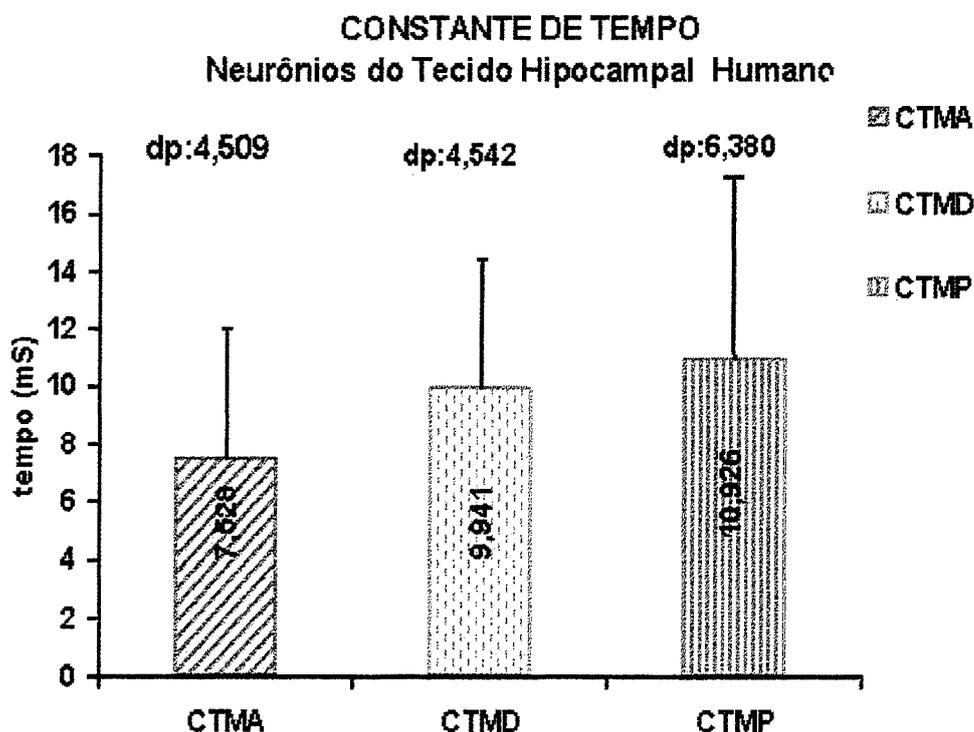


Gráfico 19: Representa as médias da constante de tempo de neurônios de CA1 de hipocampo de tecido humano com ELT nos diferentes momentos analisados em função do tempo (ms): antes (CTMA), durante (CTMD) e depois do tratamento (CTMP). Não há diferença significativa entre as médias nos diferentes períodos.

I. PROPRIEDADES DO DISPARO:

* Corrente Injetada para o primeiro Potencial de Ação (CIPA) dos neurônios hipocampais humanos:

Os neurônios de CA1 de tecido hipocampal humano não apresentaram diferenças significativas nas correntes injetadas para a produção de PAs nos três momentos, segundo a análise pela ANOVA ($p= 0,850$). As observações durante o experimento mostraram que a medida em que transcorria os experimentos, durante o tratamento uma boa parcela dos neurônios necessitavam de mais correntes para disparar os seus potenciais (ver tabela 20-anexo). Dos 20 neurônios estudados até a perfusão com o Ringer sem Mg^{2+} , 35 % necessitaram de mais corrente para o disparo dos seus primeiros PAs ($n=7$), e 50% despolarizaram com correntes menores ($n=10$). Nos restantes não houve modificação nos parâmetros de corrente injetada para o disparo do primeiro PA.

A tabela 3 e o gráfico 20 apresentam as médias das correntes necessárias para o disparo dos potenciais de ação. As medias calculadas foram **0,176 nA (dp:±0,450)**, para CIPAA, **0,200 nA (dp:±0,701)** para CIPAD e **0,375 nA (dp:±0,264)** para CIPAP.

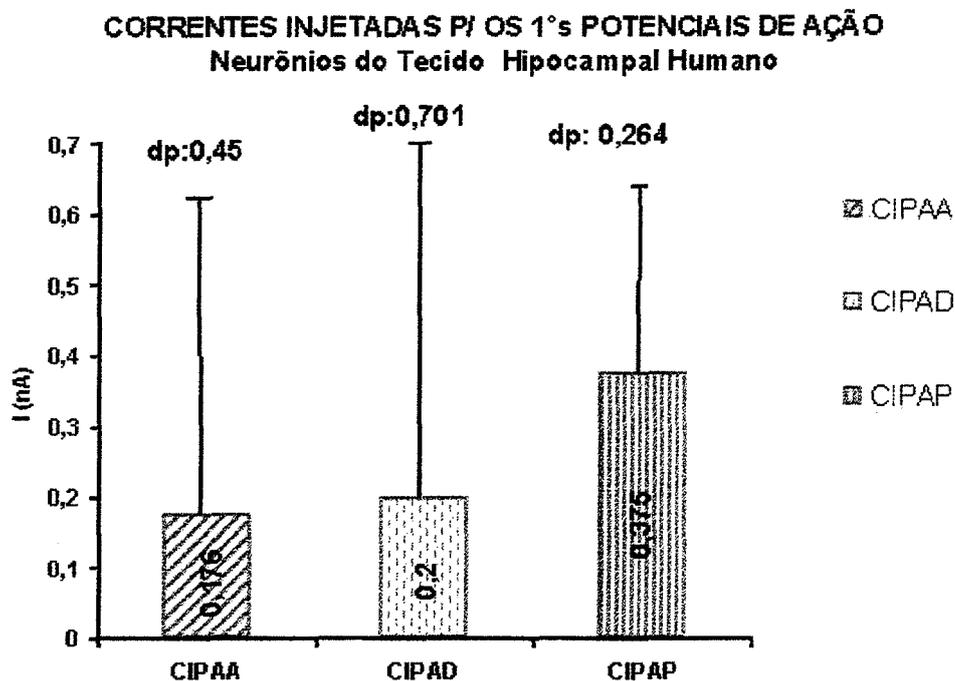


Gráfico 20. Representa as médias das correntes injetadas para o primeiro potencial de neurônios hipocampais humano. Nos diferentes momentos nota-se um ligeiro aumento das correntes durante o desenvolvimento do experimento, porém esta observação não atinge significância estatísticas (ver tabela 3).

* **Limiar de Disparo (LAM) dos neurônios hipocampais humanos:**

O limiar de disparo dos neurônios humanos não apresentou modificações nos valores do limiar de disparo nos 3 momentos. Na tabela 3 e o gráfico 21 são apresentados os resultados obtidos. A média antes da perfusão com Ringer 0-Mg^{+2} ficou em **55,084**

mV (dp:±8,023), durante -54,512 mV (dp:±10,014) e após -53,512 mV (dp:±6,659).

(Ver também anexo –ratos normais- tabela 5)

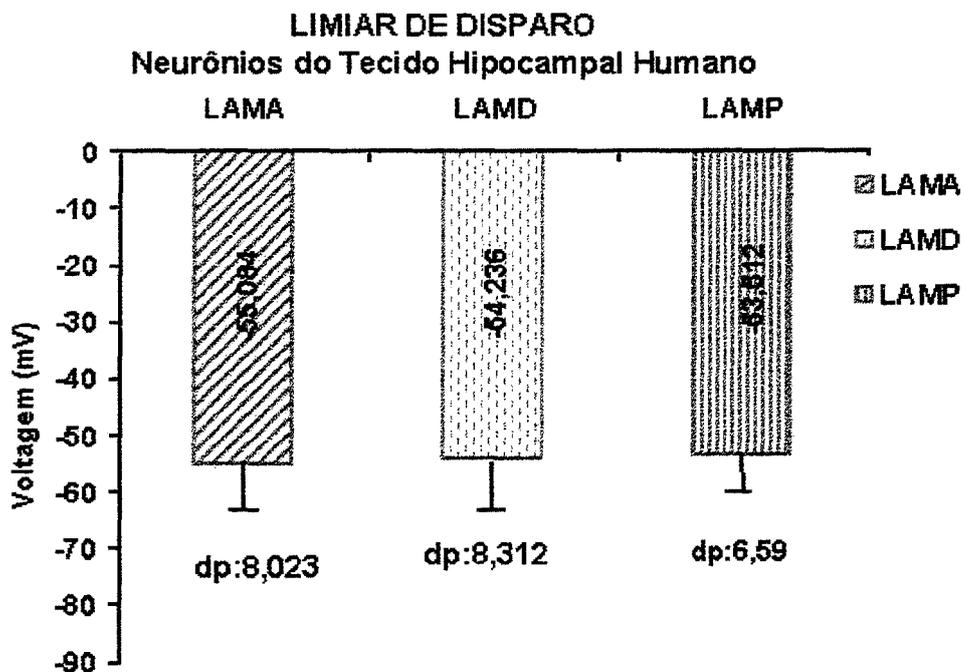


Gráfico 21: Representa a média do limiar dos disparos em função da voltagem nos diferentes momentos dos neurônios hipocampais humanos em função da voltagem. Não há diferença significativa entre os 3 momentos do experimento (ver também tabela 1).

* **Amplitude do PA (AM) dos neurônios hipocampais humanos:**

Uma característica observada nos neurônios de CA1 de tecido hipocampal humano foi a amplitude dos seus Potenciais de ação. A amplitude dos mesmos, com raras exceções ficou abaixo dos 75 mV, correspondendo a 86% dos neurônios (n=26) e apenas 13,3 % ultrapassou esta amplitude.

A análise desta variável antes, durante e depois de perfusão em Ringer 0Mg não evidenciou modificações significativas neste parâmetro. A tabela 3 e o gráfico 22 mostram as médias deste parâmetro nos diferentes momentos avaliados. Antes do tratamento a média calculada foi de **66,903 mV (dp:± 9,092)**; durante foi de **68,976 mV (dp:±6,674)** e depois **66,533 mV (dp:±6,266)**.

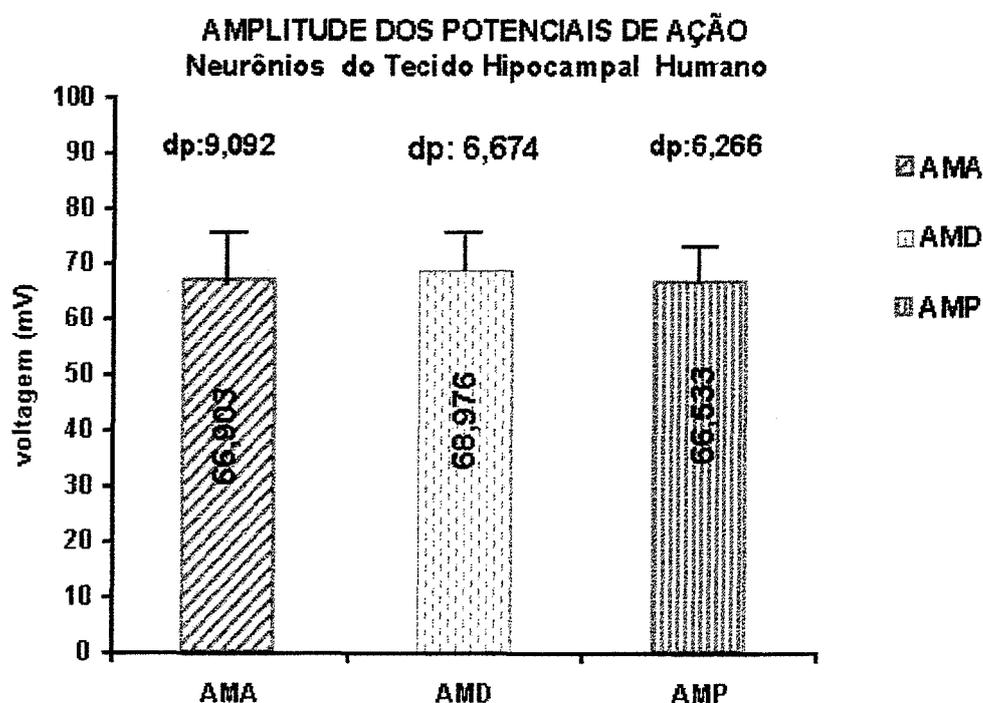


Gráfico 22: Representa a média da amplitude dos PA de neurônios de CA1 de tecido hipocampal humano nos diferentes momentos. Não houve diferença significativa nas

diferentes fases do experimento (antes, durante e após a perfusão) com Ringer 0 Mg (ver tabela 3).

- **Duração do PA (DPM) dos neurônios hipocampais humanos:**

Nos neurônios de CA1 do tecido hipocampal humano foram constatadas que estes neurônios apresentaram potenciais mais longos. Geralmente a duração do potencial de ação com mais de 5 ms eram um indicativo de potenciais em salva; 16,6 % dos neurônios estudados apresentaram potenciais de ação com no mínimo 5ms de duração. A caracterização fisiológica para tentar identificar o tipo de neurônio estudado será abordado posteriormente.

A tabela 3 e o gráfico 23 são apresentados estes valores, não sendo identificadas diferenças significativas.

As médias observadas foram, DPMA de **4,26 ms (dp:± 2,234)**, DPMD foi de **3,794 ms (dp:±1,186)** e DPMP foi de **3,103 ms (dp:±0,63)**. A análise estatística realizada não determinou diferença significativa (**p= 0,106**) (ver também anexo)

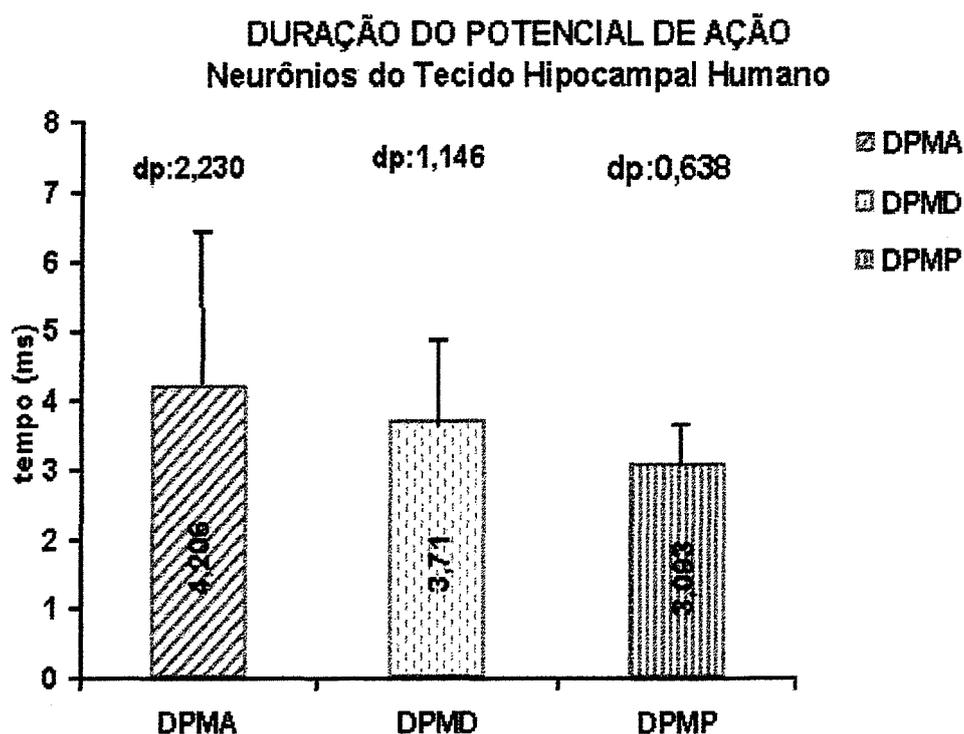


Gráfico 23: Representa a média da duração dos PAs de neurônios de CA1 do tecido hipocampal humano dado em ms. Não houve diferença significativa entre as médias (ver também tabela 3).

*** Potencial de Membrana ao final do potencial de Ação (Potencial de repolarização) (PPH) dos neurônios hipocampais humanos:**

O potencial de Membrana ao final do potencial de ação dos neurônios humanos não apresentou modificações nos valores do limiar de disparo nos 3 momentos.

A tabela 3 e o gráfico 24 são apresentadas as médias calculadas. A média antes da perfusão em Ringer 0 Mg ficou em $63,248 (\pm 8,205)$ mV, durante $-61,136 (\pm 9,045)$ mV e após $-62,572 (\pm 5,08)$ mV. (Ver também anexo –ratos normais- tabela 24)

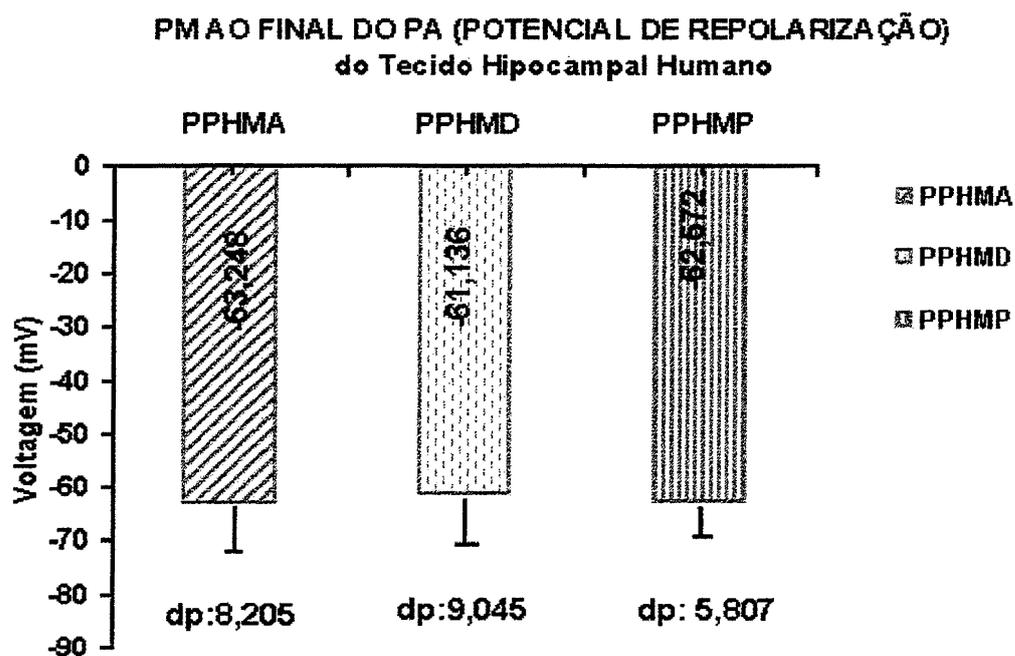


Gráfico 8: Representa a média dos PPHs dos neurônios hipocampais humanos em mV.

Notar que não há diferenças significativas entre as médias (ver também tabela 3).

Tabela 3- PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS AVALIADOS: TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

	PM	RE	CT	CIPA	LAMA	AM	DPM	PPH	
ANTES	-68.54	52.269	7.528	0,176	-55,084	66,903	4,206	-63,248	
	±8,975	±28,244	±4,509	±0,450	±8,023	±9,092	±2,23	±8,205	
	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(22)	
DURANTE	-69.145	44,784	9.941	0,2	-54,512	68,970	3,71	-61,136	
	±10,482	±36,082	±4,542	±0,701	±8,312	±6,674	±1,146	±9,045	
	(20)	(20)	(19)	(20)	(20)	(20)	(20)	(13)	
DEPOIS	-68.75	48,86	10,926	0,375	-53,512	66,533	3,09	-62,572	
	±14,139	± 38,334	±6,38	±0,264	±6,569	±6,266	±0,638	±5,807	
	(16)	(15)	(15)	(16)	(15)	(15)	(16)	(10)	
ANOVA one way P=0,05	F:	0,01	0,295	2,799	0,850	0,216	0,490	2,324	0,284
	Sig:	0,9818	0,745	0,0684	0,432	0,805	0,614	0,106	0,753

PM. Potencial de membrana RE. Resistência de Entrada CT. Constante de Tempo LAM. Limiar de Disparo

AM. Amplitude do Potencial de Ação DPM. Duração do Potencial de Ação

PPH. Potencial de membrana ao final do PA (potencial de Repolarização)

2. ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DAS CÉLULAS PIRAMIDAIAS DE CA1 ENTRE OS GRUPOS EM DIFERENTES MOMENTOS DO TRATAMENTO COM O RINGER LIVRE DE Mg^{+2} .

A segunda fase deste estudo consistiu em comparar as médias dos parâmetros apresentados anteriormente, e cruzá-los entre os grupos de estudo com o intuito de identificar as diferenças populacionais. Para a identificação das diferenças e semelhanças, para cada propriedade estudada foi aplicado o teste t, para duas populações independentes com um $p=0,05$.

Os resultados deste estudo mostrarão que existem diferenças entre as populações, mas também muitos pontos em comum, mesmo em se tratando da comparação das respostas dos neurônios de ratos com as de tecido humano, dependendo da propriedade analisada.

HIPOCAMPO DE RATOS NORMAIS	X	HIPOCAMPO DE RATOS EPILÉPTICOS
HIPOCAMPO DE RATOS NORMAIS	X	TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO
HIPOCAMPO DE RATOS EPILÉPTICOS	X	TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

- HIPOCAMPOS DE RATOS NORMAIS X HIPOCAMPOS DE RATOS EPILEPTICOS:

I. PROPRIEDADES PASSIVAS

* Potencial de Membrana (PMM):

O gráfico 25 compara as médias dos potenciais de membrana do grupo de ratos normais x ratos epiléticos. Os potenciais de membrana, dos dois grupos se comportam da mesma forma, não importando o momento: antes, durante ou depois da perfusão com Ringer 0-Mg²⁺. Antes da perfusão, os potenciais de membrana, estão próximos e até o final do experimento estas neurônios tendem a ficar mais negativo do que o potencial de membrana inicial. O aumento da hiperpolarização são igualmente proporcionais (-3mV) durante a infusão com o Ringer livre de Mg²⁺ nos dois grupos e esta igualdade não foi vista na reversão para o Ringer Normal. A proporção da polarização em ratos normais foi constante, como na condição anterior (-3 mV), já em ratos epiléticos esta característica foi maior (5mV) (gráfico 26).

Na tabela 4 estão dispostas as médias e a sua análise de significância. Em nenhum dos instantes estudados foram observadas diferenças entre as médias dos potenciais de membrana (ver gráfico 25 ou tabela 5)

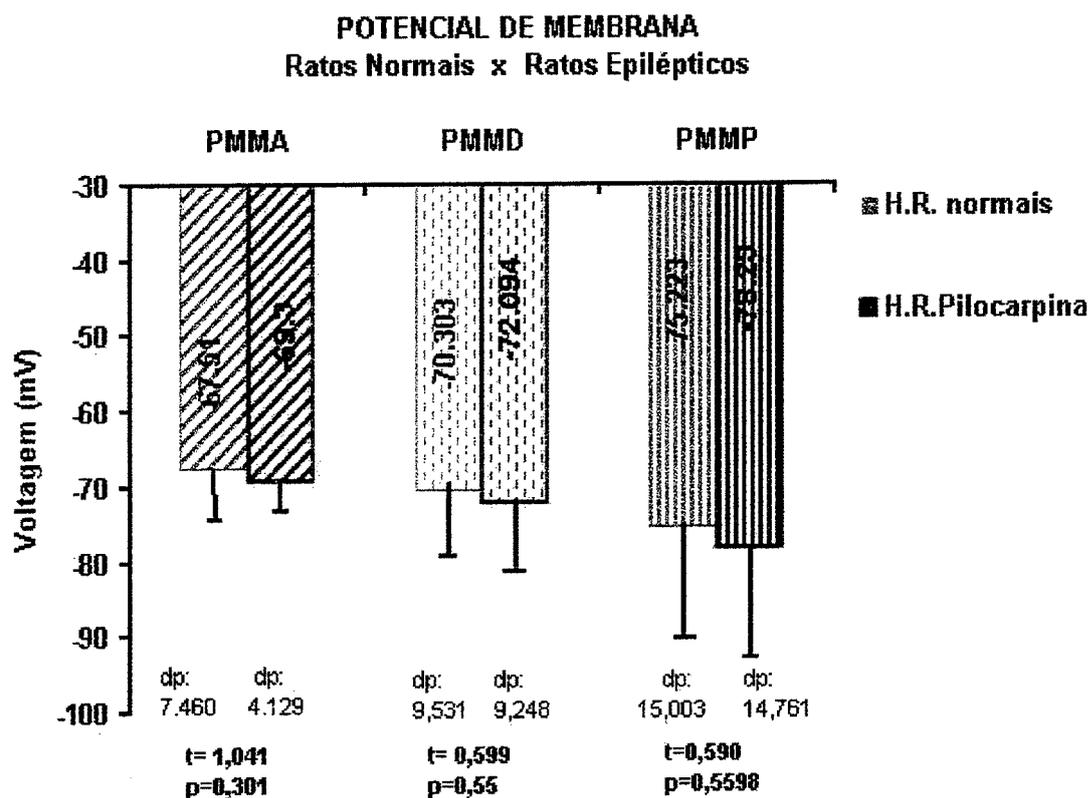


Gráfico 25 Representa as médias do potencial de membrana dos hipocampos de ratos normais e ratos epilépticos estudados em voltagem (mV): antes (PMMA), durante (PMMD) e depois (PMMP) do tratamento com o Ringer sem o Mg^{+2} . Notar que não há diferença significativa entre eles. . t = constante da análise do teste t, p= significância..

- **Resistência de Entrada (REM):**

Os dois grupos não apresentaram diferenças significativas pelo teste t, o p calculado para antes do tratamento foi de **0,06**, durante a perfusão com o Ringer 0-Mg^{+2} foi de **0,286** e o posterior para **0,631**. Antes da perfusão com 0-Mg^{+2} , embora os valores não indiquem significância, existia uma ligeira diferença nestas REs.

No gráfico 26, observa-se o aumento das resistências no decorrer do experimento de $43\text{M}\Omega \rightarrow 60,156\text{ M}\Omega$ em ratos normais e de $49,531\text{ M}\Omega \rightarrow 60,156\text{ M}\Omega$ para os ratos epiléticos. O gráfico mostra ainda que nos três momentos as médias de RE esteve sempre mais elevada que a dos ratos normais, porém esta diferença não influenciou o resultado estatístico.

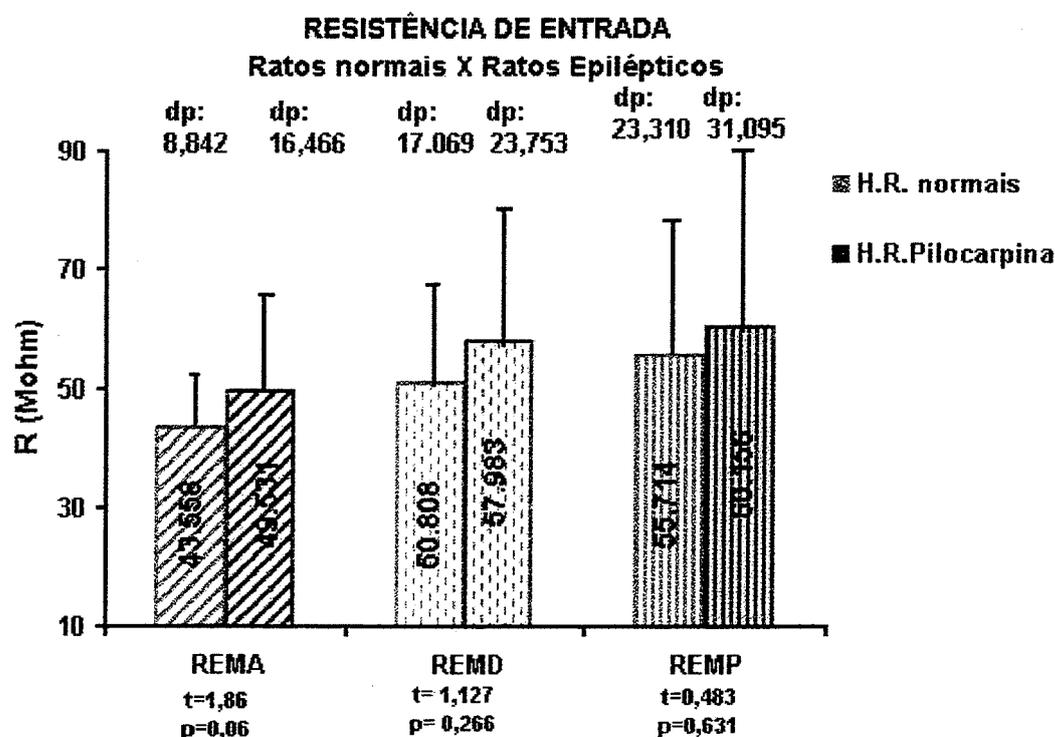


Gráfico 26: Representa as médias da RE de neurônios de CA1 de ratos normais e ratos epiléticos nos diferentes momentos em $\text{M}\Omega$: antes (REMA); durante (REMD) e depois

(REMP) da perfusão com Ringer 0-Mg²⁺. Notar que não há diferença significativa entre eles. . t = constante da análise do teste t, p= significância..

- **Constante de tempo(CTM)**

Não foram observadas diferenças entre as constantes de tempo, nas três medições. Independentemente do grupo os valores se mantiveram mais ou menos no mesmo patamar, indicando que os neurônios de ratos normais e epiléticos se comportam da mesma forma. A tabela 4 e gráfico 27 mostram claramente as médias da CT similares destes neurônios.

O “p” calculado antes do tratamento foi de 0,419, durante a perfusão com o Ringer sem o Mg²⁺ foi de 0,784 e após a troca para o Ringer normal foi de 0,846.

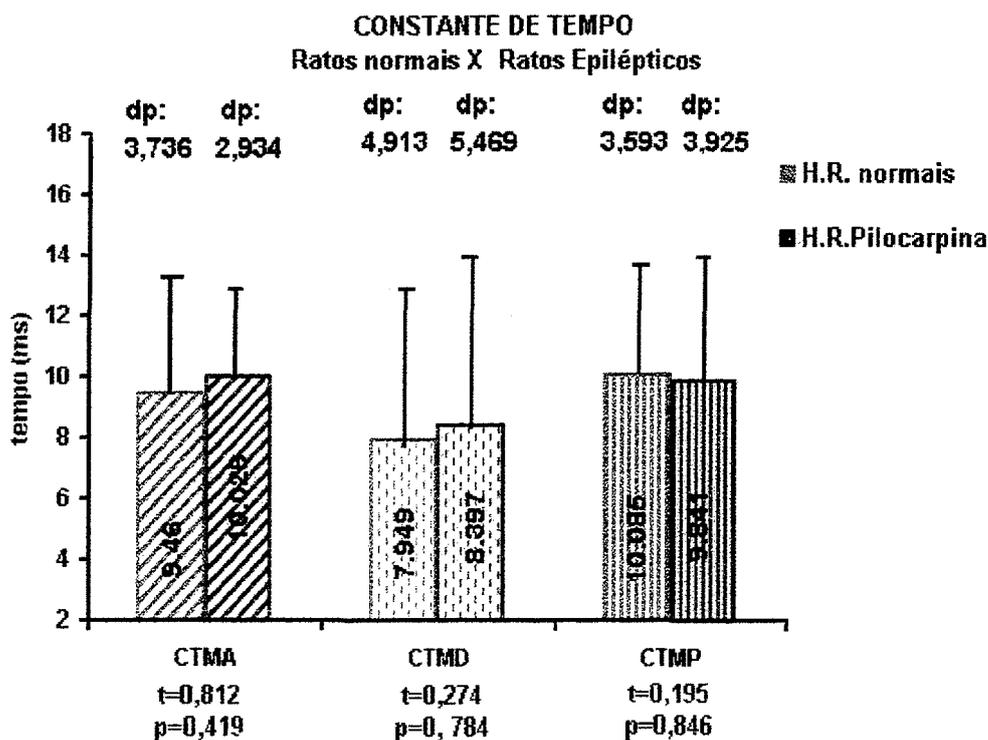


Gráfico 27: Representa as médias da CT de neurônios de CA1 de ratos Normais e ratos epiléticos nos diferentes momentos em função do tempo (ms): antes (CTMA); durante (CTMD) e depois (REMP) do tratamento. Notar que não há diferença significativa entre eles. $t =$ constante da análise do teste t, $p =$ significância..

II. PROPRIEDADES DO DISPARO

* Corrente injetada para o primeiro Potencial de Ação:

A análise deste parâmetro detectou a primeira diferença eletrofisiológica comportamental, entre ratos normais e epiléticos (ver tabela 5 e gráfico 28), na medição da corrente injetada para o primeiro disparo (antes da perfusão com Ringer 0-Mg⁺²). Com a aplicação de 0,15 nA já era possível disparar os primeiros potenciais de ação em ratos epiléticos já os ratos normais necessitaram de correntes superiores (0,25 nA). O p calculado foi de 0,02

Durante a perfusão as correntes necessárias para disparar os PAs foram ainda mais baixas para os dois grupos (< 0,1 nA). Não foi observadas diferença nesta condição (p=0,584).

Após a troca do Ringer com composição normal, ambos os grupos necessitaram de uma corrente mais elevada, mas as diferenças não foram significativos. (p= 0,456) (ver tabela 5 e gráfico 28)

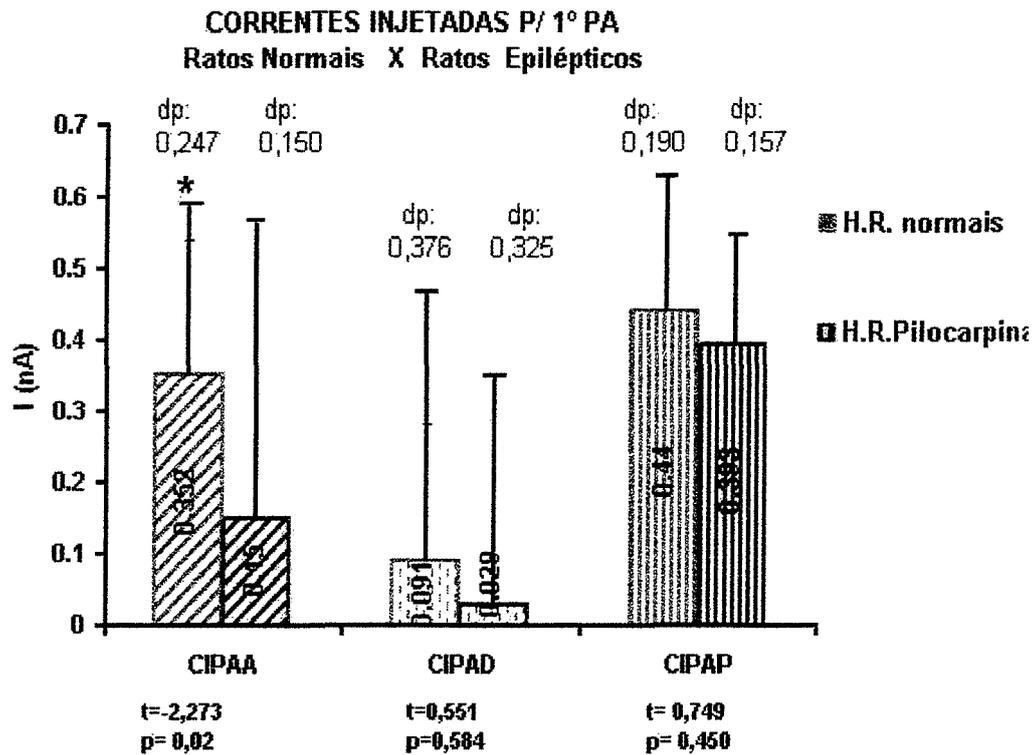


Gráfico 27: Representa as médias da CIPA de neurônios de CA1 de ratos Normais e ratos epilépticos nos diferentes momentos em nA: antes (CIPAA); durante (CIPAD) e depois (CIPAP) da perfusão com Ringer 0-Mg⁺². Notar que há diferença significativa antes da passagem do Ringer sem o Magnésio. t = constante da análise do teste t, p= significância..

* Limiar de Disparo (LAM)

Os grupos se comportaram de forma similar nesta propriedade. Inicialmente ambos os grupos disparam PAs com limiares ligeiramente mais baixos que durante e depois da perfusão com Ringer 0-Mg⁺² (ver tabela 5 e gráfico 29).

A análise estatística não evidenciou diferenças significativas entre os grupos. O p calculado para antes do tratamento foi de 0,273; durante, 0,766 e depois de 0,356.

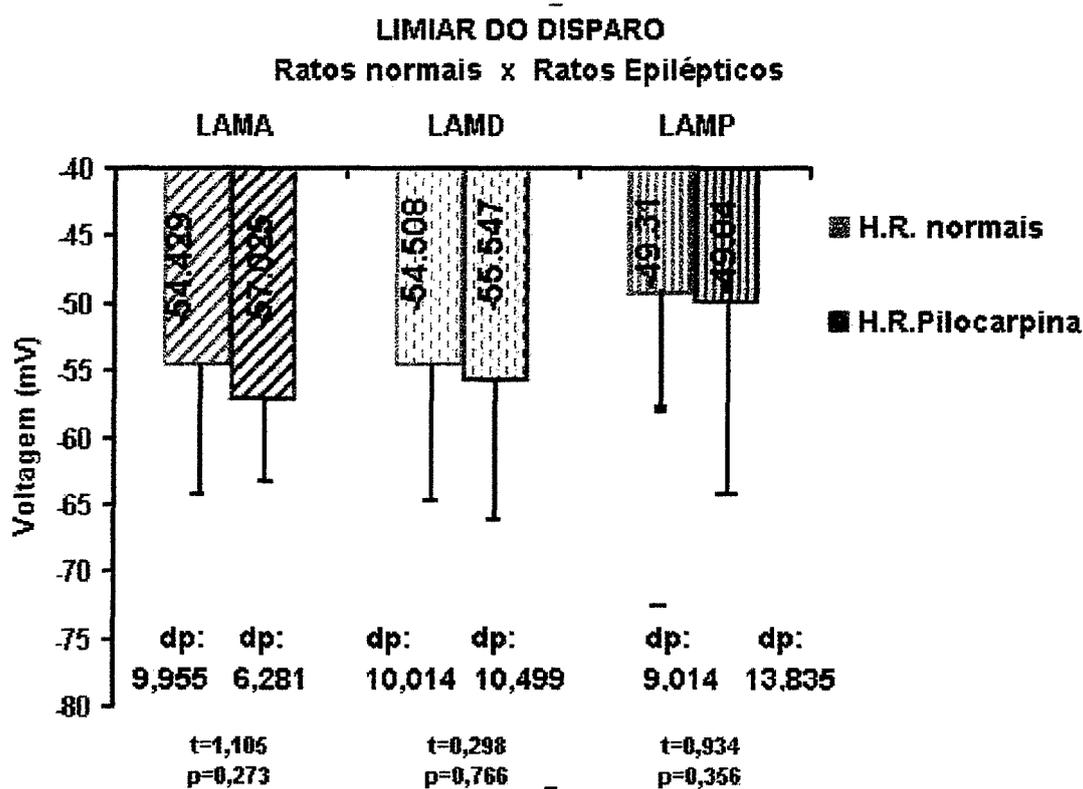


Gráfico 29: Representa as médias da LAM de neurônios de CA1 de ratos Normais e ratos epiléticos nos diferentes momentos em mV: antes (LAMA); durante (LAMD) e depois (LAMP) da perfusão com Ringer 0-Mg⁺². Notar que não há diferença significativa. . t = constante da análise do teste t, p= significância..

* **Amplitude dos Potenciais de Ação (AM):**

Embora não tenham sido identificadas diferenças estatísticas significativas (ver tabela 5) neste parâmetro comparando ratos normais e epiléticos, o gráfico 30 mostra que a amplitude sofre um aumento durante a perfusão com o Ringer modificado e após a troca para o Ringer normal a amplitude sofre um pequeno decaimento.

Antes do tratamento a amplitude dos potenciais de ação dos ratos normais são levemente mais altos que os ratos epiléticos, **82,615 mV** contra **78,863 mV**.

Durante e após o tratamento esta situação se inverte, os epiléticos passam a ter uma amplitude mais alta. Com a perfusão do Ringer 0-Mg⁺² a média das amplitudes para os ratos epiléticos foi de **87,2 mV** contra **85,083 mV** dos normais. A media da amplitude após o tratamento para ratos epiléticos foi de **86,333 mV** e a de normais, **84,956 mV**.

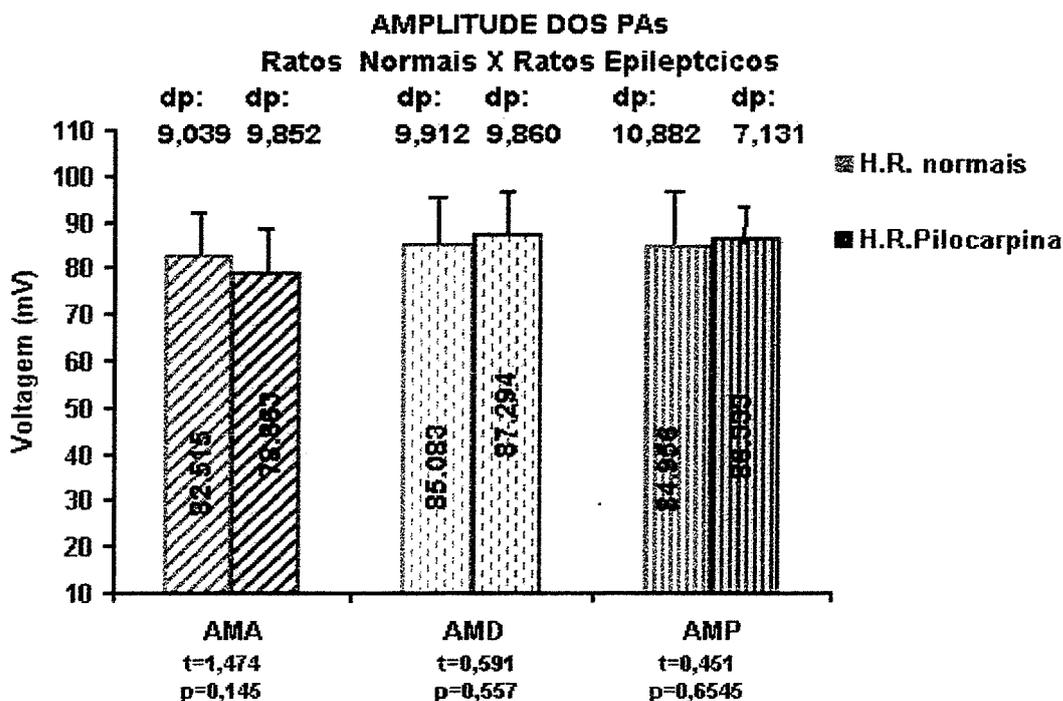


Gráfico 30: Representa as médias da AM de neurônios de CA1 de ratos Normais e ratos epiléticos nos diferentes momentos em mV antes (AMA); durante (AMD) e depois (AMP) do tratamento. Notar que embora não sejam observadas diferenças estatísticas existe um ligeiro aumento da amplitude durante a passagem do Ringer 0-Mg²⁺. t = constante da análise do teste t, p= significância..

* **Duração dos potenciais de Ação (DPM)**

Os grupos normal e epilético não apresentaram diferenças nas suas médias, onde p antes foi calculado em **0,901**, durante, **0,939** e após , **0,609**. (ver tabela 6 e gráfico 31).

A média em qualquer momento teve a duração mínima de 2, 7 ms e a máxima de 2,9, não sendo detectadas nenhuma diferença estatística ("p" citada anteriormente) (ver grafico31.).

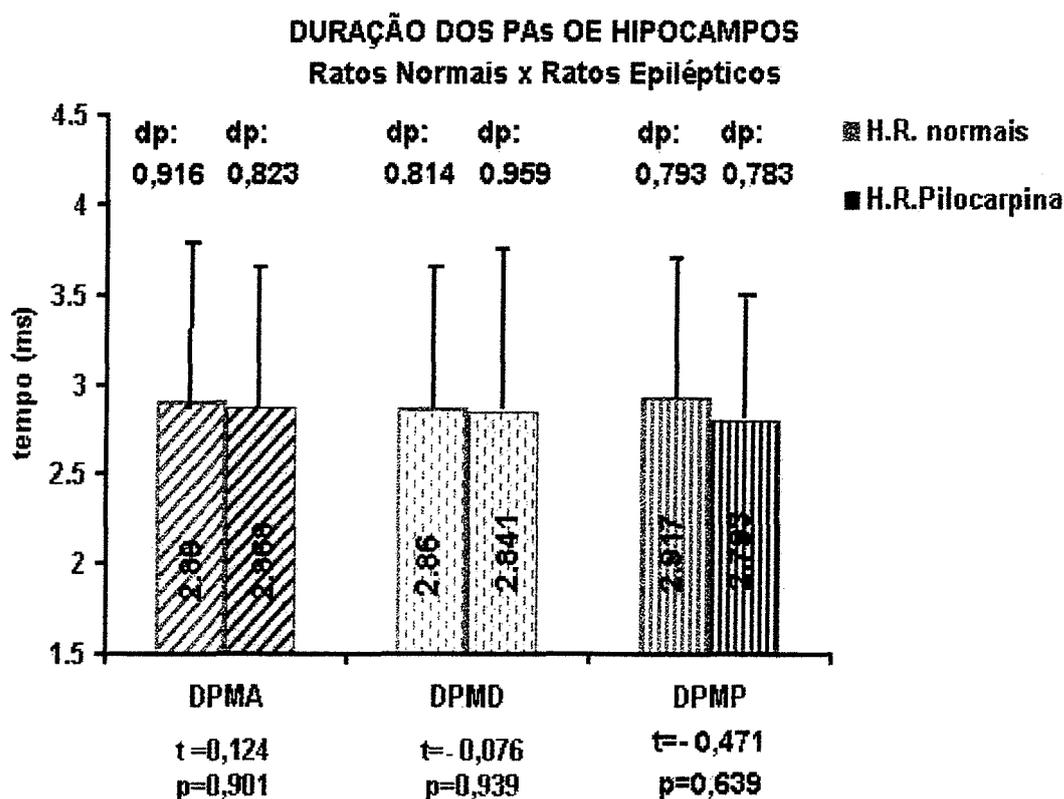


Gráfico 31: Representa as médias da DPM de neurônios de CA1 de ratos Normais e ratos epiléticos nos diferentes momentos em ms: antes (DPMA); durante (DPMD) e depois (DPMP) do tratamento. Notar que não há diferença entre eles. . t = constante da análise do teste t, p= significância..

* **Potencial de Membrana ao Final do Potencial de Ação (Potencial de Repolarização)(PPH):**

Não foram detectadas diferença significativa nos 3 momentos medidos (ver tabela 6 e gráfico 32). O gráfico 32 nos mostra uma pequena diferença, que não se traduziu estatisticamente, sendo nos ratos epilépticos o PPH menor que os controles nos diferentes instantes.

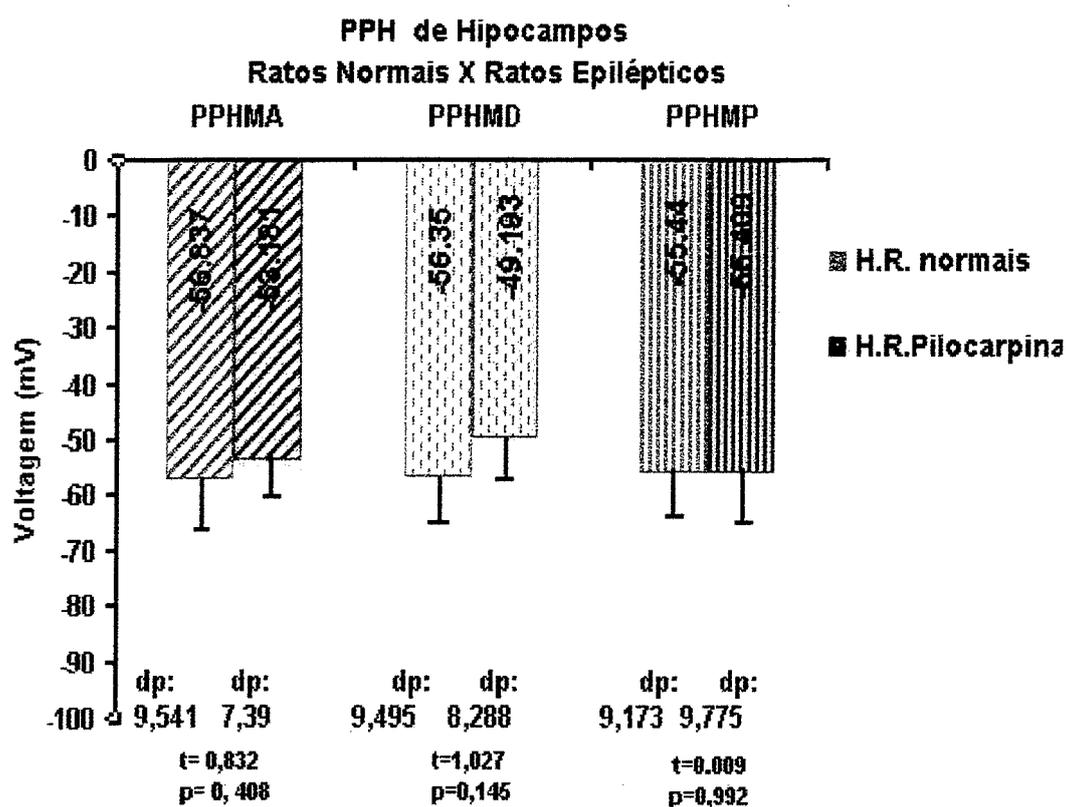


Gráfico 32: Representa as médias da PPH de neurônios de CA1 de ratos normais e ratos epilépticos nos diferentes momentos em mV: antes (PPHMA); durante (PPHMD) e depois (PPHMP) do tratamento. Notar que não há diferença significativa entre eles. $t =$ constante da análise do teste t , $p =$ significância.

TABELA 4- PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA: RATOS NORMAIS X RATOS EPILÉPTICOS

	PM			RE			CT		
	PMMA	PMMD	PMMP	REMA	REMD	REMP	CTMA	CTMD	CTMP
RATOS NORMAIS	67,514 ±7,46) (40)	-70,303 ±9,531 (24)	-75,223 ±15,003 (22)	43,558 ±8,842 (40)	50,808 ±17,069 (24)	55,714 ±23,310 (22)	9,46 ±3,736 (40)	7,749 ±4,913 (24)	10,085 ±3,593 (22)
RATOS EPILÉPTICOS	-69,309 ±4,129 (22)	-72,094 ±9,248 (17)	-78,23 ±14,761 (15)	49,531 ±16,456 (22)	57,983 ±23,753 (17)	60,156 ±31,095 (15)	10,209 ±2,934 (22)	8,397 ±5,469 (17)	9,841 ±3,925 (15)
t=	0,310	0,599	0,590	1,864	1,270	0,483	0,812	0,274	0,195
p=	0,301	0,552	0,558	0,06	0,266	0,631	0,419	0,785	0,946

PM. Potencial de membrana (PMMA antes, PMMD durante, PMMP depois) RE. Resistência de Entrada (REMA antes, REMD: durante e REMP depois) CT. Constante de Tempo (CTMA antes, CTMD durante e depois)

TABELA 5- PROPRIEDADES DO DISPARO : RATOS NORMAIS X RATOS EPILÉPTICOS

	CIPA			LAM			AM		
	CIPAA	CIPAD	CIPAP	LAMA	LAMD	REMP	AMA	AMD	AMP
RATOS	0,35	0,09	0,44	-54,429	-54,608	-49,319	82,515	85,08	84,956
NORMAIS	±0,247	±0,376	±0,19	±9,955	±10,014	±9,014	±9,039	±9,912	±10,882
	(40)	(24)	(22)	(40)	(24)	(22)	(40)	(24)	(22)
RATOS	0,15	0,029	0,393	-57,025	-55,576	-49,84	78,863	87,294	86,333
EPILÉPTICOS	±0,426	±0,325	±0,157	±6,281	±10,499	±13,835	±9,852	±9,86	±7.138
	(22)	(17)	(15)	(22)	(17)	(15)	(22)	(17)	(15)
t=	2,273	0,551	0,749	1,105	0,298	0,934	1,474	0,591	0,451
p=	0,002*	0,584	0,459	0,273	0,766	0,356	0,145	0,557	0,654

CIPAA: Corrente injetada para o primeiro potencial de ação (CIPAA antes, CIPAD: durante e CIPAP depois)

LAM: Limiar de disparo (LAMA antes. LAMP durante e LAMP depois) AM: Amplitude do Potencial de ação (AMA antes. AMD durante e AMP depois)

TABELA 6- PROPRIEDADES DO DISPARO : RATOS NORMAIS X RATOS EPILÉPTICOS

	DPM			PPH		
	DPMA	DPMD	DPM P	PPHMA	PPHMD	PPHMP
RATOS NORMAIS	2,89 ±0,916 (40)	2,86 ±0,814 (24)	2,917 ±0,797 (22)	-56,837 ±9,541 (30)	-56,35 ±9,495 (15)	-55,44 ±9,173 (10)
RATOS EPILÉPTICOS	2,868 ±0,823 (22)	2,841 ±0,959 (17)	2,793 ±0,783 (15)	-53,181 ±7,39 (20)	-49,84 ±8.288 (16)	-55,409 ±9,775 (11)
t=	0,124	0,076	0,471	0,832	1,027	0,009
p=	0,90	0,939	0,639	0,408	0,310	0,992

DPM duração do potencial de ação (DPMA antes, DPMD durante e DPMP depois)

PPH Potencial de repolarização (PPHMA antes, PPHMD durante e PPHMP depois)

- HIPOCAMPOS DE RATOS NORMAIS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

1. PROPRIEDADES PASSIVAS:

Na segunda etapa da análise comparativa entre os grupos , foram avaliadas as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios de CA1 de neurônios de ratos normais e neurônios hipocampais humanos. Devido a dificuldade de eleger um grupo que seja um “controle” para os neurônios humanos, de tecido hipocampal de pacientes com ELT, os ratos normais foram usados como controles. Através desse estudo buscou-se não só comparar as respostas eletrofisiológicas mas verificar se a utilização dos neurônios de CA1 de hipocampo de ratos constituem “um bom controle” para o estudo dos neurônios de CA1 de tecido hipocampal humano.

* **Potencial de Membrana (PMM):**

Não foram identificadas diferenças significativas nos valores de PMs de neurônios de CA1 de hipocampo de ratos normais e neurônios de CA1 de tecido hipocampal humano epilético nas três etapas que envolveram o experimento. O “p” desta análise antes de perfusão em Ringer 0-Mg ficou em **0,601** antes , **0,703** e depois em **0,195**.

Porém foram observadas pontos importantes. Quando foi relatado a influencia das trocas dos Ringers nos PMs de Neurônios Humanos e de ratos (no item 1 dos resultados) já havíamos observado o comportamento dessas propriedades. Observando o gráfico 33, novamente vemos a constância dos valores de PMs dos neurônios hipocampais humanos

cujo os valores ficaram em torno dos -69 mV. Nos neurônios hipocampais de ratos a situação foi completamente diferente do grupo anterior, a medida em que transcorria o experimento os neurônios tendiam a uma polarização, de -67 mV → -75 mV.

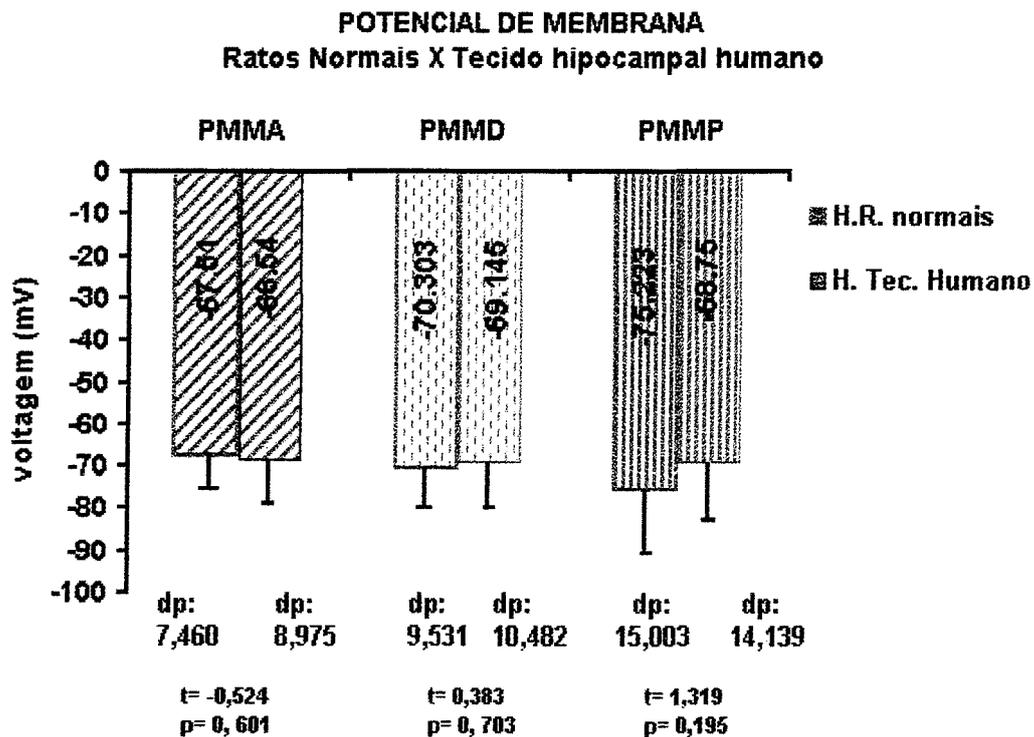


Gráfico 33: Representa as médias do potencial de membrana dos hipocampus de ratos normais e tecido hipocampal humano estudados em mV: antes (PMMA), durante (PMMD) e depois (PMMP) do tratamento com o Ringer sem o Mg^{+2} . Não houve diferença significativa entre os grupos

* **Resistência de Entrada (REM):**

A análise das REs de neurônios de CA1 de hipocampo de ratos normais e de tecido hipocampal humano demonstrou que os valores medidos são similares tanto no fator tempo (antes, durante e depois) quanto entre os grupos (ver tabela 7 e gráfico 34). O “p” desta análise antes do tratamento ficou em 0,07, já o durante ficou em 0,473 e o depois em 0,529.

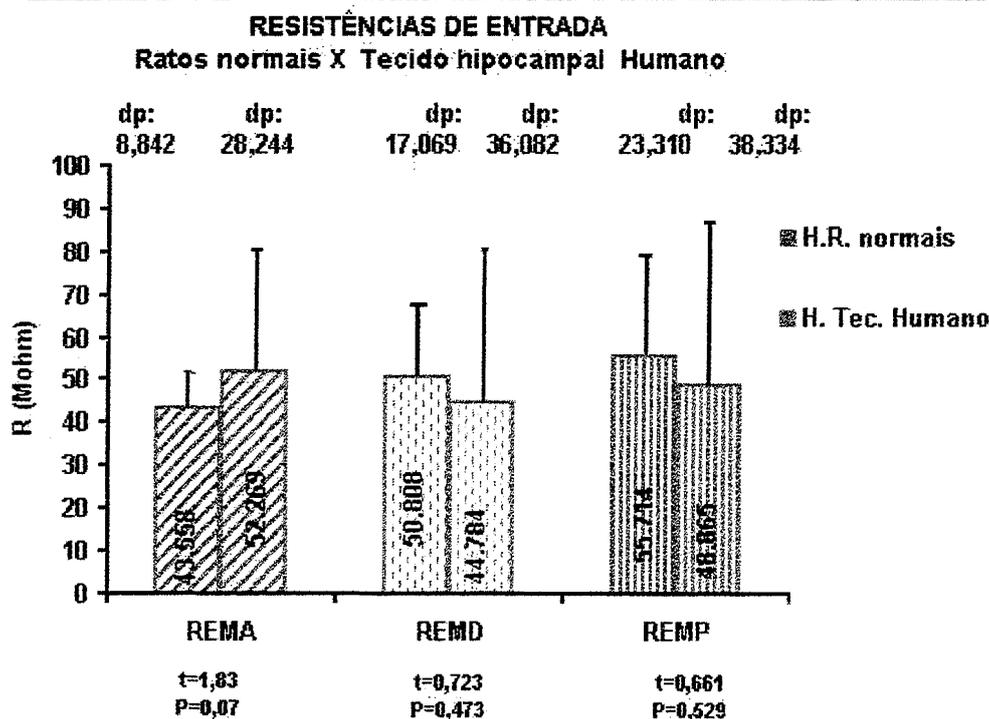


Gráfico 34: Representa as médias da RE de neurônios de CA1 de hipocampo de ratos normais e de neurônios hipocampais humanos nos diferentes momentos em (M Ω): antes (REMA); durante (REMD) e depois (REMP) do tratamento. Não há diferença significativa entre as REs nos grupos .

* **Constante de Tempo (CT):**

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, embora o “p” antes do tratamento tenha ficado quase no limite entre o significativo e o não (**p: 0,054**). Os valores durante e depois ficaram respectivamente em **0,173** e **0,608** (ver também gráfico 35 e tabela 7 para observar os valores das médias e desvios padrões)

Nos neurônios hipocampais humanos houve uma leve tendência de aumento da CT temporalmente e já no grupo dos ratos houve uma leve redução da CT durante e um ligeiro aumento no final.

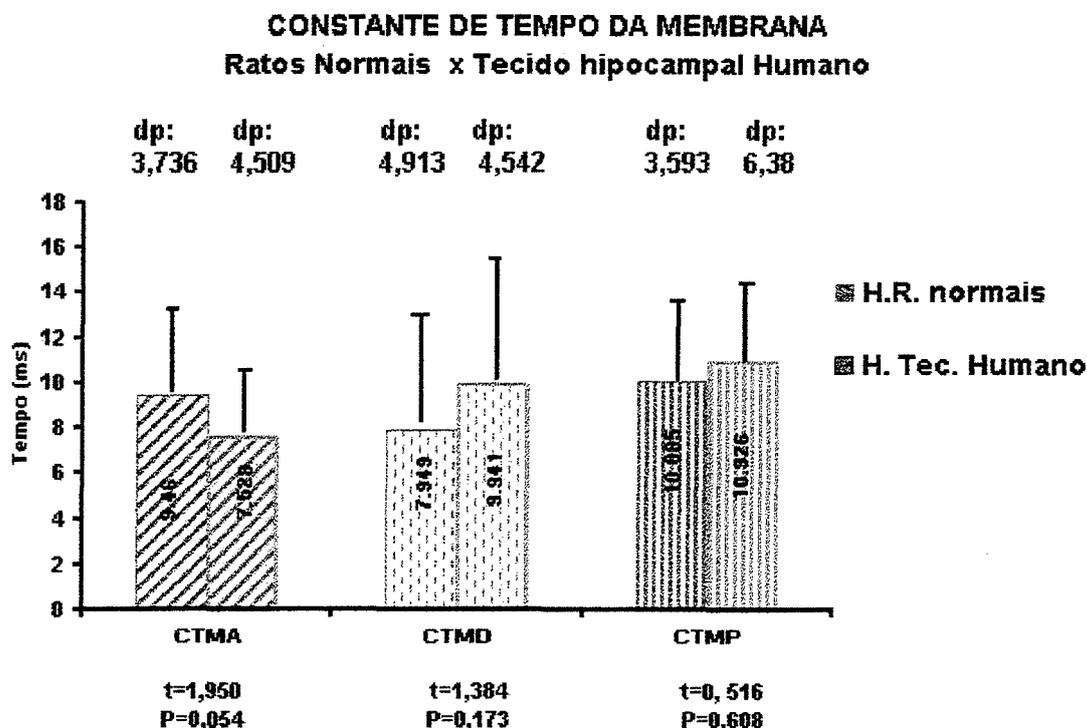


Grafico35—Representa as médias da constante de tempo de CA1 de ratos normais e tecido hipocampal humano nos diferentes momentos analisados em ms: antes (CTMA), durante (CTMD) e depois do tratamento (CTMP). Não há diferença significativa entre os grupos

2. PROPRIEDADES DO DISPARO:

As diferenças significativas entre os grupos aconteceram nas propriedades do disparo, onde merece um destaque a amplitude e o PPH.

* Corrente injetada para o primeiro potencial de Ação (CIPA):

Neste parâmetro foi constatada diferença significativa entre os grupos de neurônios hipocâmpais de rato normal e tecido humano ($p=0,04$).

Antes do tratamento com o Ringer 0 Mg^{+2} , os ratos normais necessitaram de mais corrente do que as humanos (**0,352 nA** contra **0,17 nA**) (gráfico 36 ver também tabela 8).

Durante e após do tratamento os neurônios se comportaram de modo semelhante, $p= 0,517$ e $p= 0,405$. Em ambos os grupos necessitaram de menos correntes para os seus primeiros disparos, **0,09 nA** (em média) para ratos normais e **0,2 nA** (em média) para os neurônios humanos (ver tabela 8 e gráfico36). Após a troca dos Ringers, do 0-Mg^{+2} para o normal, houve uma tendência de aumentar a corrente necessária para o primeiro PA.

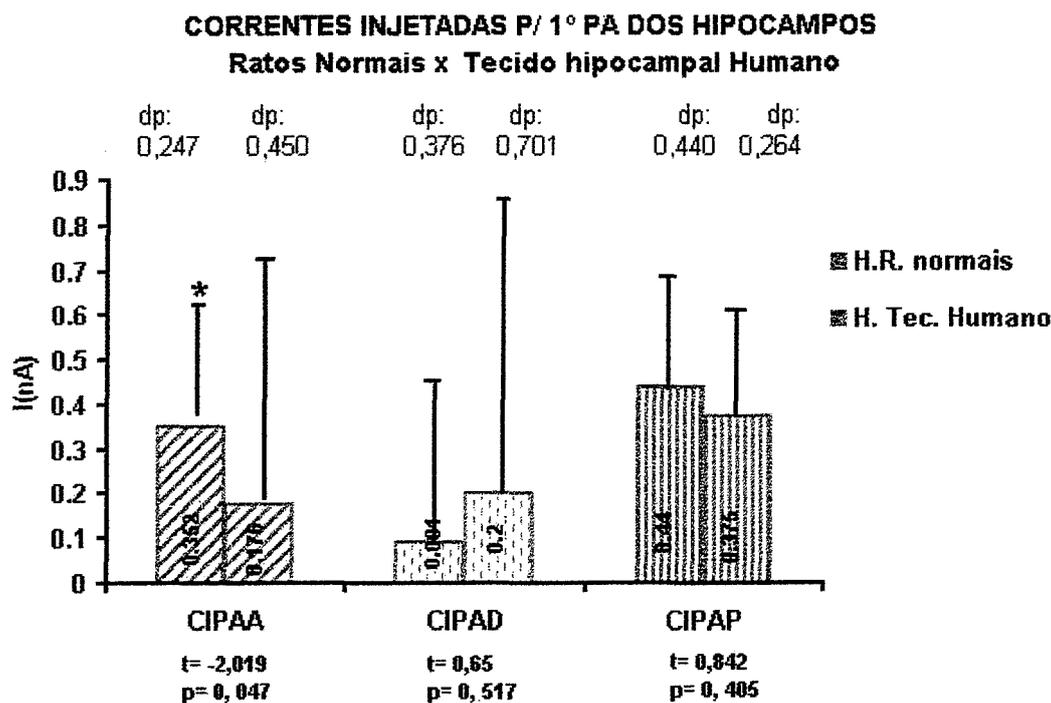


Gráfico 36 : Representa as médias das correntes injetadas dos neurônios de CA1 de ratos normais e tecido hipocampal humano antes (CIPAA), durante a perfusão do Ringer livre de Mg^{2+} (CIPAD) e depois do tratamento, já com o Ringer normal, (CIPAP), Notar a diferença entre as médias, onde o (*) representa condição em que houve significância.

*** Limiar de Disparo (LAM):**

Tanto o grupo de ratos normais quanto de tecido hipocampal humano exibiram médias similares para este parâmetro. As médias dos limiares nos instantes iniciais e durante a perfusão em Ringer Mg^{+2} foram praticamente iguais em torno de -54 mV. Apenas o pós perfusão em Ringer 0 Mg^{+2} dos ratos normais sofreu uma ligeira queda para -49 mV, já a média dos neurônios humanos permaneceu em torno -54 mV. O gráfico37 mostra o perfil da resposta desta propriedade (ver também tabela 8).

Não houve diferenças significativas entre os grupos. O “p” calculado para a fase anterior a perfusão em Ringer 0 Mg^{+2} foi de 0,77; durante 0,897 e após a reversão foi de 0,347.

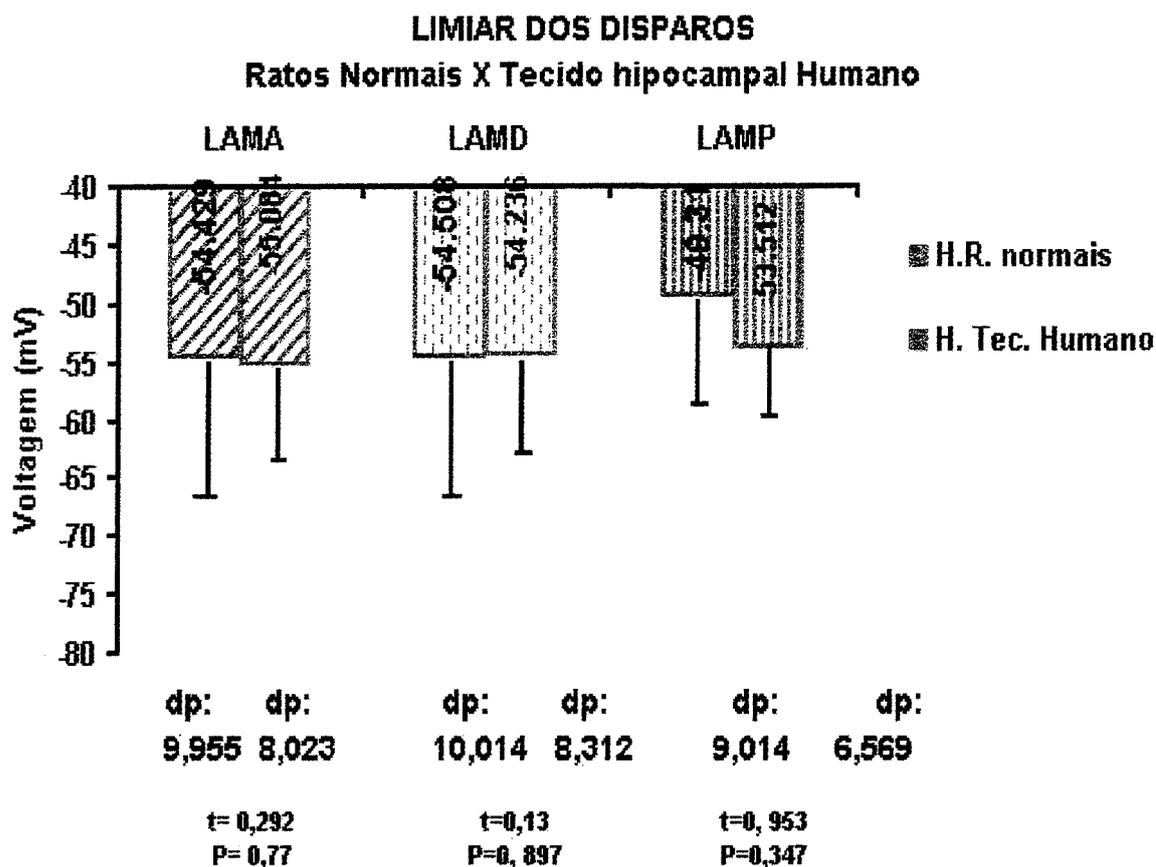


Gráfico 37: Representa as médias do limiar de disparo dos neurônios Hipocampais de CA1 de ratos normais e tecido hipocampal humano nos diferentes instantes medidos: antes (LAMA), durante (LAMD) e depois (LAMP) da perfusão com o Ringer livre de Mg^{2+} . Notar que não há diferença significativa entre as médias.

* **Amplitude do potencial de ação (AM):**

A amplitude dos potenciais de ação foi a única das propriedades estudadas a apresentar diferenças estatísticas nos 3 momentos. O gráfico 38 (ver também tabela 8) mostra a média das amplitudes medidas e nele são evidenciados as diferenças entre ratos normais e tecido humano.

Ficou evidenciado que a amplitude dos neurônios humanos, além de apresentarem uma amplitude menor apresentam similaridade nos três instantes. As médias dos ratos também apresentam certa similaridade durante o experimento, porém com amplitudes mais altas.

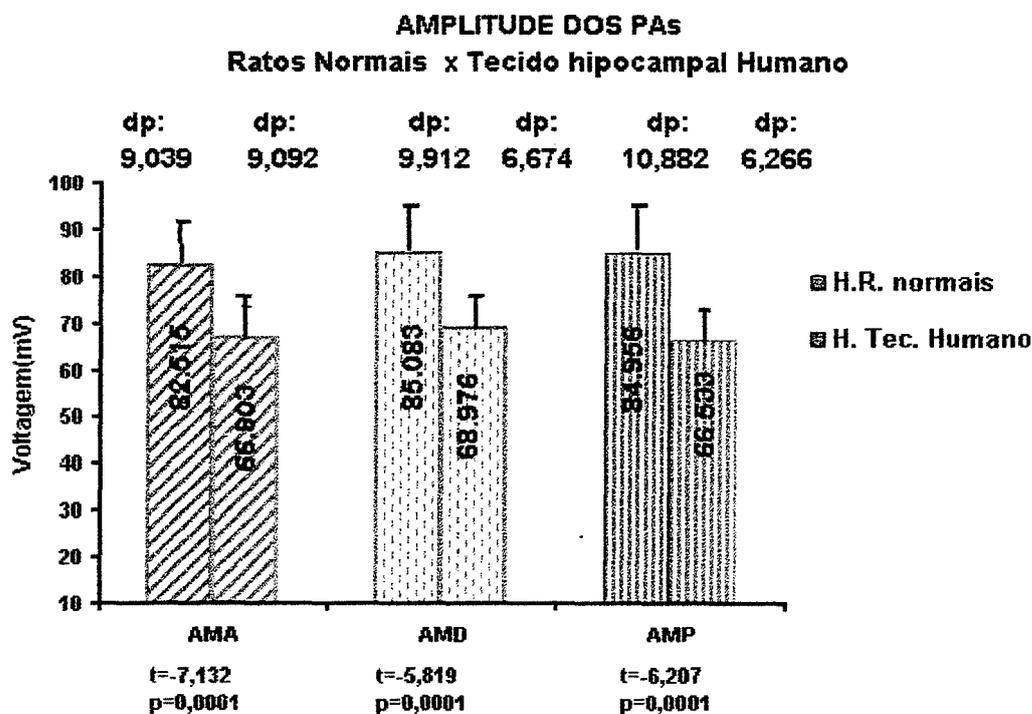


Gráfico 38. Representa as médias das correntes injetadas para o primeiro potencial de ratos normais e tecido Humano. Notar que existem diferenças significativas entre os dois grupos (*) nos três instantes analisados. Antes (AMA), durante (AMD) e depois (AMP) da passagem do Ringer livre de Mg^{2+}

*** Duração do potencial de Ação (DPM):**

A duração dos potenciais de ação foi outra propriedade a exibir diferenças entre os grupos em dois momentos do experimento. Antes do tratamento o grupo de neurônios hipocampais humanos apresentou potenciais de ação mais largos que o dos ratos normais ($p=0,001$). Esta característica se reflete no aparecimento de descargas em salva nos neurônios e será abordado posteriormente quando tentarmos classificar os neurônios de acordo com a constante de acomodação.

As neurônios humanos e de ratos também exibiram diferenças significativas durante a perfusão com Ringer 0 Mg^{+2} . ($p=0,007$). Já após a reversão para o Ringer normal as médias se igualaram ($p=0,467$). O gráfico 39 (ver Tabela 9) representa o comportamento dos grupos em função da troca do meio de perfusão. No decorrer do experimento os neurônios humanos iniciam com duração mais longas e a medida que transcorre o experimento ocorre um ligeiro declínio destes valores. Já o grupo de ratos exibem uma certa estabilidade de seus valores.

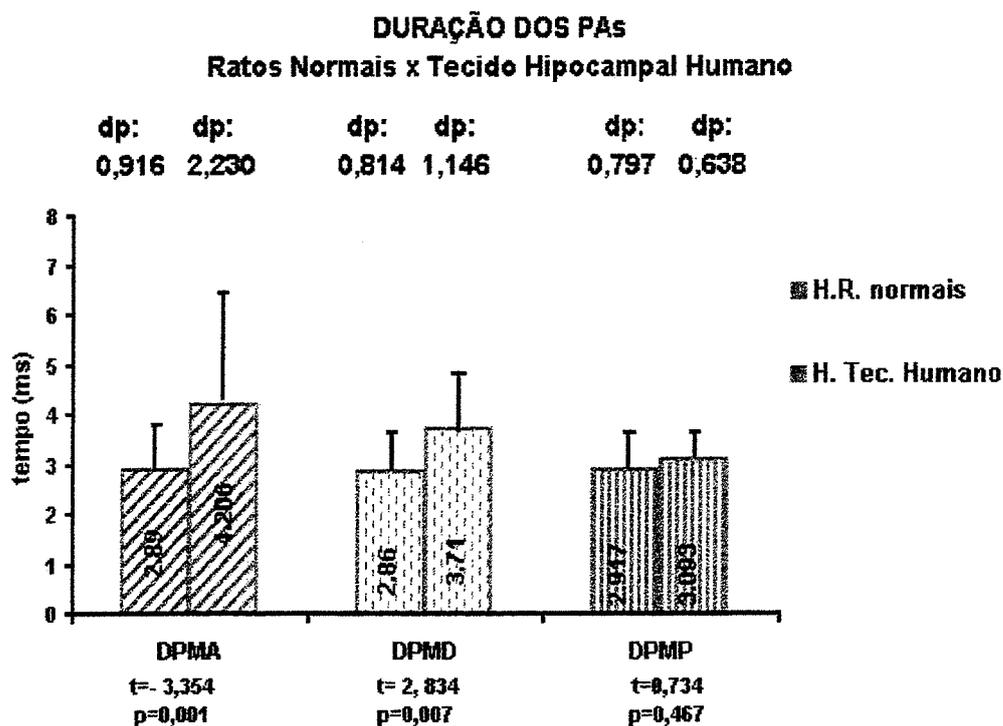


Gráfico 39: Representa a média da duração dos PAs de ratos normais e de tecido hipocampal humano em função do tempo (ms) de ratos normais. Houve diferenças significativas entre as populações antes (DPMA) e durante (DPMD). Após (DPMP) houve similaridade.

*** Potencial de Membrana ao final do potencial de Ação (Potencial de repolarização) (PPH):**

O Potencial de repolarização também apresentou diferenças significativas no transcorrer do experimento, antes e após a perfusão com o Ringer sem o Magnésio. O

gráfico 40 (ver tabela 9) mostra que os neurônios hipocampais humanos exibiram um PPH mais negativo durante todo o experimento, ao contrario dos ratos que apresentaram um nivelamento em torno dos -56 mV.

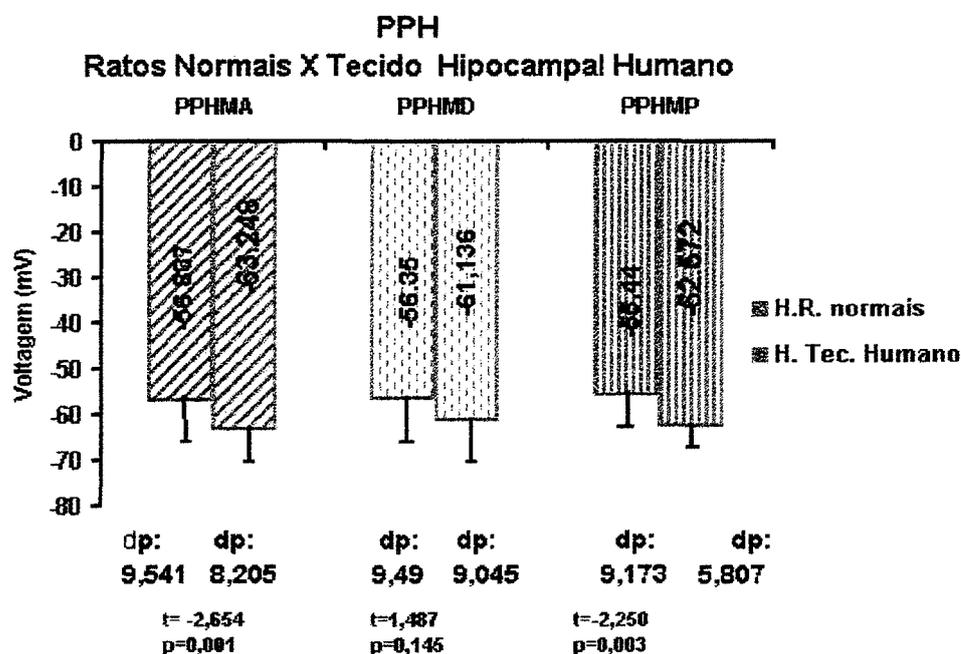


Gráfico 40: Representa a média dos PPHs de ratos normais e de tecido hipocampal humano em mV. Notar a existência de diferenças significativas entre as médias das populações (*), antes (PPHMA) e depois (PPHMP); não foi significativa a diferença entre as populações durante a perfusão em Ringer 0-Mg^{+2} (PPHMD)

TABELA 7- PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA: RATOS NORMAIS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

	PM			RE			CT		
	PMMA	PMMD	PMMP	REMA	REMD	REMP	CTMA	CTMA	CTMA
RATOS NORMAIS	67,514 ±7,46) (40)	-70,303 ±9,531 (24)	-75,223 ±15,003 (22)	43,558 ±8,842 (40)	50,808 ±17,069 (24)	55,714 ±23,310 (22)	9,46 ±3,736 (40)	7,749 ±4,913 (24)	10,085 ±3,593 (22)
TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO	-68.54 ±8,975 (30)	-69.145 ±10,482 (20)	-68.75 ±14,139 (16)	52.269 ±28,244 (30)	44,784 ±36,082 (20)	48,86 ± 38,334 (15)	7.528 ±4,509 (30)	9.941 ±4,542 (19)	10,926 ±6,38 (15)
T=	0,52	0,383	1,31	1,837	0,723	0,661	0,812	1,384	0,516
P=	0,601	0,703	0,195	0,07	0,473	0,512	0,419	0,173	0,608

PM. Potencial de membrana (PMMA antes, PMMD durante, PMMP depois)

RE. Resistência de Entrada

(REMA antes, REMD: durante e REMP depois)

CT. Constante de Tempo (CTMA antes, CTMD durante e

depois)

TABELA 8- PROPRIEDADES DO DISPARO: RATOS NORMAIS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

	CIPA			LAM			AM		
	CIPAA	CIPAD	CIPAP	LAMA	LAMD	LAMP	AMA	AMD	AMP
RATOS	0,35	0,09	0,44	-54,429	-54,608	-49,319	82,515	85,08	84,956
NORMAIS	±0,247	±0,376	±0,19	±9,955	±10,014	±9,014	±9,039	±9,912	±10,882
	(40)	(24)	(22)	(40)	(24)	(22)	(40)	(24)	(22)
TECIDO	0,176	0,2	0,375	-55,084	-54,512	-53,512	66,903	68,970	66,533
HIPOCAMPAL	±0,450	±0,701	±0,264	±8,023	±8,312	±6,569	±9,092	±6,674	±6,266
HUMANO	(30)	(20)	(16)	(30)	(20)	(15)	(30)	(20)	(15)
T=	2,019	0,653	0,842	-0,292	0,13	-0,029	-7,13	-5,819	-6,207
p=	0,04*	0,51	0,405	0,77	0,897	0,977	<0,001*	<0,001*	<0,001*

CIPAA: Corrente injetada para o primeiro potencial de ação (CIPAA antes, CIPAD: durante e CIPAP depois)

LAM: Limiar de disparo (LAMA antes. LAMP durante e LAMP depois) AM: Amplitude do Potencial de ação

(AMA antes. AMD durante e AMP depois)

TABELA 9- PROPRIEDADES DO DISPARO: RATOS NORMAIS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

	DPM			PPH		
	DPMA	DPMD	DPM P	PPHMA	PPHMD	PPHMP
RATOS	2,89	2,86	2,917	-56,837	-56,35	-55,44
NORMAIS	±0,916	±0,814	±0,797	±9,541	±9,495	±9,173
	(40)	(24)	(22)	(30)	(15)	(10)
TECIDO	4,206	3,71	3,09	-63,248	-61,136	-62,572
HIPOCAMPAL	±2,23	±1,146	±0,638	±8,205	±9,045	±5,807
HUMANO	(30)	(20)	(16)	(22)	(13)	(10)
t=	3,354	2,8340	0,734	-2,655	-1,487	-2,25
p=	0,001*	0,007*	0,467	0,01*	0,145	0,03*

DPM duração do potencial de ação (DPMA antes, DPMD durante e DPMP depois)

PPH Potencial de repolarização (PPHMA antes, PPHMD durante e PPHMP depois)

- HIPOCAMPOS DE RATOS EPILÉPTICOS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

Devido a similaridade de respostas da análise feita com o grupo anterior, nos deteremos em chamar a atenção dos pontos que diferiram da população anterior.

I. PROPRIEDADES PASSIVAS

* **Potencial de Membrana (PM):**

Tanto o gráfico 41 quanto a tabela 10 mostram a média do PM nos 2 grupos; de modo similar a análise anterior houve um discreto aumento dos PMs no decorrer do experimento. O grupo de ratos epiléticos sofreu um aumento ligeiramente mais expressivos do que os observados nas células humanas, porém esta polarização não reflete numa diferença significativa. No gráfico 41 podem ser observados os valores de “p” para cada momento experimental.

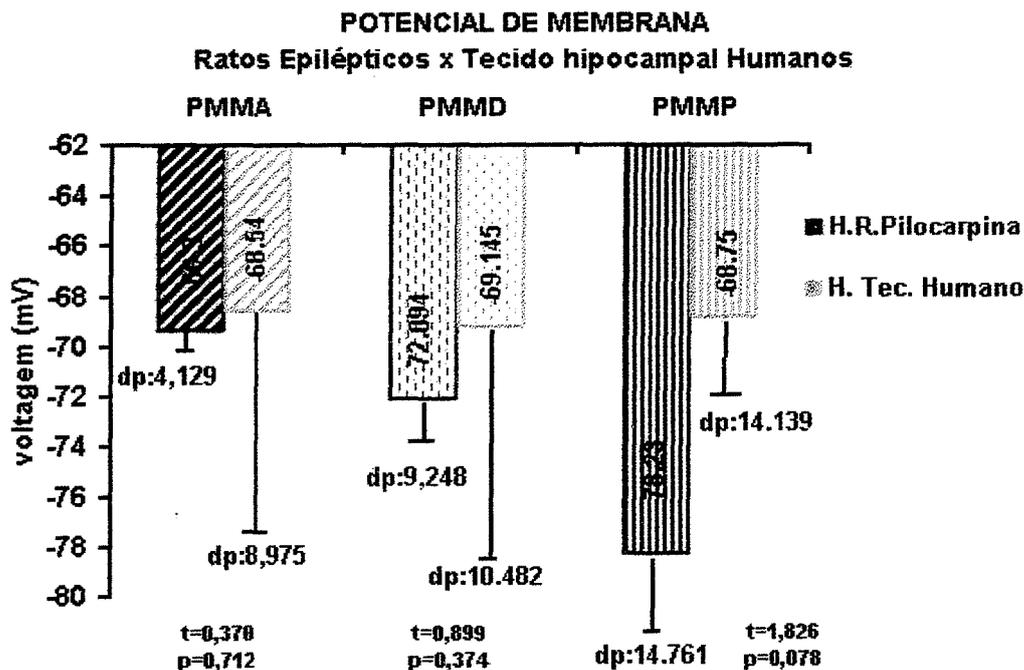


Gráfico 41: Representa as médias do potencial de membrana dos hipocampus de ratos epilépticos e tecido hipocampal humano estudados em mV: antes (PMMA), durante (PMMD) e depois (PMMP) da perfusão com o Ringer sem o Mg^{+2} . Não houve diferenças significativas entre os grupos.

*** Resistência de Entrada (RE):**

O gráfico 42 e a tabela 10 mostram que não houve uma variação expressiva das REs nos dois grupos estudados. O gráfico 42 mostra ainda um discreto e inexpressivo aumento das resistências no grupo de ratos epilépticos. No caso dos neurônios humanos a estabilidade de seus valores já foi comentado.

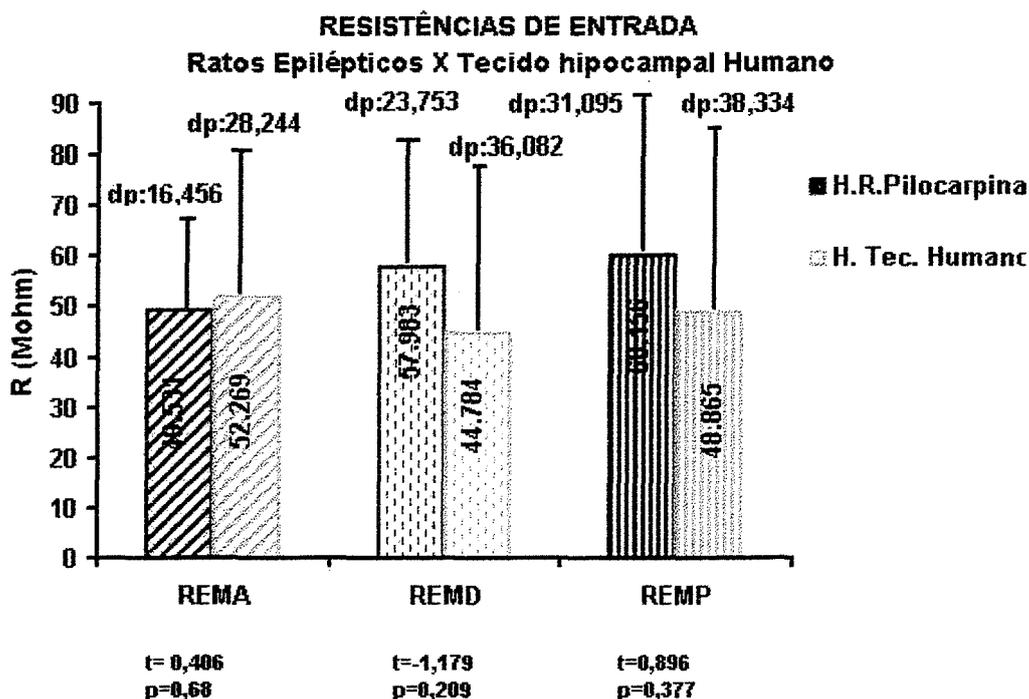


Gráfico 42: Representa as médias da RE de neurônios de CA1 de ratos epilépticos e neurônios hipocampais humanos nos diferentes momentos em $M\Omega$: antes (REMA); durante (REMD) e depois (REMP) da perfusão com Ringer $0-Mg^{+2}$. Não há diferença significativa entre as REs nos 2 grupos .

* Constante de Tempo:

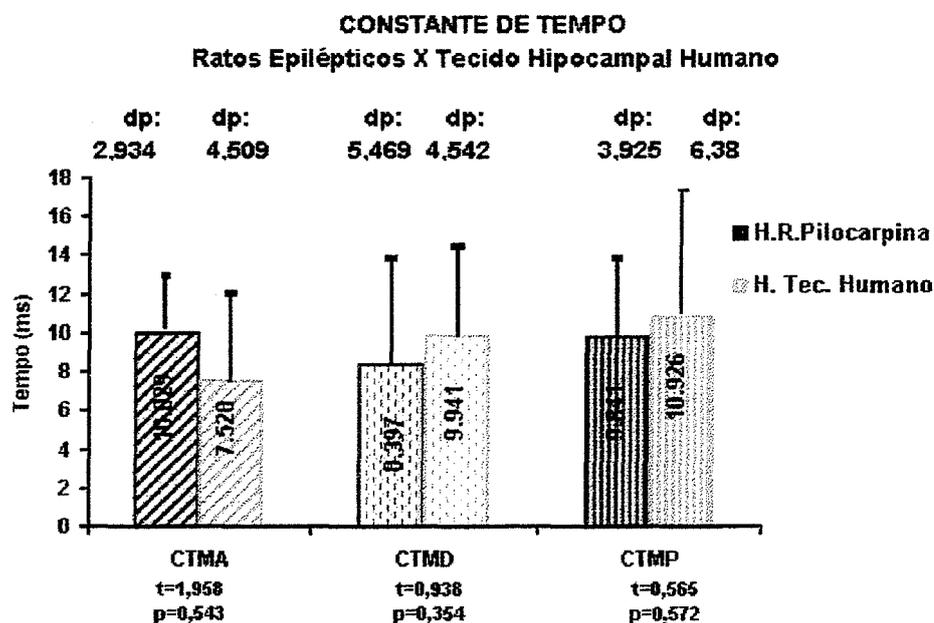


Grafico43-Representa as médias da constante de tempo de CA1 de ratos normais e tecido hipocampal humano nos diferentes momentos analisados em ms: antes (CTMA), durante (CTMD) e depois da perfusão com Ringer 0-Mg^{+2} (CTMP). Não há diferença significativa entre os grupos

II. PROPRIEDADES DO DISPARO:

* Corrente injetada para o primeiro potencial de Ação (CIPA):

O comportamento foi similar ao observado para ratos normais e tecido humano.

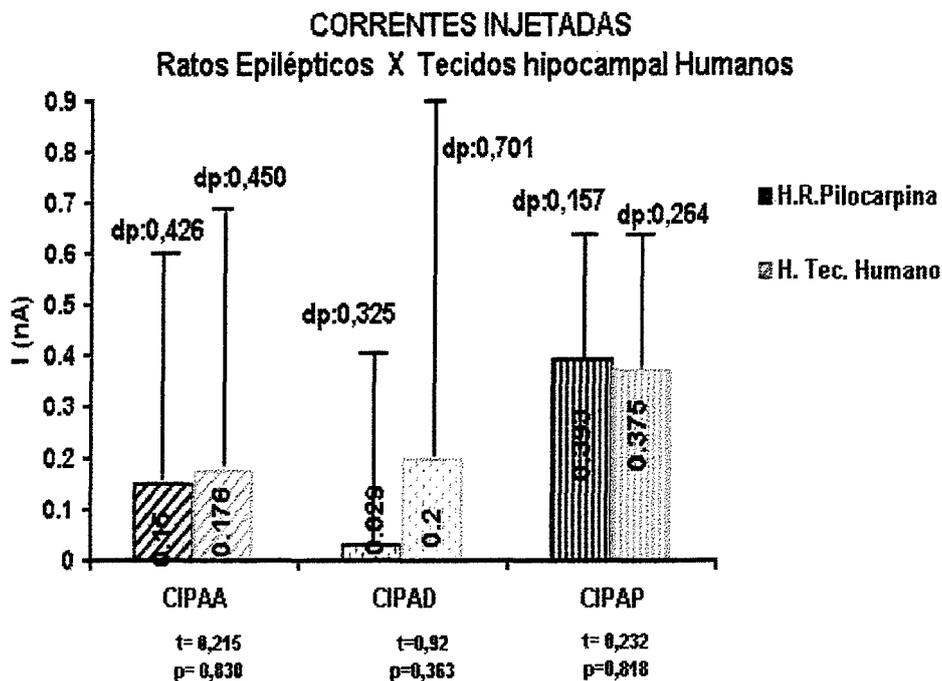


Gráfico 44 : Representa as médias das correntes injetadas dos neurônios de CA1 de ratos epilépticos e tecido hipocampal humano antes (CIPAA), durante a perfusão do Ringer livre de Mg²⁺ (CIPAD) e depois da perfusão com o Ringer normal , (CIPAP).

* Limiar de Disparo (LAM):

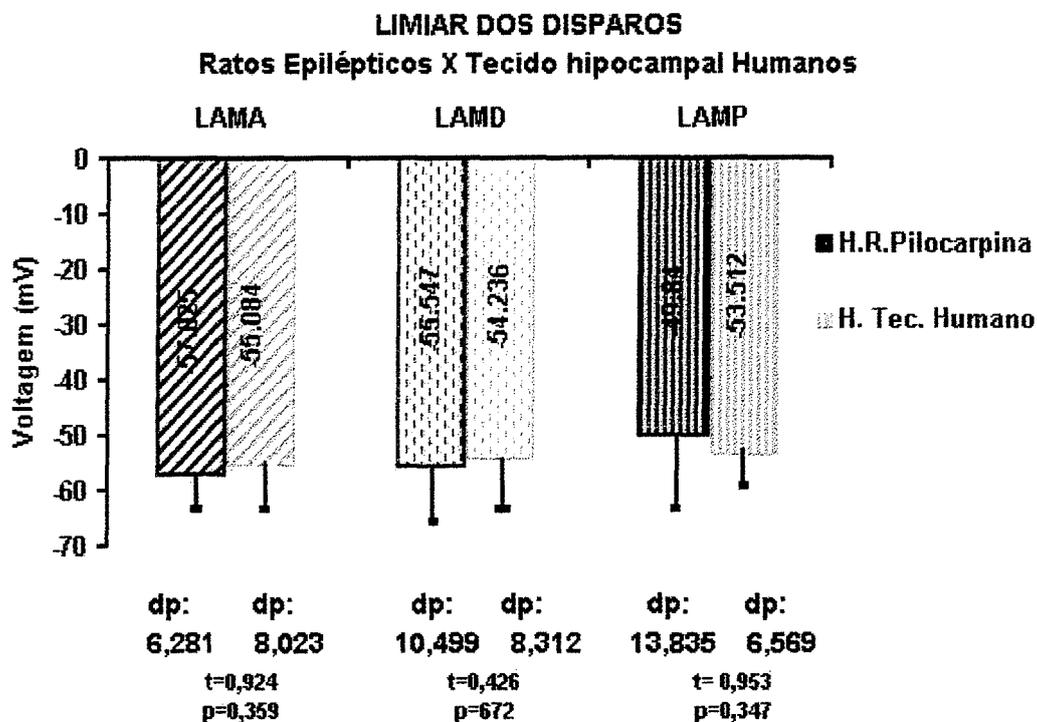


Gráfico 45: Representa as médias do limiar de disparo dos neurônios hipocampais de CA1 de ratos epiléptico e tecido hipocampal humano nos diferentes instantes medidos: antes (LAMA).durante (LAMD) e depois (LAMP) da perfusão com o Ringer livre de Mg^{2+} . Notar que não há diferença significativa entre as médias.

* **Amplitude do potencial de ação (AM):**

A análise similar foi similar aquela realizada nos ratos normais e tecido humano.

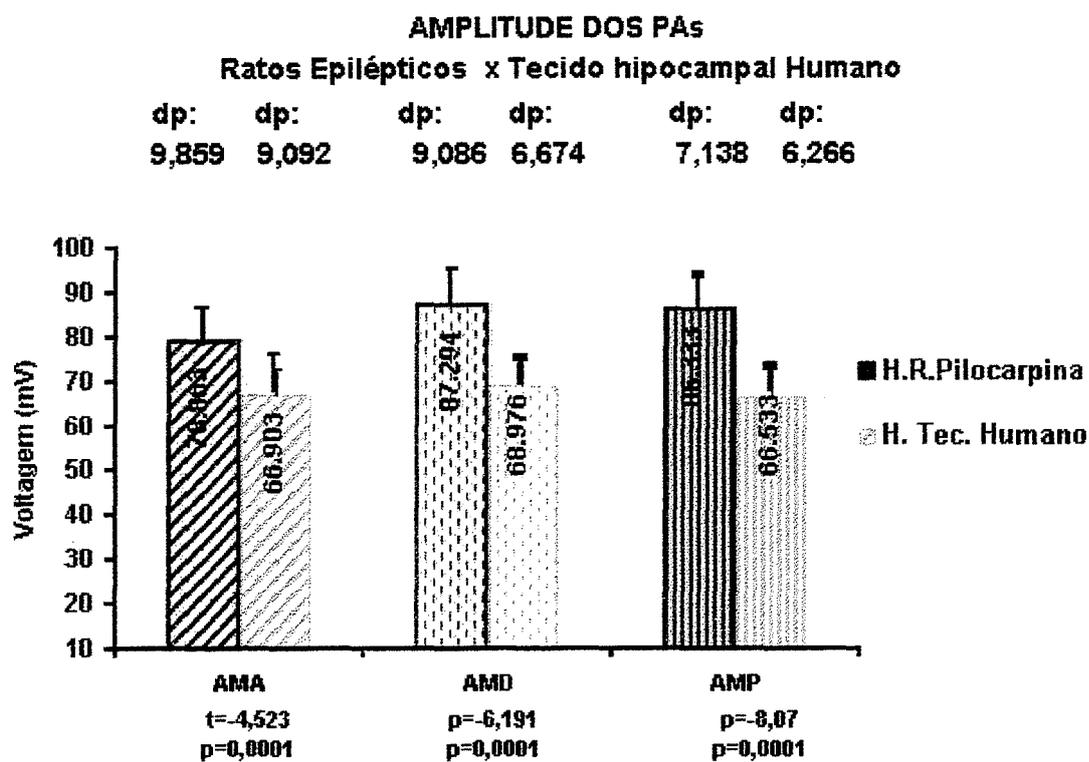


Gráfico 46. Representa as médias das correntes injetadas para o primeiro potencial de ratos epilépticos e tecido humano. Notar que existem diferenças significativas entre os dois grupos (*) nos três instantes analisados. Antes (AMA), durante (AMD) e depois (AMP) da passagem do Ringer livre de Mg^{2+} .

* **Duração do potencial de Ação (DPM):**

A análise foi similar a relatada no estudo de ratos normais x tecido humano.

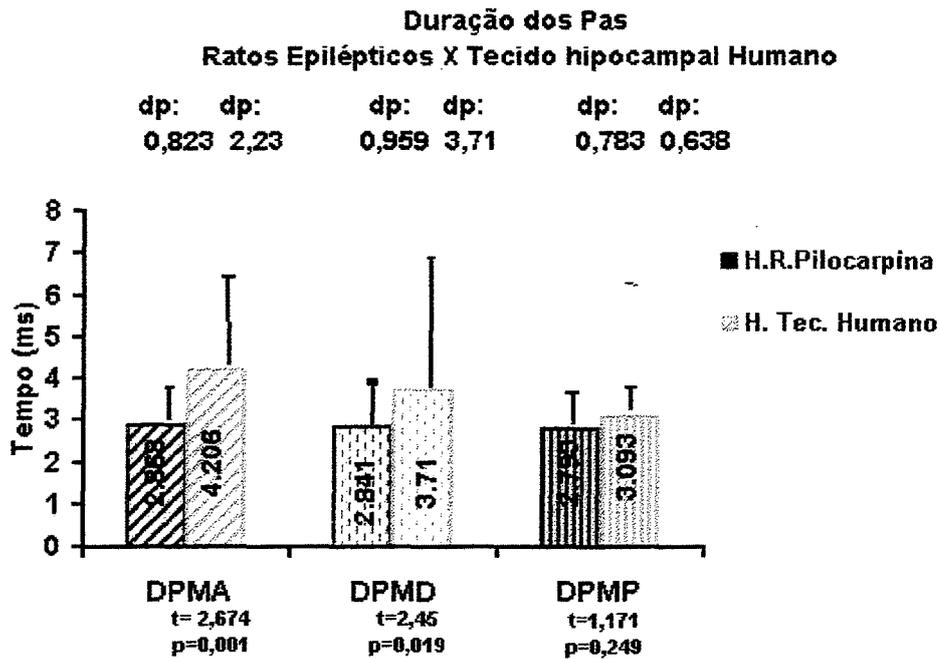


Gráfico 39: Representa a média da largura dos PAs de ratos epilépticos e de tecido hipocampal humano em ms. Houve diferenças significativas (*) entre as populações antes (DPMA) e durante (DPMD).

* Potencial de Membrana ao final do potencial de Ação (Potencial de repolarização):

A análise foi similar a relatada no estudo de ratos normais x tecido hipocampal humano.

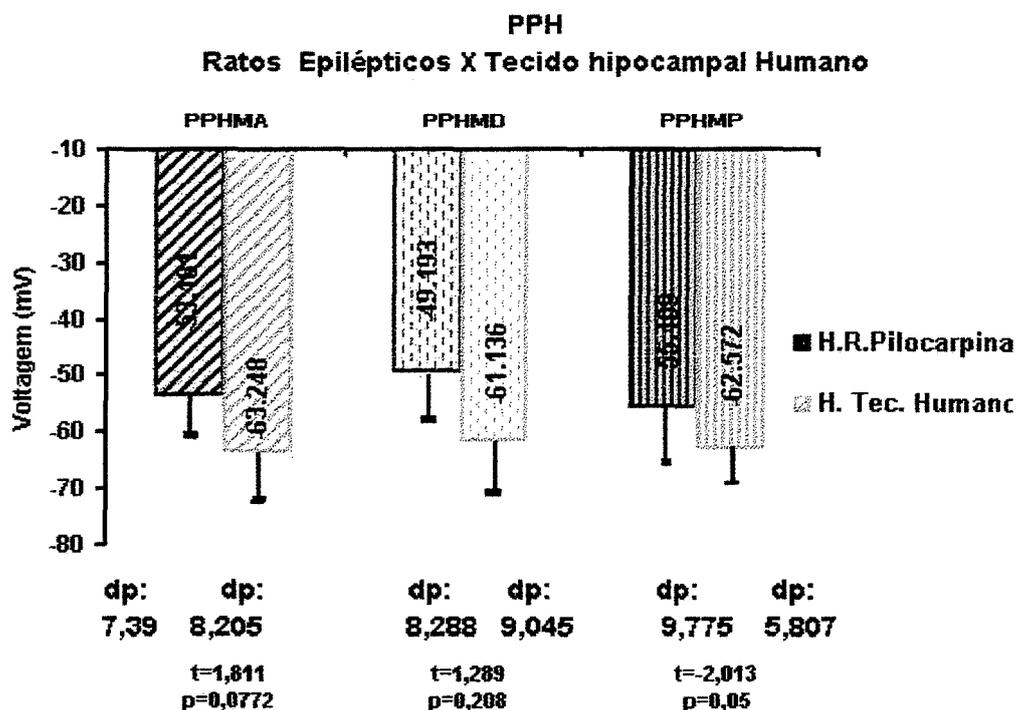


Gráfico 48: Representa a média dos PPHs de ratos epilépticos e de tecido hipocampal humano em mV. Não houve diferença significativa entre as médias das populações, antes (PPHMA), durante (PPHMD) e depois (PPHMP) da perfusão com Ringer 0-Mg⁺².

TABELA 10- PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA: RATOS EPILÉPTICOS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

	PM			RE			CT		
	PMMA	PMMD	PMMP	REMA	REMD	REMP	CTMA	CTMA	CTMA
RATOS EPILÉPTICOS	-69,309	-72,094	-78,23	49,531	57,983	60,156	10,209	8,397	9,841
	±4,129	±9,248	±14,761	±16,456	±23,753	±31,095	±2,934	±5,469	±3,925
	(22)	(17)	(15)	(22)	(17)	(15)	(22)	(17)	(15)
TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO	-68.54	-69.145	-68.75	52.269	44,784	48,86	7.528	9.941	10,926
	±8,975	±10,482	±14,139	±28,244	±36,082	± 38,334	±4,509	±4,542	±6,38
	(30)	(20)	(16)	(30)	(20)	(15)	(30)	(19)	(15)
t=	0,370	0,899	1,826	0,406	1,279	0,896	-2,433	0,938	0,55
p=	0,712	0,374	0,078	0,686	0,209	0,377	0,01*	0,354	0,576

PM. Potencial de membrana (PMMA antes, PMMD durante, PMMP depois)

RE. Resistência de Entrada

(REMA antes, REMD: durante e REMP depois)

CT. Constante de Tempo (CTMA antes, CTMD durante e

depois)

TABELA 11- PROPRIEDADES DO DISPARO : RATOS EPILEPTICOS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

	CIPA			LAM			AM		
	CIPAA	CIPAD	CIPAP	LAMA	LAMD	LAMP	AMA	AMD	AMP
RATOS	0,15	0,029	0,393	-57,025	-55,576	-49,84	78,863	87,294	86,333
EPILEPTICOS	±0,426	±0,325	±0,157	±6,281	±10,499	±13,835	±9,852	±9,86	±7,138
	(22)	(17)	(15)	(22)	(17)	(15)	(22)	(17)	(15)
TECIDO	0,176	0,2	0,375	-55,084	-54,512	-53,512	66,903	68,970	66,533
HIPOCAMPAL	±0,450	±0,701	±0,264	±8,023	±8,312	±6,569	±9,092	±6,674	±6,266
HUMANO	(30)	(20)	(16)	(30)	(20)	(15)	(30)	(20)	(15)
t=	0,215	0,920	0,232	0,924	0,426	-0,953	-4,523	-6,197	-8,073
p=	0,8300	0,36	0,816	0,359	0,672	0,347	<0,001*	<0,001*	<0,001*

CIPAA: Corrente injetada para o primeiro potencial de ação (CIPAA antes, CIPAD: durante e CIPAP depois)

LAM: Limiar de disparo (LAMA antes. LAMP durante e LAMP depois) AM: Amplitude do Potencial de ação

(AMA antes. AMD durante e AMP depois)

TABELA 12- PROPRIEDADES DO DISPARO : RATOS EPILÉPTICOS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO

	DPM			PPH		
	DPMA	DPMD	DPMP	PPHMA	PPHMD	PPHMP
RATOS	2,868	2,841	2,793	-53,181	-49,84	-55,409
EPILÉPTICOS	±0,823	±0,959	±0,783	±7,39	±8,288	±9,775
	(22)	(17)	(15)	(20)	(16)	(11)
TECIDO	4,206	3,71	3,09	-63,248	-61,136	-62,572
HIPOCAMPAL	±2,23	±1,146	±0,638	±8,205	±9,045	±5,807
HUMANO	(30)	(20)	(16)	(22)	(13)	(10)
t=	2,674	2,45	1,17	-0,181	1,289	-2,01
p=	0,01*	0,01*	0,249	0,07	0,208	0,058

DPM duração do potencial de ação (DPMA antes, DPMD durante e DPMP depois)

PPH Potencial de repolarização (PPHMA antes, PPHMD durante e PPHMP depois)

3. CLASSIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS DE ACORDO COM OS PADRÕES DE RESPOSTA NEURONAL:

Alguns critérios fisiológicos podem ser usados para classificar os neurônios, como por exemplo propriedades intrínsecas da membrana. Para classificar os neurônios de acordo com o padrão de resposta foi utilizada a metodologia e os critérios citados no item padrão de respostas neuronais do material e métodos. Os quadros 1 e 2 resumem a classificação usada no presente estudo.

QUADRO 1 Classificação dos tipos de neurônios encontrados (Connors e Amitay,1993:

Célula:	
RS*	Células com Espículas de intervalos regulares
FS*	Células com Espículas com intervalos curtos
CDS	Células com descargas em salva

(*) do inglês : “regular spikes” (RS) e “ fast spikes” (FS)

Quadro2 : Classificação quanto a presença ou ausência de descargas em salva

Sem descargas em salva (CSDS)	Células que geram PA simples e independentes que apresentam acomodação como resposta a todos os estímulos supralimíares
--------------------------------------	---

- Com descargas em salva (CDS)**
- CDS de alto limiar (CDSAL): somente em resposta a estímulos supra-limiaries de alta intensidade.
 - CDS de baixo limiar (CDSBL): células que respondem com uma salva de potenciais de ação a qualquer estímulo. Foi subdividido em 3 diferentes subgrupos de sensibilidade crescente para gerar respostas em descargas em salva

Para identificar os diferentes tipos neurônios foram aplicados pulsos quadrados de 200 ms de duração . O registro escolhido para esta análise com o número máximo de espículas (PA) com a aplicação de corrente (0,1 à 1,0 nA,) sem que afetasse a amplitude das espículas

As curvas de Frequência/ Tempo mostram os diferentes padrões de acomodação neuronal.

- RATOS NORMAIS , RATOS EPILÉPTICOS e TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

Os padrões de disparos dos neurônios de ratos normais, epiléticos e tecido hipocampal humano foram similares.. Assim resolvemos. agrupá-los e identificar as diferenças.

Inicialmente explicaremos, os registros que representam os padrões de respostas encontradas nos hipocampos de ratos normais e epiléticos. Posteriormente serão relatados como foi a distribuição destes padrões nos dois grupos estudados.

- PADRÕES OBSERVADOS:

- A. SEM DESCARGAS EM SALVA:

- ◆ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO A

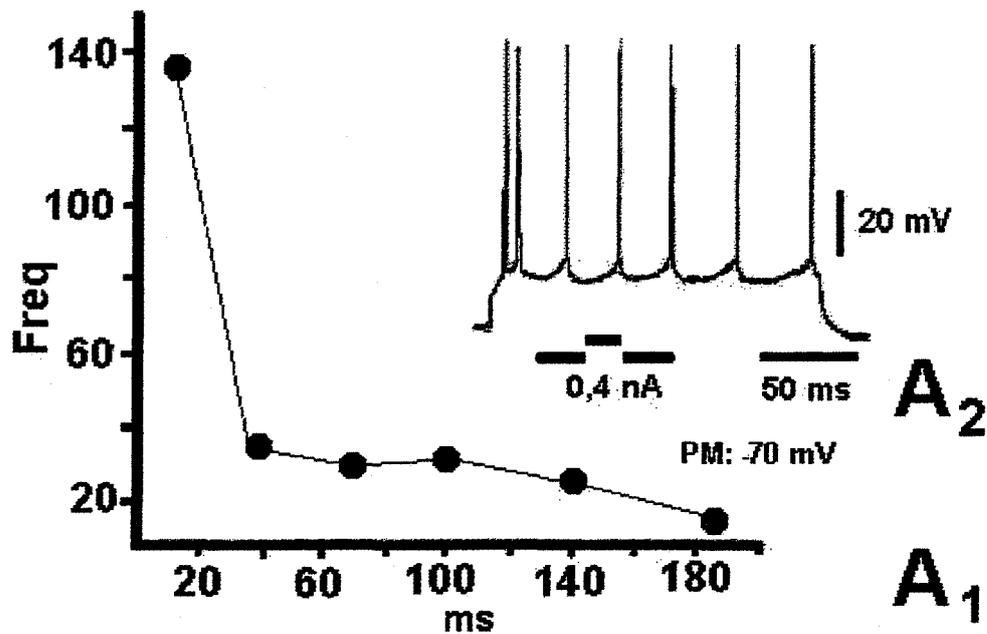


Fig.7. Mostra em A₁) Curva da Frequência / ms indicando o padrão de acomodação neuronal. Inicialmente este neurônio apresentou uma alta frequência, houve uma drástica queda das mesmas e por fim uma estabilidade. A₂) a resposta de um neurônio com a aplicação de 0,4 nA de corrente. Notar: intervalo regular entre um potencial de ação e outro

◆ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO - B

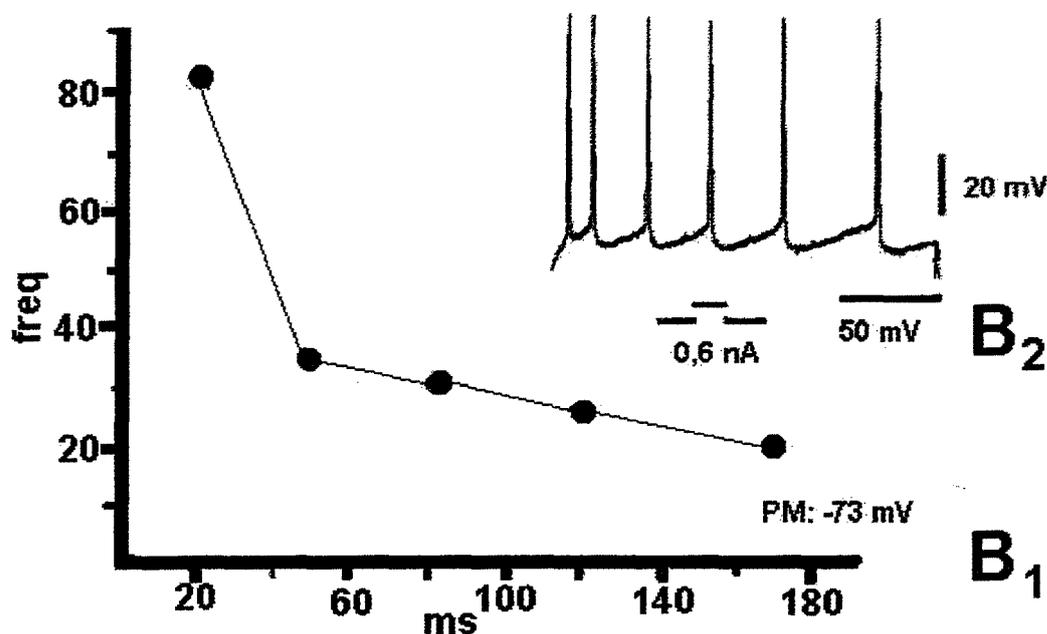


Fig.8. Mostra em B₁) Curva da frequência em função do tempo indicando a acomodação neuronal. B₂) a resposta de um neurônio a aplicação de 0,8 nA de corrente. Notar: intervalo regular, porém mais esparsos, entre um potencial de ação e outro Inicialmente este neurônio apresentou uma alta frequência de PA e após ocorreu uma queda atenuada.

◆ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO C

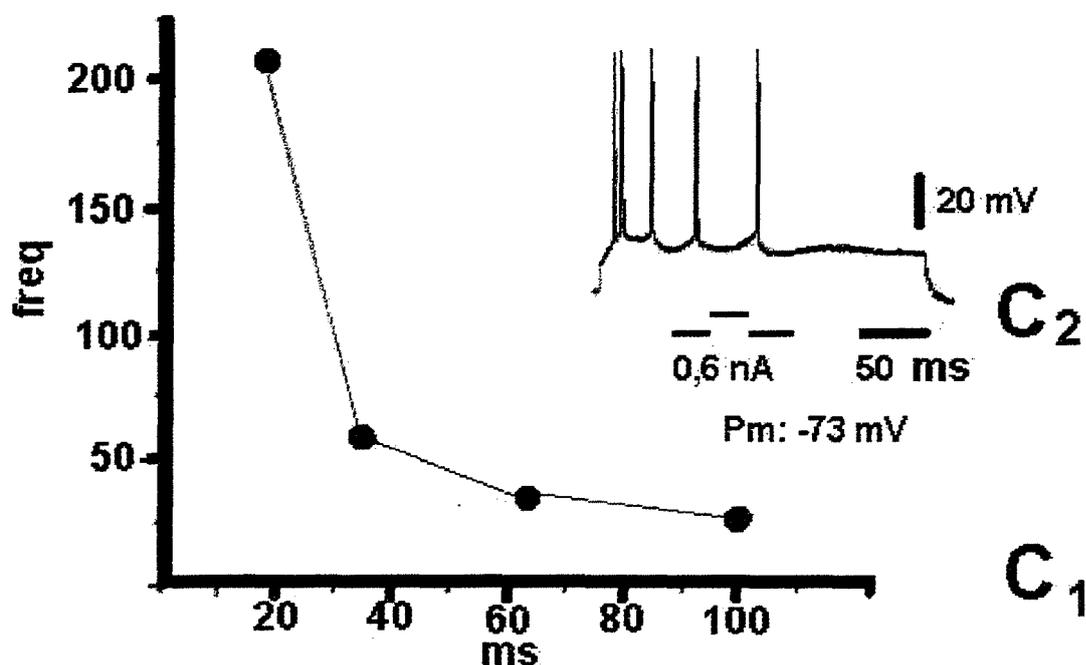


Fig.9. Mostra em C₁) Curva da frequência em função do tempo indicando o comportamento da acomodação neuronal. Inicialmente este neurônio apresentou uma alta frequência, houve uma drástica queda terminando de forma estável. C₂) a resposta de um neurônio a aplicação de 0,6 nA de corrente. Notar: intervalo regular entre os PAs porém a partir da metade do pulso houve uma interrupção dos potenciais de ação

◆ **NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO D**

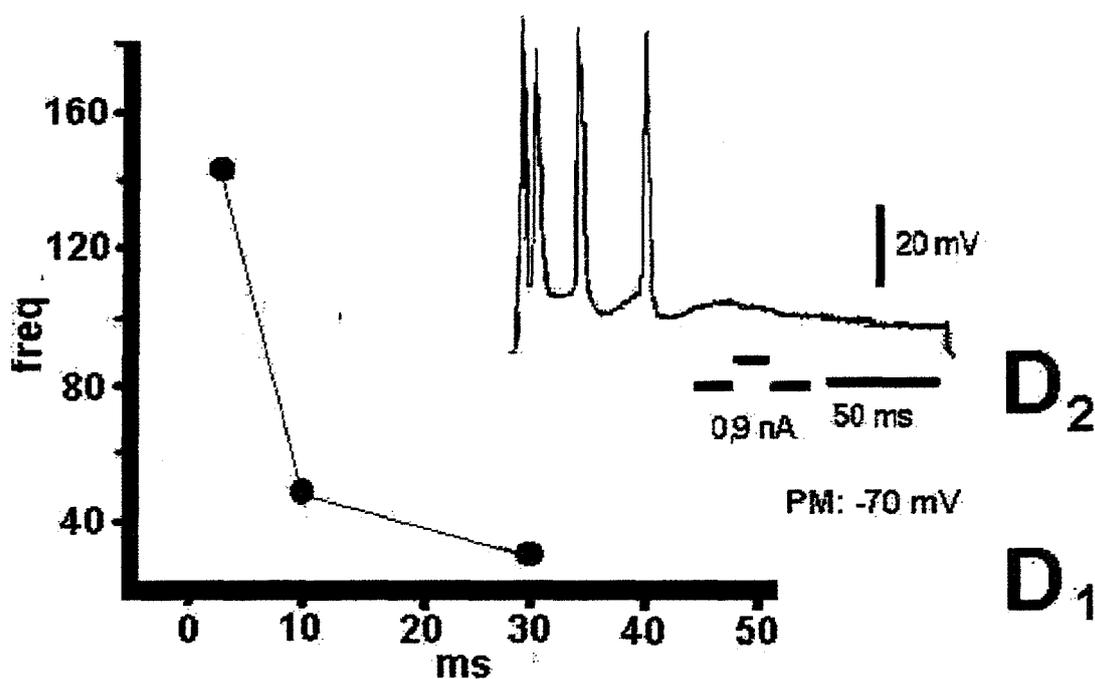


Fig.10. Mostra em D₁) Curva da frequência em função do tempo indicando o comportamento da acomodação neuronal. Inicialmente este neurônio apresentou uma alta frequência, após houve uma drástica queda, continuando a cair de uma forma mais tênue D₂) a resposta de um neurônio a aplicação de 0,9 nA de corrente. Notar: intervalo ainda regular entre um potencial de ação e outro, ocorrendo a interrupção dos disparos a partir da porção média do pulso

◆ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO E

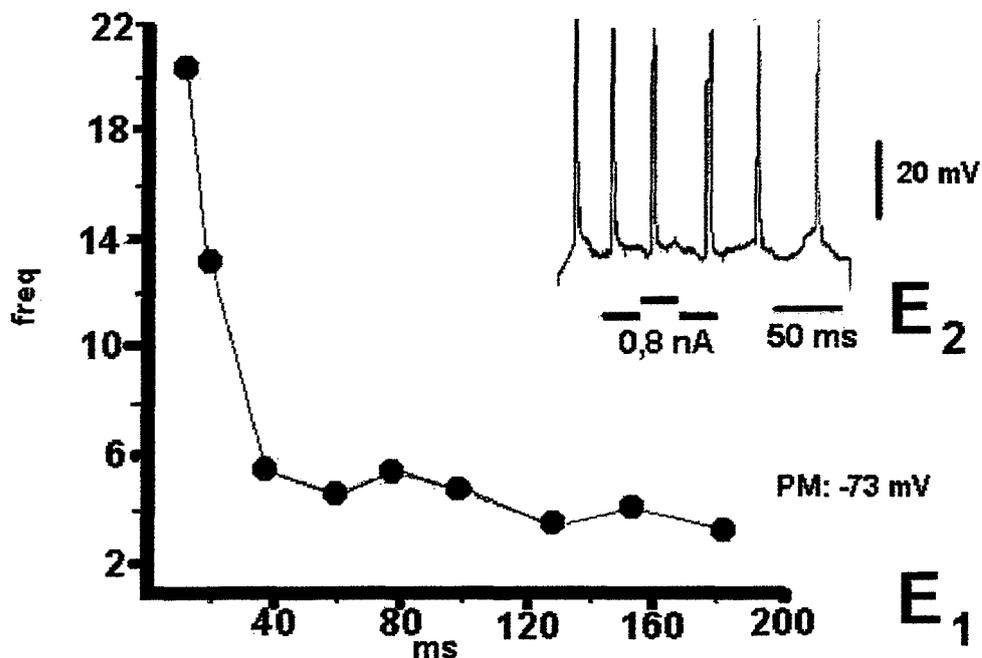


Fig.11. Mostra em E₁) Curva da Frequência em função do tempo indicando o comportamento da acomodação neuronal. Inicialmente este neurônio apresentou uma alta frequência com uma drástica queda das mesma e por fim oscilações nas frequências. E₂) a resposta de um neurônio a aplicação de 0,8 nA de corrente.. Notar: intervalo relativamente regular entre um potencial de ação e outro.

B. COM DESCARGAS EM SALVA:

◆ NEURÔNIO: CDSBL-DS TIPO I

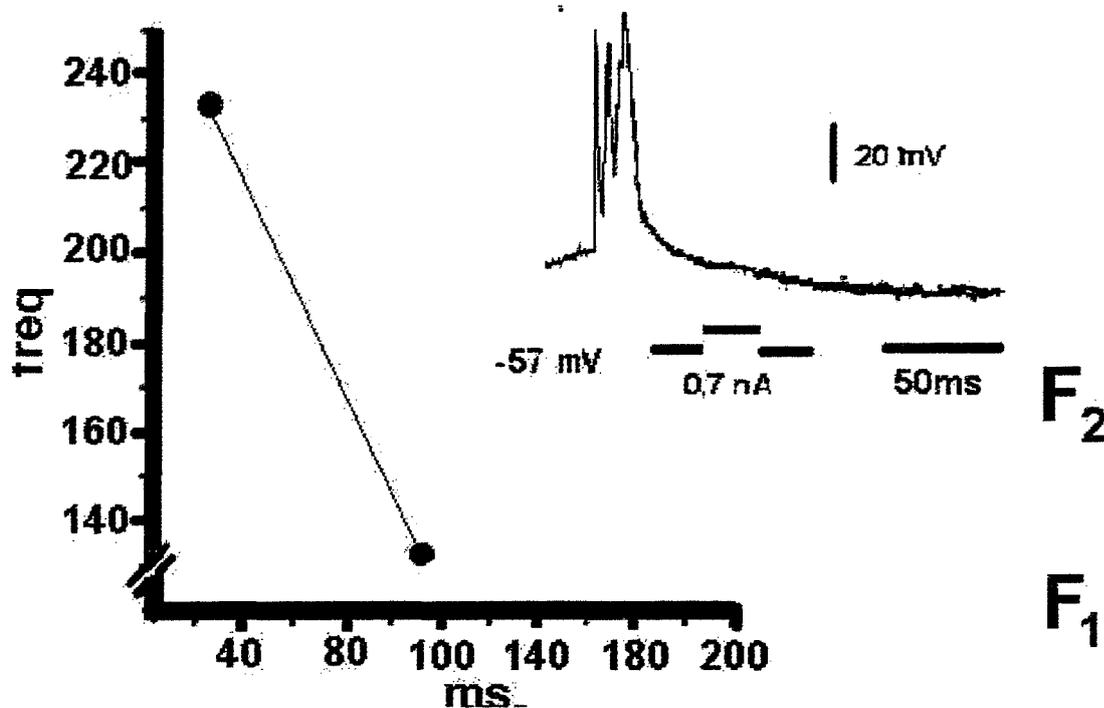


Fig.12. Mostra em F₁) Curva freqüência/tempo (ms) com o padrão de acomodação, inicialmente com alta freqüência e depois a queda drástica da mesma. F₂) Registro IC do mesmo neurônio com descarga em salva. Este neurônio apresentou este tipo de disparo com a aplicação de 0,1 nA (3 disparos). A figura mostra a resposta com a aplicação de 0,4 nA. O número de disparos se manteve constante independente da corrente injetada

◆ NEURÔNIO: CDSAL-DS TIPO IIa:

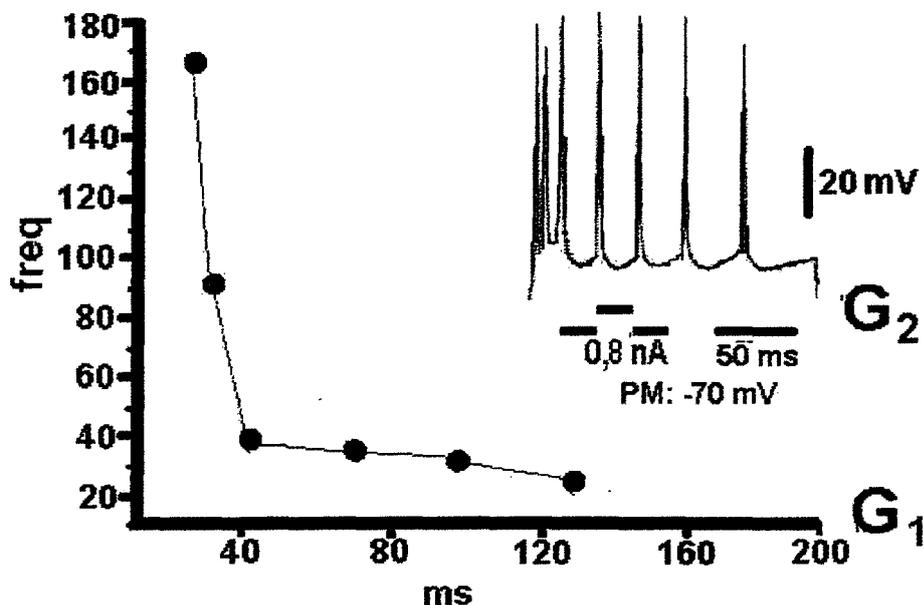


Fig.13. Mostra em G_1) a Curva freqüência/tempo com o padrão de acomodação, inicialmente com alta freqüência, que continua com uma queda gradual e por fim a uma relativa estabilidade. G_2) um neurônio com descargas em salva. Este neurônio disparou esta atividade com 0,8 nA, seguido por outros PAs com intervalos regulares.

◆ NEURÔNIO DO TIPO :CDSAL-DS TIPO IIb

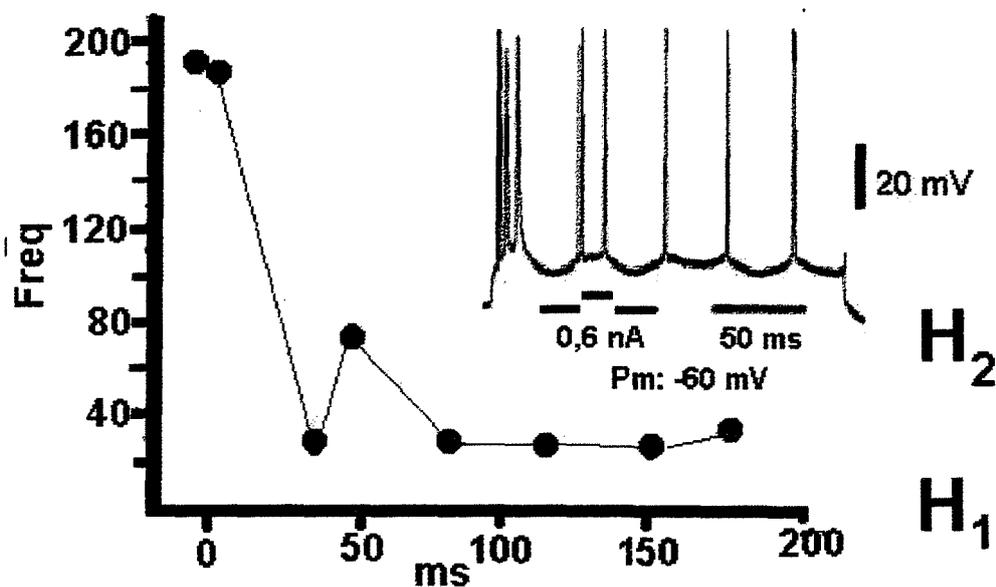


Fig.14. Mostra em H₁) Mostra a curva frequência/tempo (ms) com o padrão de acomodação complexo onde inicialmente apresenta dois disparos com alta frequência seguido por uma queda brusca e novamente uma leve subida para depois novamente cair .H₂) um neurônio com descargas em salva., esta atividade foi observada pela primeira vez com a aplicação de 0,3 nA. A figura mostra a resposta com a aplicação de 0,6 nA. Após o aparecimento desta atividade seguem dois PAs próximos e três simples com intervalos regulares mais espaçados que o neurônio anterior.

◆ **NEURÔNIO DO TIPO :CDSAL-DS TIPO IIc**

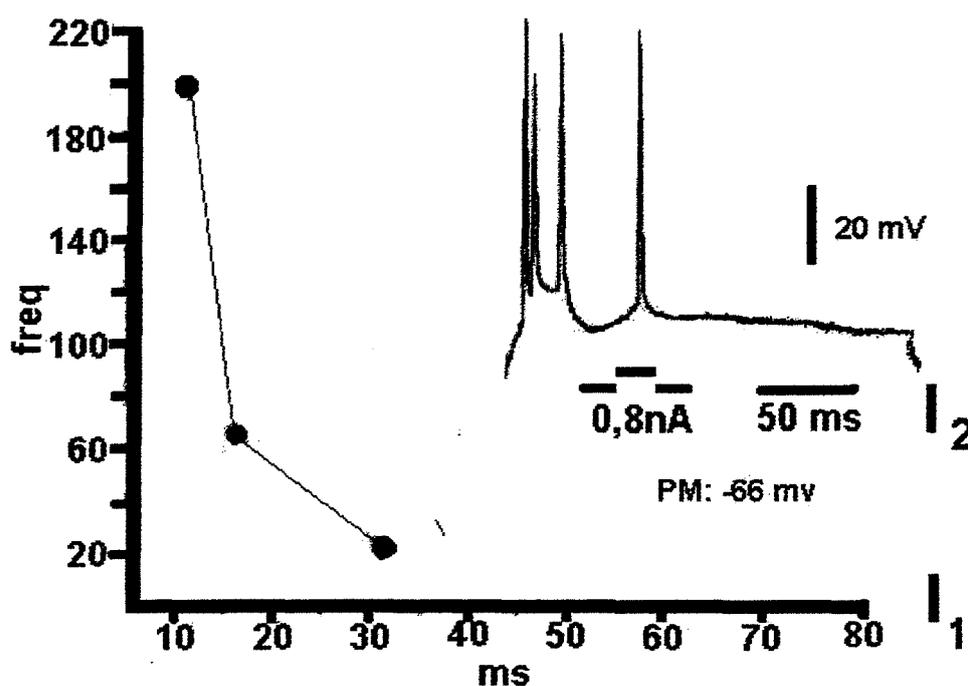


Fig.15. Mostra em I₁). Curva frequência/tempo (ms) o padrão de acomodação apresenta um disparo com alta frequência e a seguir uma queda que é interrompida antes da estabilização. I₂)Este neurônio disparou este tipo de disparo com a aplicação de 0,6 nA (3 disparos).A figura mostra a resposta com a aplicação de 0,9 nA. O numero PAs não aumentou com o a aplicação de correntes positivas. Após as descargas em salva segue 1 apenas 1 disparo.

• TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

Os neurônios Humanos além de apresentarem padrões comuns aos observados em ratos, apresentaram mais diversificação que serão mostradas a partir de agora. Foram utilizados os mesmos critérios dos quadros 1 e 2.

* CÉLULAS SEM DESCARGAS EM SALVA:

♦ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO F

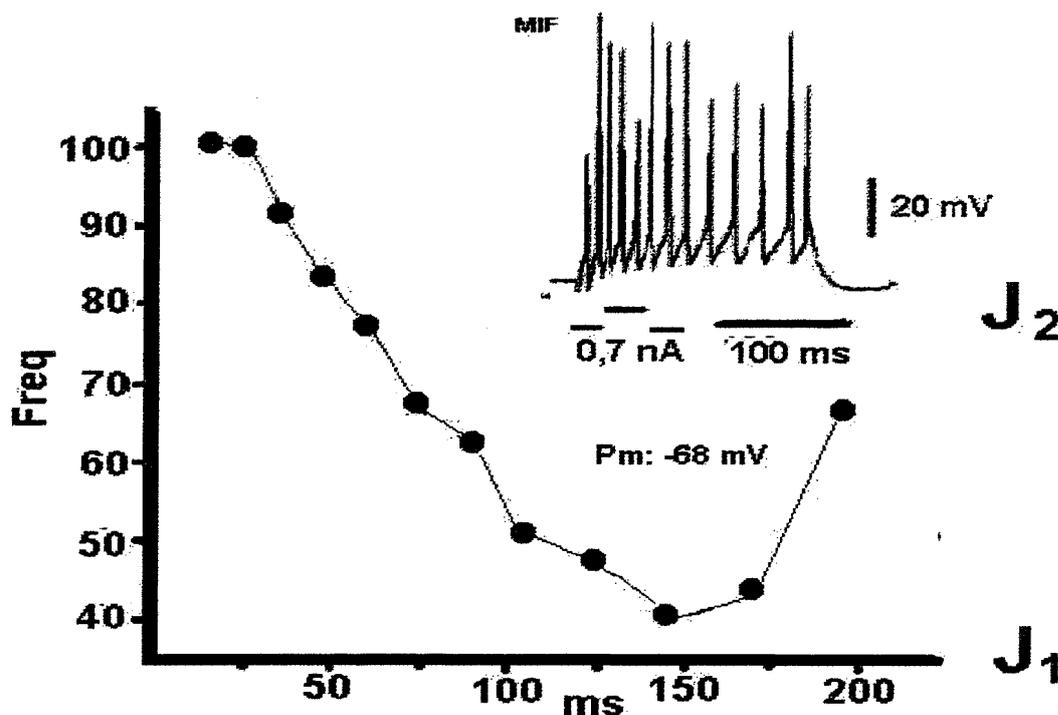


Fig.16. Mostra em J₁) Mostra a Curva frequência/tempo (ms) A resposta de acomodação apresenta um disparo com alta frequência e a seguir uma queda que é interrompida antes da estabilização. J₂). Este neurônio disparou potenciais de ação em intervalos mais curtos com a aplicação de 0,7 nA.

◆ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO G

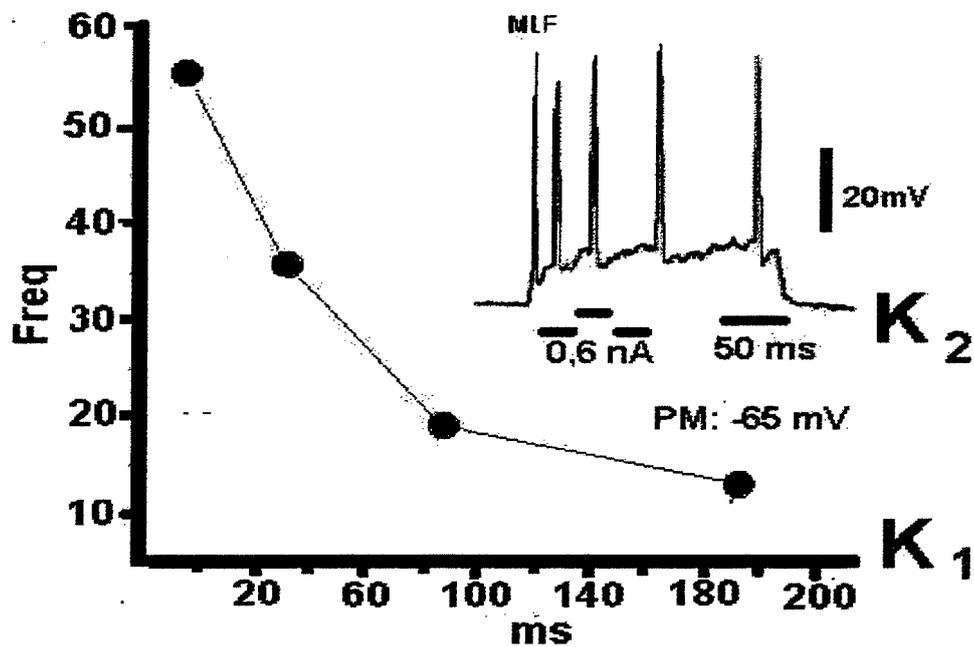


Fig.17. Mostra em K_1). Curva frequência/tempo (ms) A resposta de acomodação apresenta um disparo com alta frequência e a seguir uma queda gradual. K_2) Este neurônio disparou potenciais de ação em intervalos longos com a aplicação de 0,6 nA.

◆ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO H

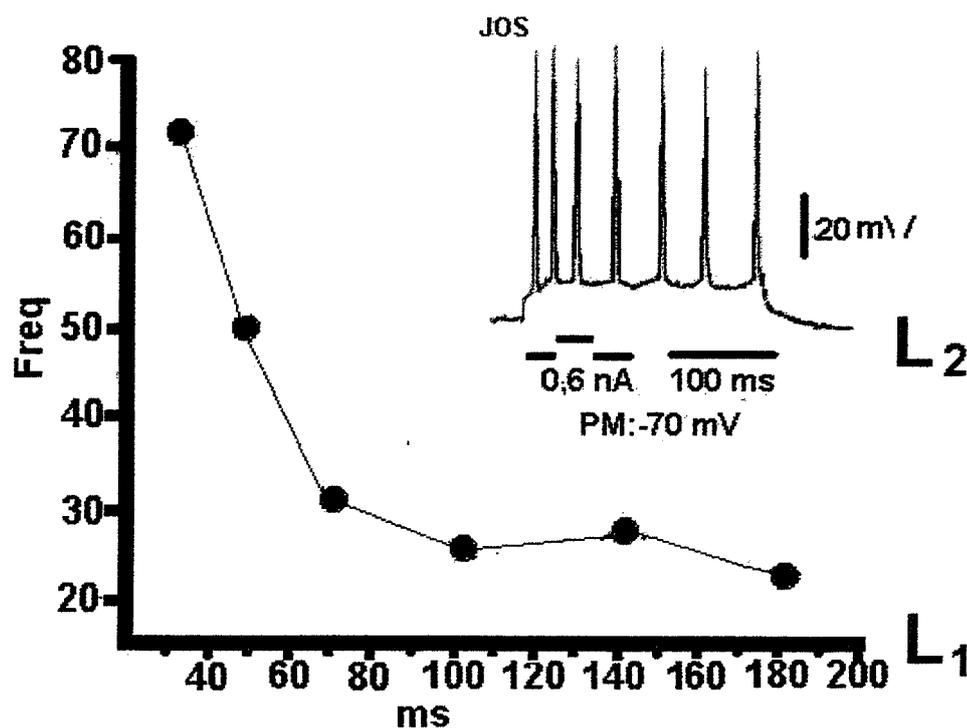


Fig.18. Mostra em L₁). Curva frequência/tempo (ms) A resposta de acomodação apresenta um disparo com alta frequência e a seguir uma queda gradual, acompanhado por um ligeiro aumento e por fim a estabilização L₂) Este neurônio disparou potenciais de ação em intervalos regulares de intervalos intermediários, se comparados com CSDS-RS TIPO F e CSDS-RS TIPO G, a aplicação de 0,6 nA

◆ **NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO I**

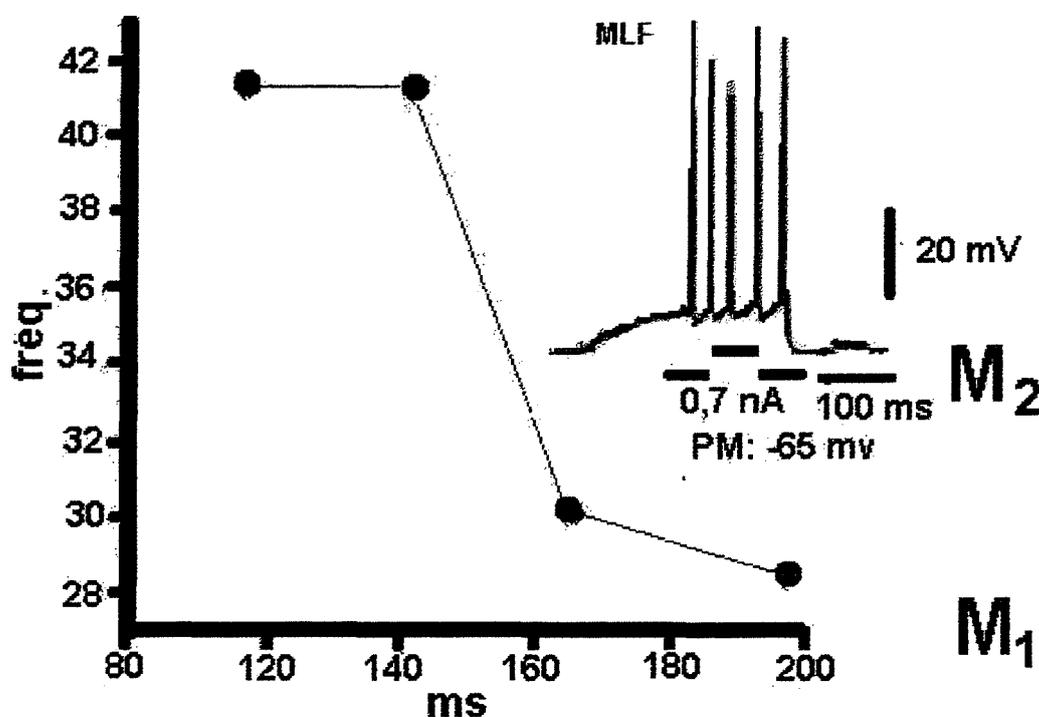
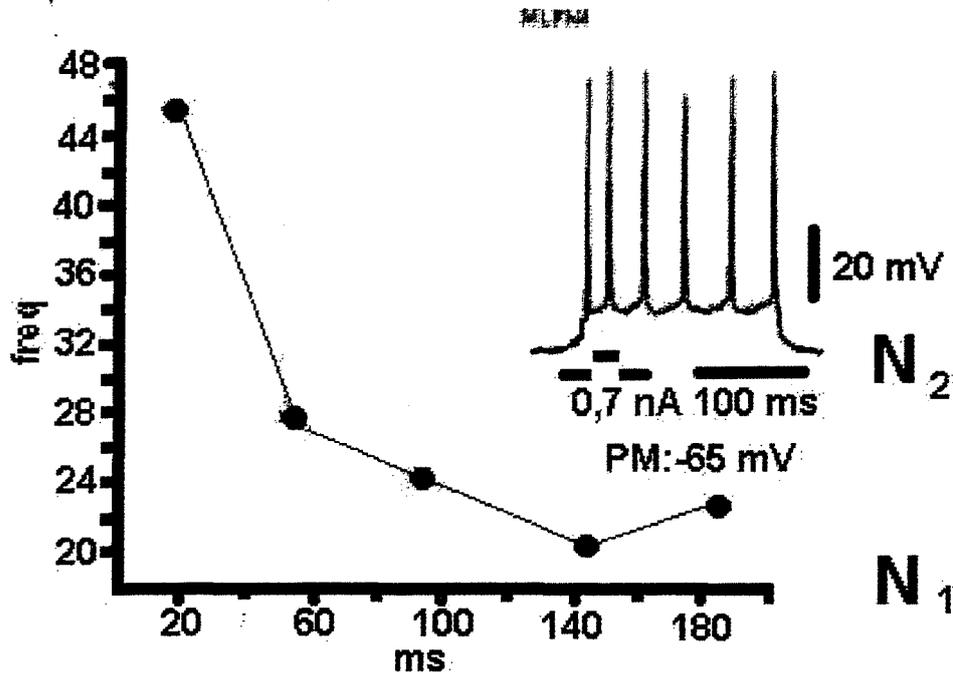


Fig.19. Mostra em M₁) Mostra a Curva frequência/tempo (ms) Neste neurônio registrou-se apresenta dois disparos iguais e de alta frequência e a seguir uma queda brusca, tendendo a uma estabilização no final.
M₂) Apresenta um neurônio que apesar da aplicação de 0,7 nA, apresentou um período de latência para depois disparar potenciais de ação com intervalos, entre os disparos relativamente curtos e intermediários se comparados com CSDS-RS TIPO F e CSDS-RS TIPO H.

◆ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO J



◆ NEURÔNIO: CSDS-FS

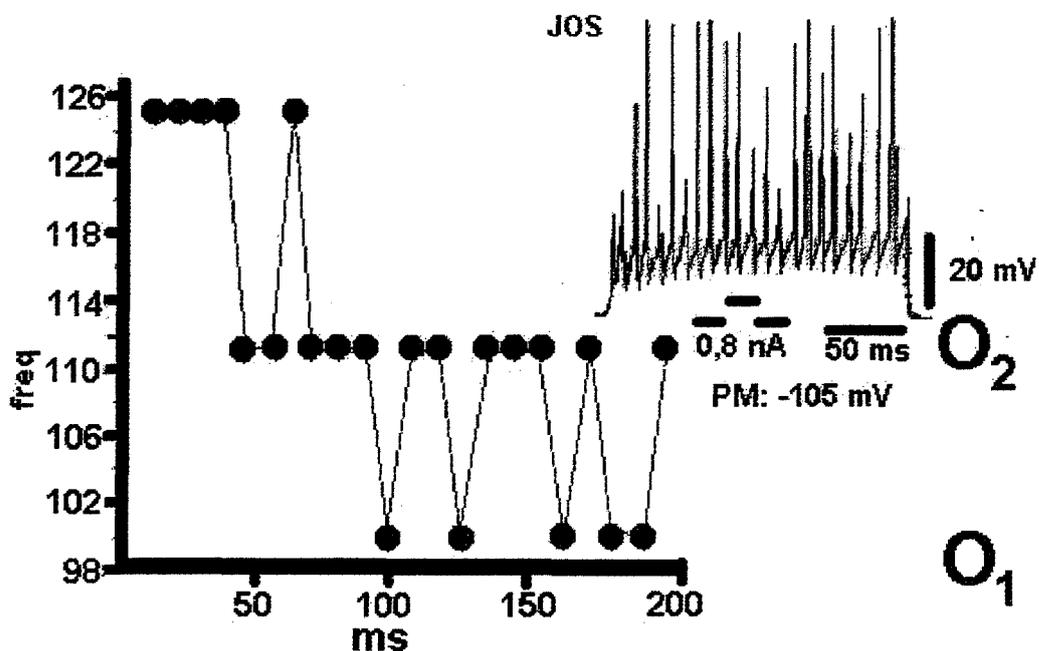


Fig.21. Mostra em O1) apresenta a curva freqüência/tempo (ms) onde, há claramente uma incapacidade de sustentar as freqüências as quais caem e retornam aos valores anteriores a intervalos regulares O2) um neurônio que apesar da aplicação de 0,8 nA, apresentou disparos com intervalos curtos entre um potencial e outro.

* CÉLULAS COM DESCARGAS EM SALVA:

◆ NEURÔNIO DO TIPO: CDSAL-DS TIPO IIId:

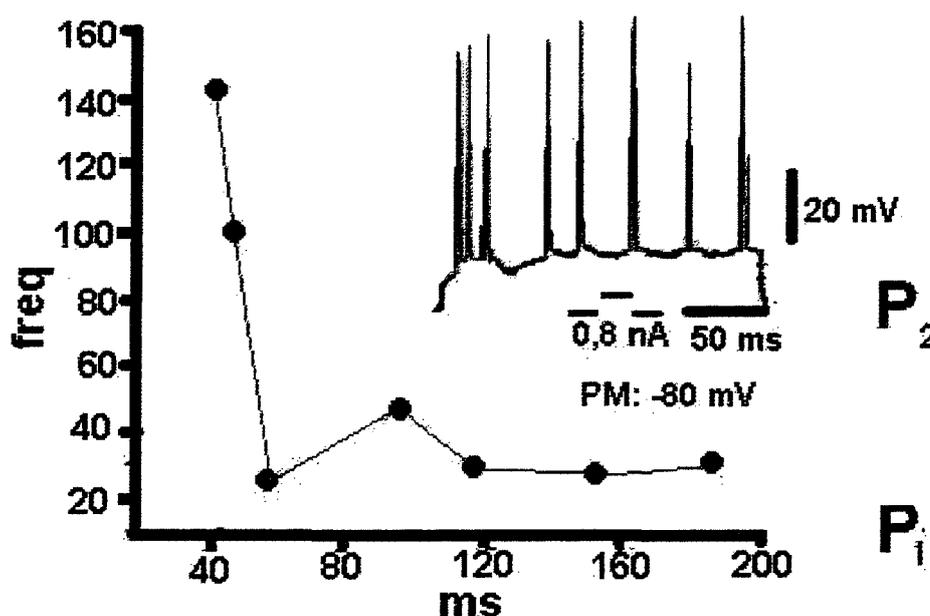


Fig.22. P₁) curva freqüência/tempo (ms) com o padrão de acomodação complexo onde inicialmente apresenta um disparo de alta freqüência depois sofre uma queda brusca elevando-se brevemente e tornando a cair novamente. um neurônio com descargas em salva. P₂) Este neurônio disparou descargas em salva de disparo com a aplicação de 0,6 nA (3 disparos).A figura mostra a resposta com a aplicação de 0,8 nA. O numero PAs aumentaram com o a aplicação de correntes positivas. Após as descargas em salva segue disparos com intervalos regulares espaçados que o neurônio CDSAL-IIb.

◆ NEURÔNIO DO TIPO: CDSAL-DS TIPO III:

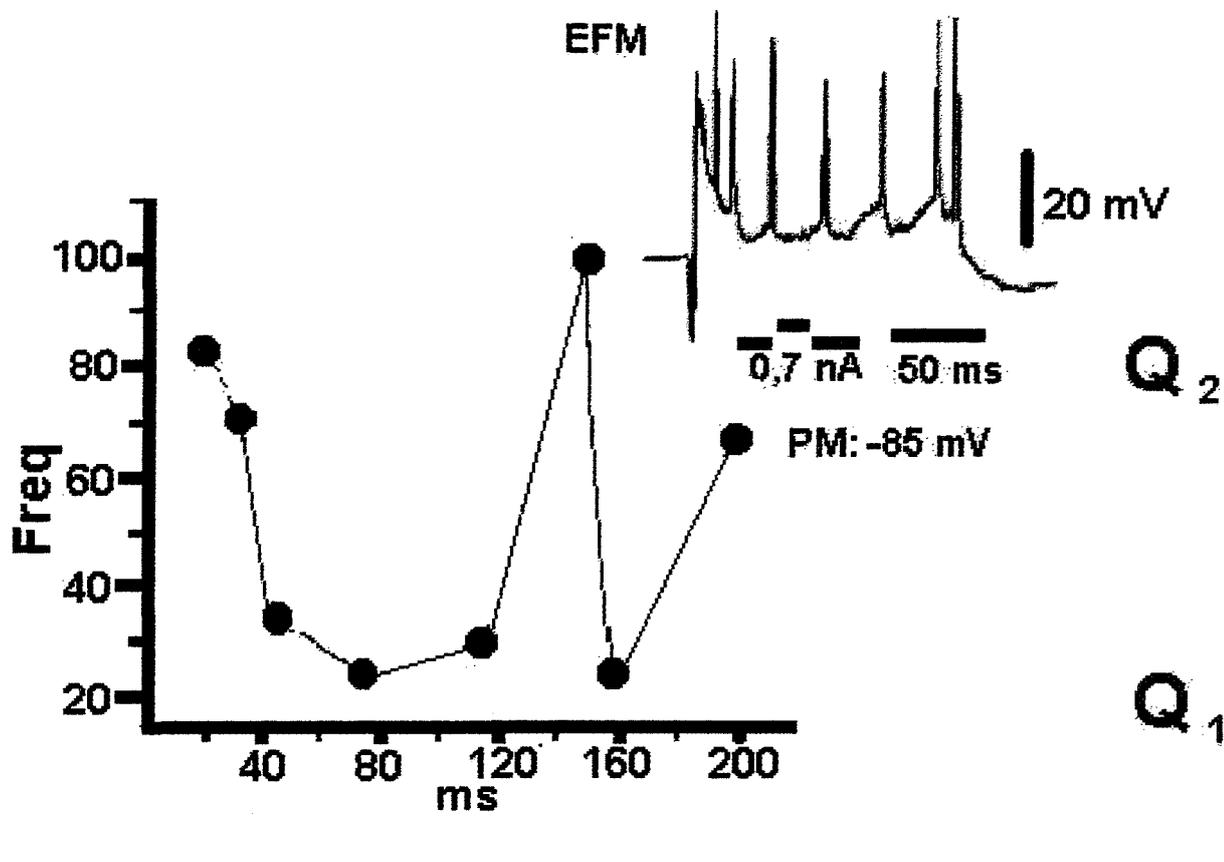


Fig.23. Q₁) Curva frequência/tempo (ms) com o padrão de acomodação complexo. Após um período de acomodação (40-80 ms) há um “escape” (140 ms) retornando ao valor inicial, após há uma nova acomodação de (160 ms) e retorno a valores intermediários (aproximadamente 200 ms) Q₂) um neurônio com descargas em salva. Este neurônio salva de Potenciais de ação com a aplicação de 0,4 nA (3 disparos). A figura mostra a resposta com a aplicação de 0,7 nA.

De posse destas informações: quadros 1 e 2 além das curvas com os registros formulamos a classificação apresentada no quadro 3:

QUADRO 3. Proposta de Classificação dos Neurônios de acordo com a acomodação neuronal

Células sem descargas em salva (CSDS)	Células com PA de intervalos regulares (RS)	CSDS-RS TIPO A –células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo A (fig.7)
		CSDS-RS TIPO B células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo B (fig.8)
		CSDS-RS TIPO C células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo C (Fig.9)
		CSDS-RS TIPO D células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo D (Fig.10)
		CSDS-RS TIPO E células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo E (Fig.11)
		CSDS-RS TIPO F células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo F (Fig.16)
		CSDS-RS TIPO G células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo G (Fig.17)
		CSDS-RS TIPO H células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo H (Fig.18)
		CSDS-RS TIPO I células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo I (Fig.19)
		CSDS-RS TIPO J células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação regulares do tipo J (Fig.20)
	Células com PAs de intervalos curtos(FS)	CSDS-FS . células sem descargas em salva com intervalos de potenciais de ação curtos do tipo J (Fig.21)

Células com descargas em salva (CSDS)	Alto Limiar (AL)	<p>CDSAL-DS Tipo II a : células nervosas com descargas em salva de alto limiar do tipo II a (Fig.12)</p> <p>CDSAL-DS Tipo II b células nervosas com descargas em salva de alto limiar do tipo II b (Fig.13)</p> <p>CDSAL-DS Tipo II c: células nervosas com descargas em salva de alto limiar do tipo II c (Fig.13)</p> <p>CDSAL-DS Tipo II d: células nervosas com descargas em salva de alto limiar do tipo II d(Fig.22)</p> <hr/> <p>CDSAL-DS Tipo III : células nervosas com descargas em salva de alto limiar do tipo III (Fig 23)</p>
	Baixo Limiar (AL)	<p>CDSBL-DS Tipo I – células nervosas com descargas em salva de baixo limiar do tipo II a (Fig.12)</p>

- **PADRÕES OBSERVADOS EM RATOS NORMAIS (RN):**

Setenta e quatro por cento dos ratos normais (n=30 neurônios) apresentaram neurônios sem descargas em salva com espículas (potenciais de ação) com intervalos regulares distribuídas em: **CSDS-RS TIPO A** (n=14 neurônios); **CSDS-RS TIPO B** (n=7 neurônios), **CSDS-RS TIPO C** (n=5 neurônios), **CSDS-RS TIPO D** (n=4 neurônios).

Cerca de 18 % (n=7) dos neurônios analisados apresentaram descargas em salva de alto limiar. Esses neurônios foram distribuídos em: **CDSAL-DS Tipo II a** (n=2 neurônios) e **CDSAL-DS Tipo II** (n=5 neurônios).

Apenas 8% (n=3) dos neurônios analisados apresentaram descargas em salva de baixo limiar do tipo **CDSBL-DS Tipo Ib**.

A tabela 13 mostra o resumo desses achados.

- **PADRÕES OBSERVADOS EM RATOS EPILÉPTICOS (RE):**

Os ratos epiléticos 53% (n=12neurônios) apresentaram neurônios sem descargas em salva com espículas de potenciais de ação com intervalos regulares distribuídas em: **CSDS-RS TIPO A (n=4); CSDS-RS TIPO B (n=3), CSDS-RS TIPO C (n=3), CSDS-RS TIPO D (n=1) e CSDS-RS TIPO E (n=1).**

Cerca de 33 % (n=7) dos neurônios analisados apresentaram descargas em salva de alto limiar. Esses neurônios foram distribuídos em: **CDSAL-DS Tipo II a (n=2) , CDSAL-DS Tipo IIb (n=3) e CDSAL-DS Tipo IIc (n=2).** O padrão do tipo CDSAL-DS Tipo IIc só foi observado em ratos epiléticos.

Apenas 14% (n=3) dos neurônios analisados apresentaram descargas em salva de baixo limiar, **CDSBL-DS Tipo I (n=3).**

A tabela 13 mostra o resumo desses achados.

Gráfico 49.

PADRÕES ENCONTRADOS EM RATOS NORMAIS

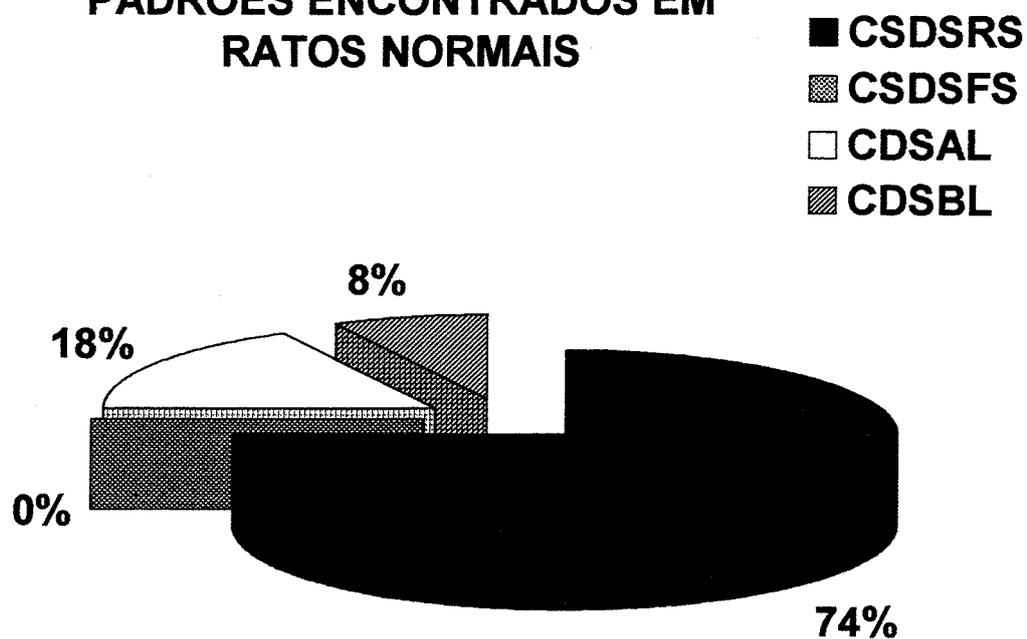
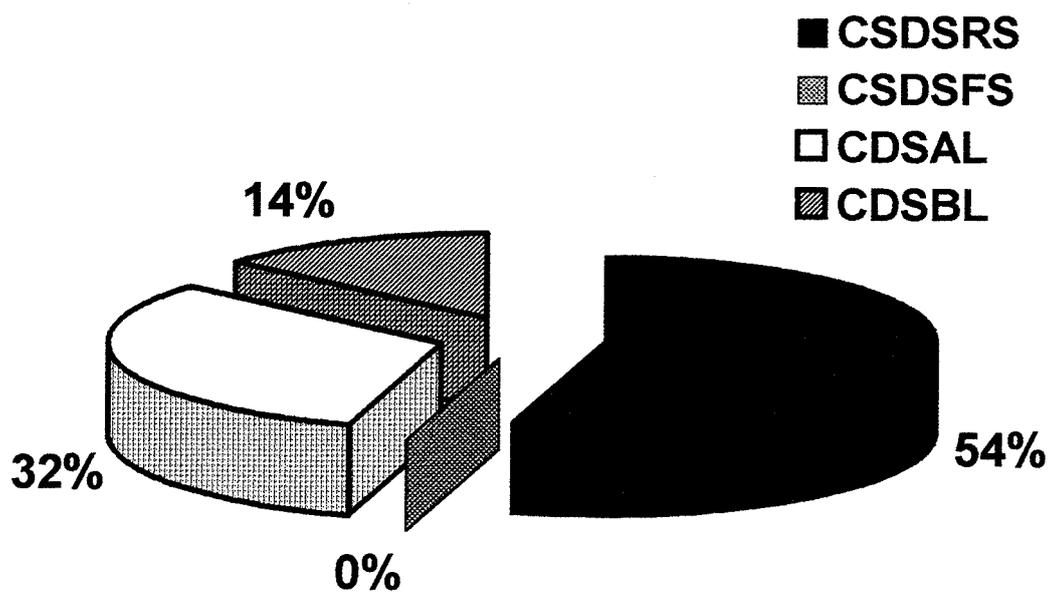


Gráfico 50

PADRÕES ENCONTRADOS EM RATOS EPILEPTICOS



Os **gráficos 49 e 50** Representam as porcentagens de tipos celulares encontrados nos ratos normais (gráfico 49) e ratos epilépticos (gráfico 50). **CSDSRS** (células sem descargas em salva com potenciais de ação com intervalos regulares). **CSDFS** (células sem descargas em salva com potenciais de ação com intervalos regulares). **CDSAL** (células com descargas em salva com alto limiar) **CDSBL** (células com descargas em salva com baixo limiar)

- **PADRÕES OBSERVADOS EM TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO (THH):**

No tecido hipocampal humano, foi constatado a maior diversidade de padrões. Alguns deles foram semelhantes aos observados nos grupos de ratos normais e epilépticos e outras que são próprias deste grupo.

Cerca de 60% (n=18) apresentaram uma atividade do tipo sem descargas em salva com espículas de potenciais de ação com intervalos regulares distribuídas em: **CSDS-RS TIPO A (n=3); CSDS-RS TIPO B (n=3), CSDS-RS TIPO C (n=1), CSDS-RS TIPO F (n=3) , CSDS-RS TIPO G (n=3), CSDS-RS TIPO H (n=3), CSDS-RS TIPO I (n=1) e CSDS-RS TIPO J (n=1).**

O padrões dos tipos : **CSDS-RS TIPO F, CSDS-RS TIPO G , CSDS-RS TIPO H , CSDS-RS TIPO I e CSDS-RS TIPO J** só foram observados no tecido hipocampal humano.

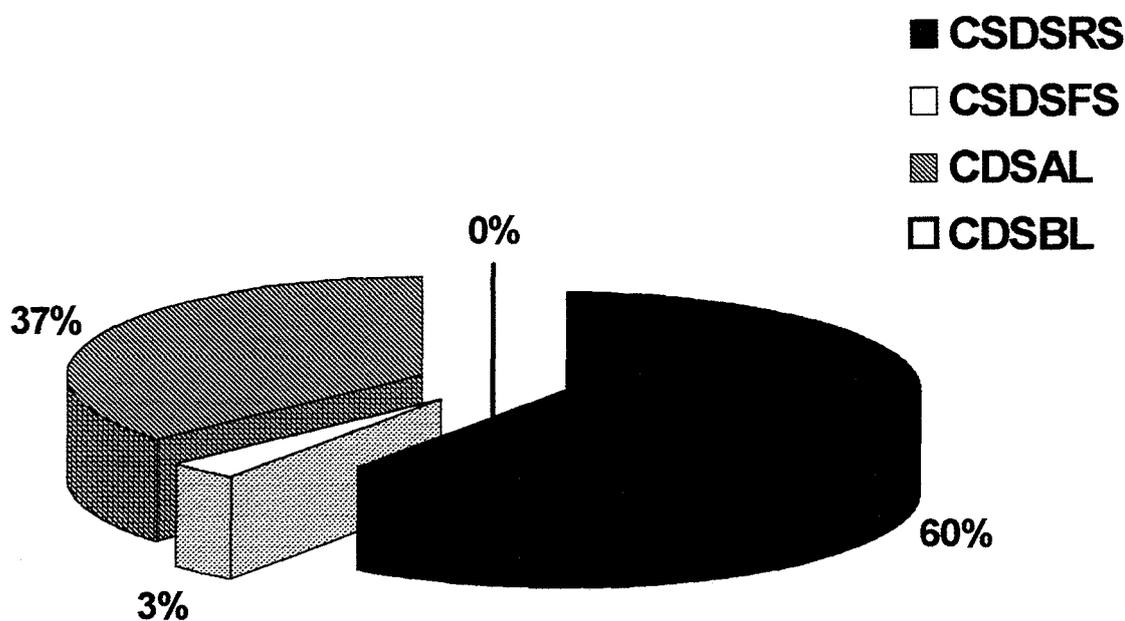
Somente um neurônio respondeu com um padrão de **CSDS-FS**.

Cerca de 37 % (n=11) dos neurônios analisados apresentaram descargas em salva de alto limiar. Esses neurônios foram distribuídos em: **CDSAL-DS Tipo IIa (n=4) , CDSAL-DS Tipo IIb (n=3) , CDSAL-DS Tipo IId (n=3) e CDSAL-DS Tipo III**

(n=1).O padrão do tipo **CDSAL-DS Tipo IIIc** só foi observado no tecido hipocampal humano.

Não foram observadas a presença de neurônios com baixo limiares. A tabela 13 mostra o resumo desses achados.

PADROES ENCONTRADOS EM TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO



O **gráfico 51** Representa as porcentagens de tipos celulares encontrados no tecido hipocampal Humano. CSDSRS (células sem descargas em salva com potenciais de ação com intervalos regulares). CSDFS (células sem descargas em salva com potenciais de ação com intervalos regulares). CDSAL (células com descargas em salva com alto limiar) CDSBL (células com descargas em salva com baixo limiar)

Tabela 13 Padrões de Respostas Neurais:

<i>Grupo</i>	<i>CSDS-RS Tipo-</i>										<i>CSDS</i>	<i>CDS-BL</i>	<i>CDS-AL tipo</i>				
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>J</i>	<i>FS</i>	<i>I</i>	<i>Ila</i>	<i>Iib</i>	<i>Iic</i>	<i>Iid</i>	<i>III</i>
RN (N=40)	14	7	5	4	-	-	-	-	-	-	-	1	2	5			
RE (N=22)	4	3	3	1	1	-	-	-	-	-	-	3	2	3	2		
THH (N=30)	3	3	1	-	-	3	3	3	1	1	1	-	4	3		3	1

RN: Ratos normais

CSDS: células sem descargas em salva

CDS: células sem descargas em salva

RE: Ratos Epilépticos

RS: intervalos regulares

AL: alto Limiar

THH: Tecido Hipocampal Humano

FS: Intervalos Rápidos

BL: baixo Limiar

4. ANÁLISE DAS CRISES ESPONTÂNEAS NOS NEURÔNIOS DE CA1 INDUZIDA PELA PASSAGEM DO RINGER LIVRE DE Mg^{2+} :

A perfusão com o Ringer 0- Mg^{2+} produziu dois tipos de atividades espontâneas, tanto em ratos quanto em tecido hipocampal humano. Foram observadas que alguns neurônios apresentaram descargas simples, descargas em salva e em alguns neurônios humanos não houve resposta a perfusão com o Ringer 0- Mg^{2+} .

Os dados a serem apresentados foram adquiridos, na sua maioria, no modo “Gap Free” do AxoScope 1,1 que possibilita a obtenção dos dados de forma contínua. Durante a aquisição dos mesmos não foram aplicadas correntes elétricas, pois o objetivo desta etapa era observar o aparecimento de descargas espontâneas. Além disso foram registrados, em algumas fatias, registros de EEG (registro de campo) para que pudessemos observar as atividade ictal-símile i.e. o correlato eletrofisiológico da atividade epilética ictal.

*** CRISES ESPONTÂNEAS NOS NEURÔNIOS DE RATOS NORMAIS:**

Em 70%, dos neurônios que chegaram até a reversão i.e. retorno ao Ringer normal, observou-se disparos espontâneos simples (n=14) e 30 % apresentaram descargas em salva. É importante ressaltar que todos os neurônios responderam ao 0- Mg^{2+} ; os neurônios que não sobreviveram ao final do experimento apresentaram com descargas em salva (n=4), acompanhado no EEG de atividade ictal-símile.

A seguir serão mostradas nas figuras 25 a 28, o comportamento neuronal observados durante a perfusão com o Ringer 0- Mg^{2+}

RESPOSTAS DOS NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS DE
RATOS NORMAIS DURANTE A PERFUSÃO COM 0-Mg

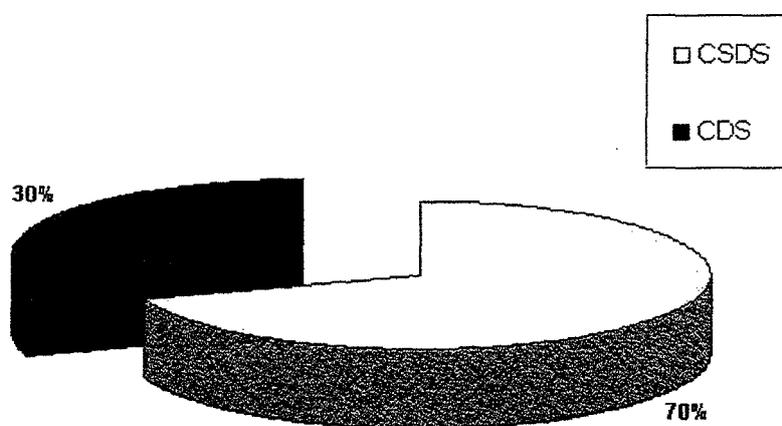


Gráfico 52. O gráfico mostra a proporção da atividade neuronal (sem ou com descargas em salva) observada durante a perfusão com o Ringer sem magnésio, em neurônios de CA1 de ratos epiléticos.

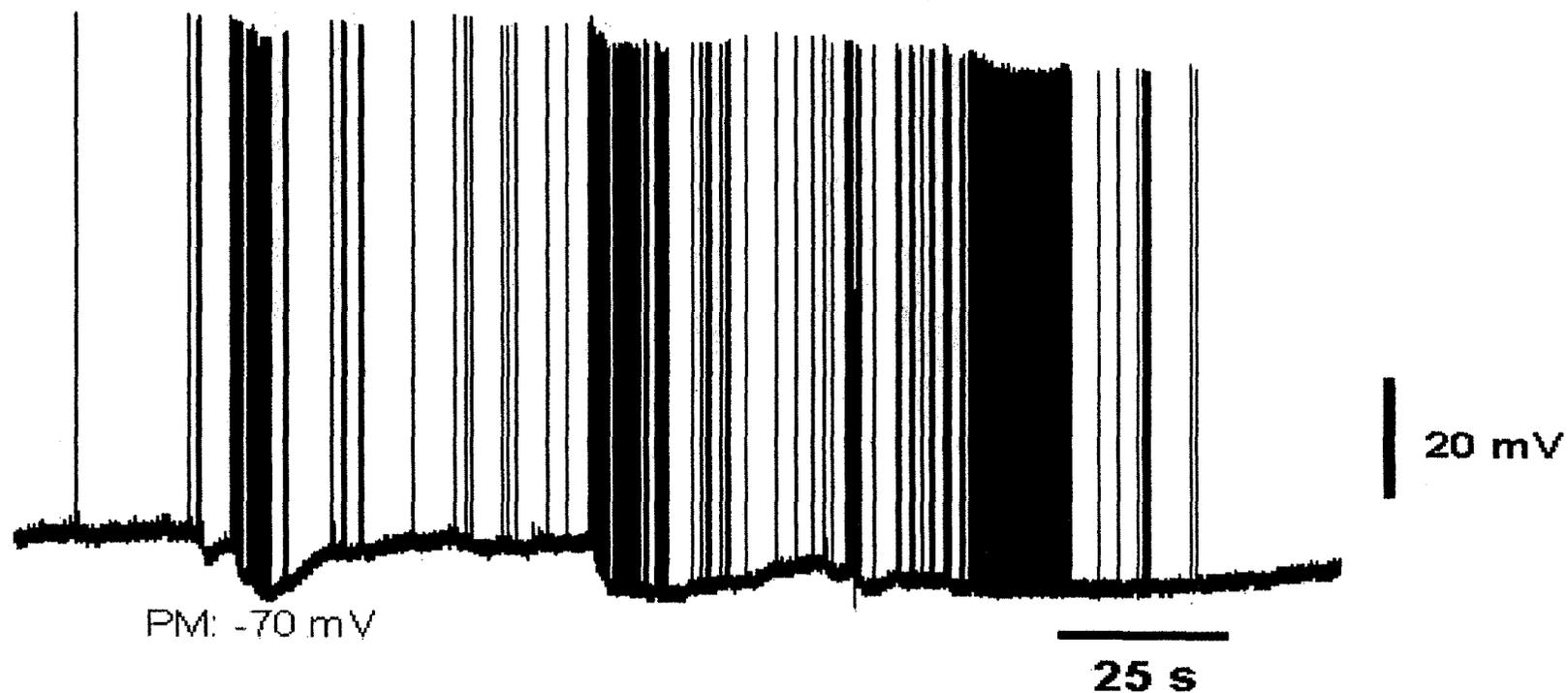


Fig25: Mostra o registro intracelular de um neurônio de rato normal. Este neurônio apresentou uma atividade espontânea de descargas simples de alta frequência. Notar as oscilações no potencial de membrana, onde no instante de maior negatividade o PM medido foi de -90 mV (*). Na maior parte do tempo o PM registrado foi de -70 mV.

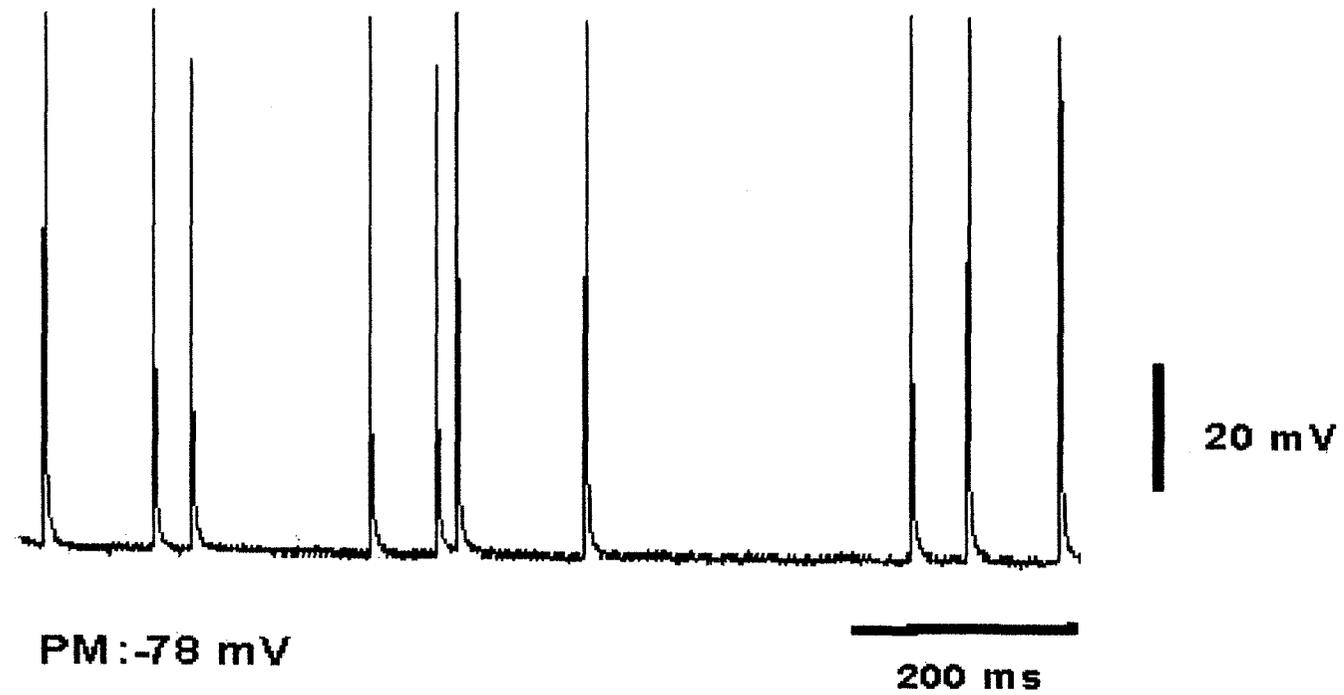


Fig. 26: Mostra parte do mesmo registro da figura 25: observa-se a ocorrência de potenciais de ação simples de grande amplitude.

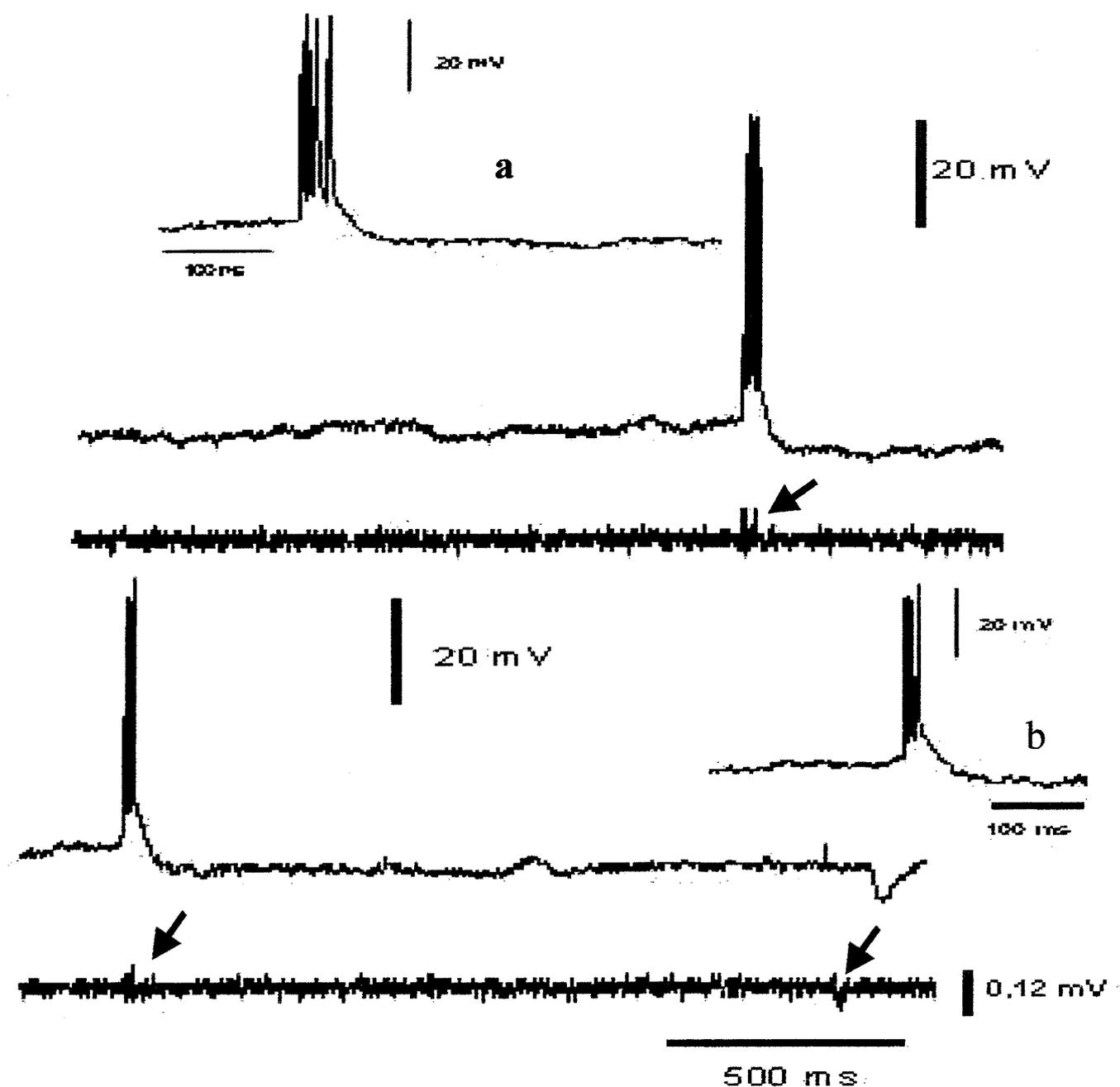


Fig.27. Exemplo de Registro IC e EEG de um neurônio de rato normal apresentando descargas em salvas espontâneas, durante a perfusão com o Ringer sem Magnésio. Inicialmente este neurônio não apresentava este tipo de descargas. Durante a atividade interictal o número de pontas de potenciais de ação variaram de 2-5. Notar que esta atividade intracelular corresponde a atividade epileptiforme no EEG (setas vermelha), caracterizada por pontas. Em a) detalhe da descarga em salva com 5 pontas de PAs já em b) são mostradas 4 pontas.

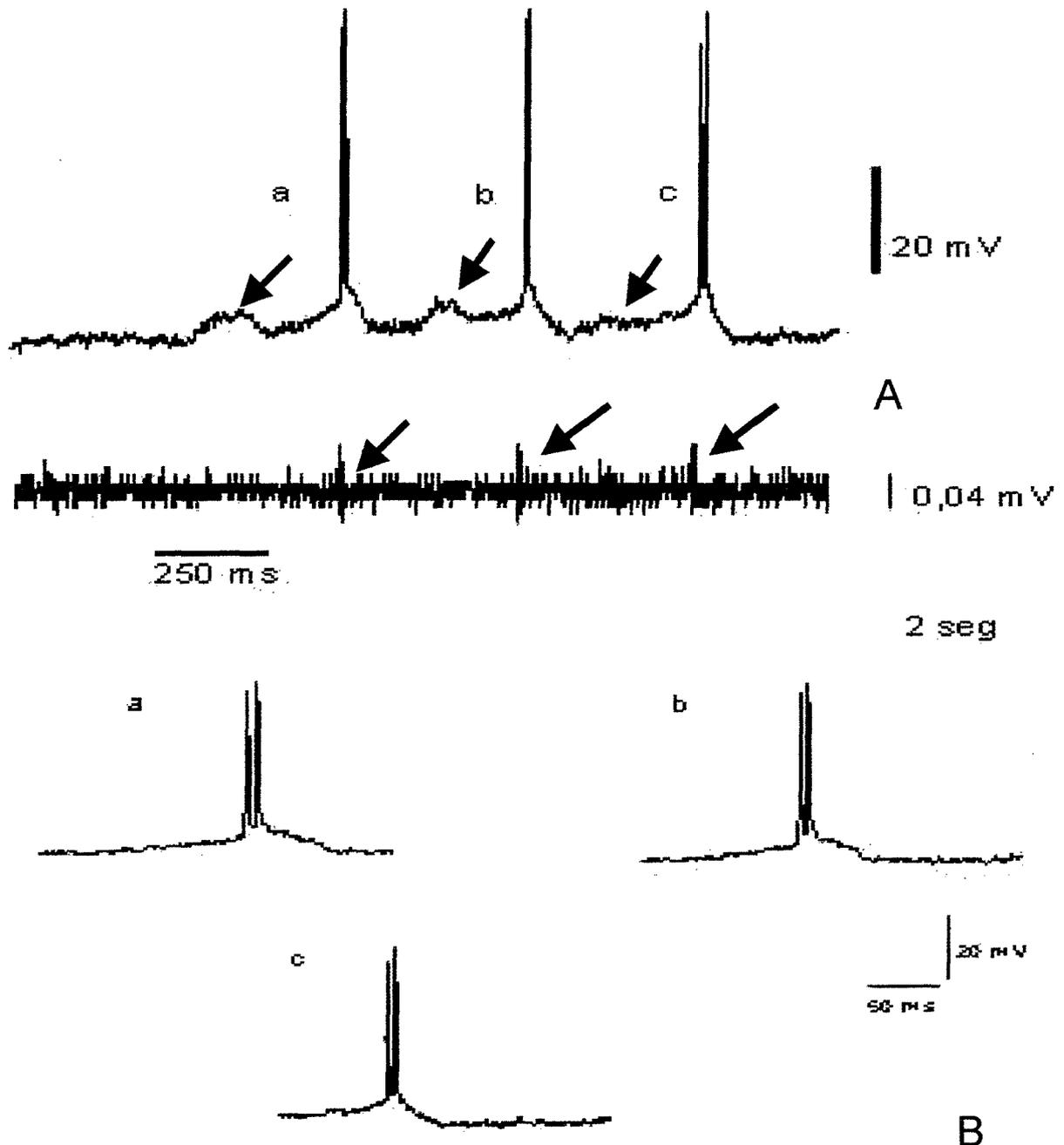


Fig.28. A figura mostra um registro intracelular e de EEG do mesmo neurônio *seguir* perfundido com o Ringer 0-Mg²⁺; a medida que a perfusão transcorria aumentavam o número de disparos. Em A) são mostrados 2 s de atividade espontânea IC com a atividade do EEG; as setas vermelhas indicam a atividade epileptiforme no registro EEG. Pode-se notar ainda que a atividade em salva é precedida por ondas despolarizantes (setas azuis). Em B) são mostrados em detalhes as descargas em salva, tanto a, b como c apresentaram 3 PAs

* CRISES ESPONTÂNEAS NOS EM RATOS EPILÉPTICOS:

Os ratos epiléticos também apresentaram duas formas de disparos espontâneos: com descargas de potenciais simples e descargas em salva. Nenhum dos neurônios estudados até a sua reversão deixou de responder ao Ringer 0-Mg²⁺ (n=15). Um fato que mais chamou a atenção se compararmos com os ratos normais foi a excitabilidade mais pronunciada e a predisposição das descargas em “salva”.

A seguir serão mostradas nas figuras 29 a 31, o comportamento neuronal observados durante a perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺.

RESPOSTA DOS NEURÔNIOS DE RATOS EPILÉPTICOS
DURANTE A PERFUSÃO COM O 0-Mg²⁺

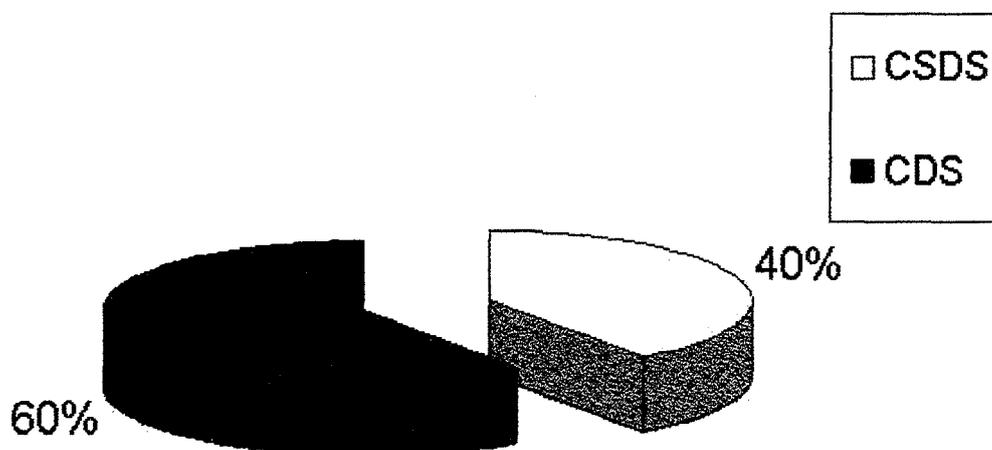


Gráfico53. O gráfico mostra a proporção da atividade neuronal (com e sem descargas em salva) observada durante a perfusão com o Ringer sem magnésio, em neurônios de CA1 de ratos epiléticos.

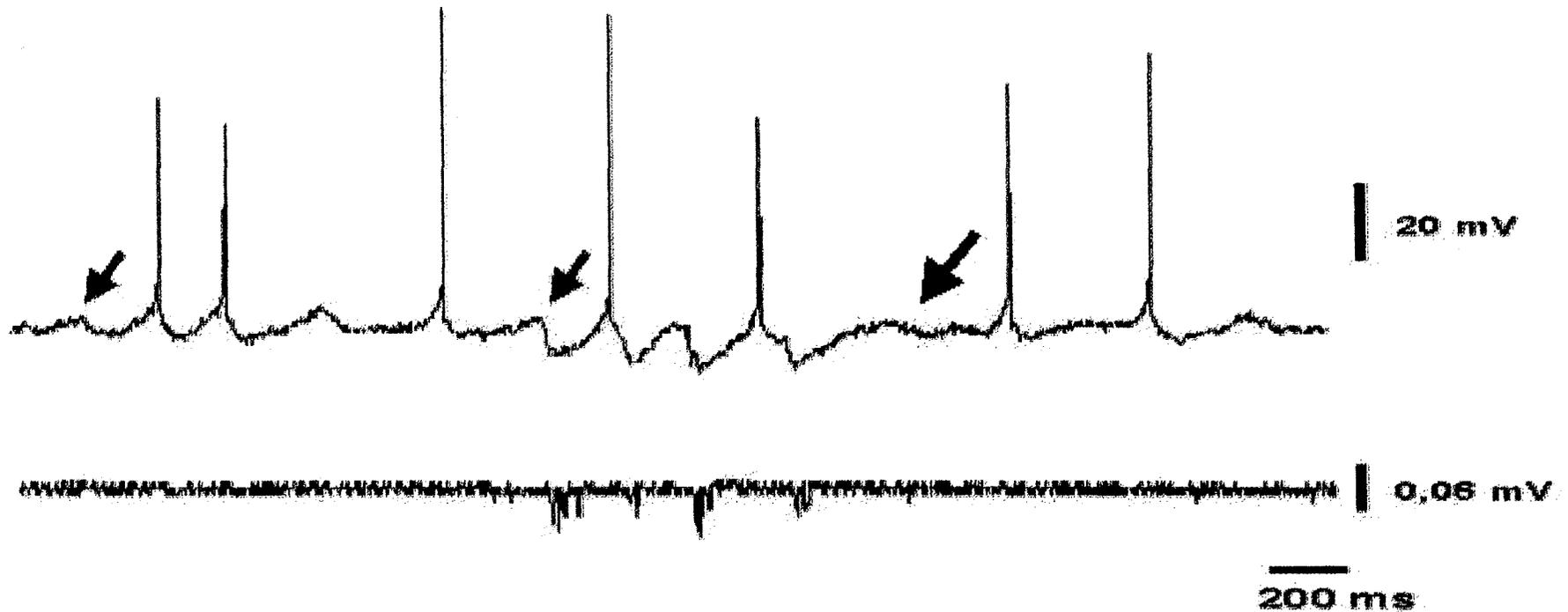


Fig.29. A figura mostra um registro intracelular de um neurônio de CA1 e o EEG de um rato epiléptico sendo perfundido com o Ringer 0-Mg^2 . Inicialmente foram registradas um pequeno número de disparos simples e a medida que a perfusão transcorria aumentavam o número de disparos. Notar a presença de freqüentes e ondas despolarizantes (setas vermelhas), precedem os disparos. Além disso observam-se oscilações no potencial de membrana e o aparecimento de um platô (seta preta) sobre o qual ocorrem descargas simples (seta larga).

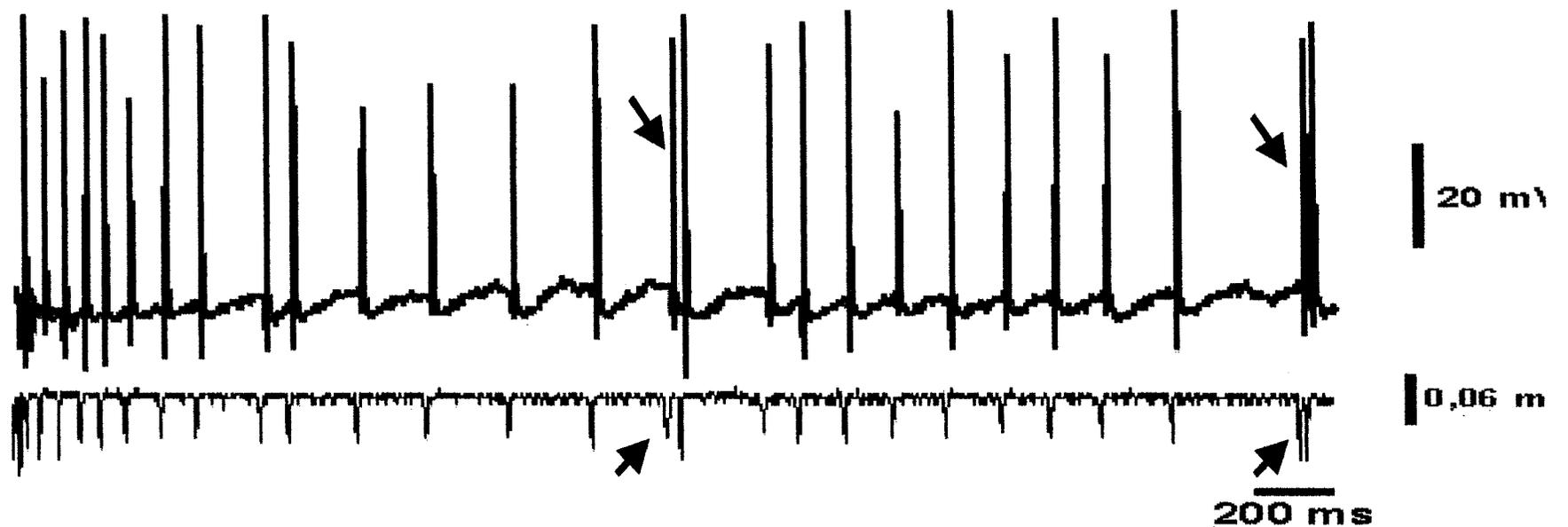


Fig.30. A figura mostra a um registro ictal-símile obtido de uma fatia de hipocampo de rato epiléptico sendo com Ringer 0 Mg^{2+} . Notar a presença de grande quantidade de ondas despolarizantes (setas), que por sua vez precediam os disparos . Os potenciais de ação continuam sendo precedidos por uma onda , só que agora ocorre uma brusca descida do potencial de membrana para que imediatamente seja disparado o potencial de ação. Ao término deste ocorre um potencial de repolarização rápida que novamente se despolariza e se prepara para um novo potencial de ação. A atividade ictal –símile é evidente e se reflete tanto no registro intracelular quanto na atividade EEG. A atividade ictal-símile no registro intracelular é acompanhada pelos potenciais despolarizantes e PAs de alta frequência. No EEG , esta atividade é caracterizada por potenciais positivos rítmicos de alta frequência. Notar ainda o aparecimento de descargas duplas (setas) no intracelular e no EEG.

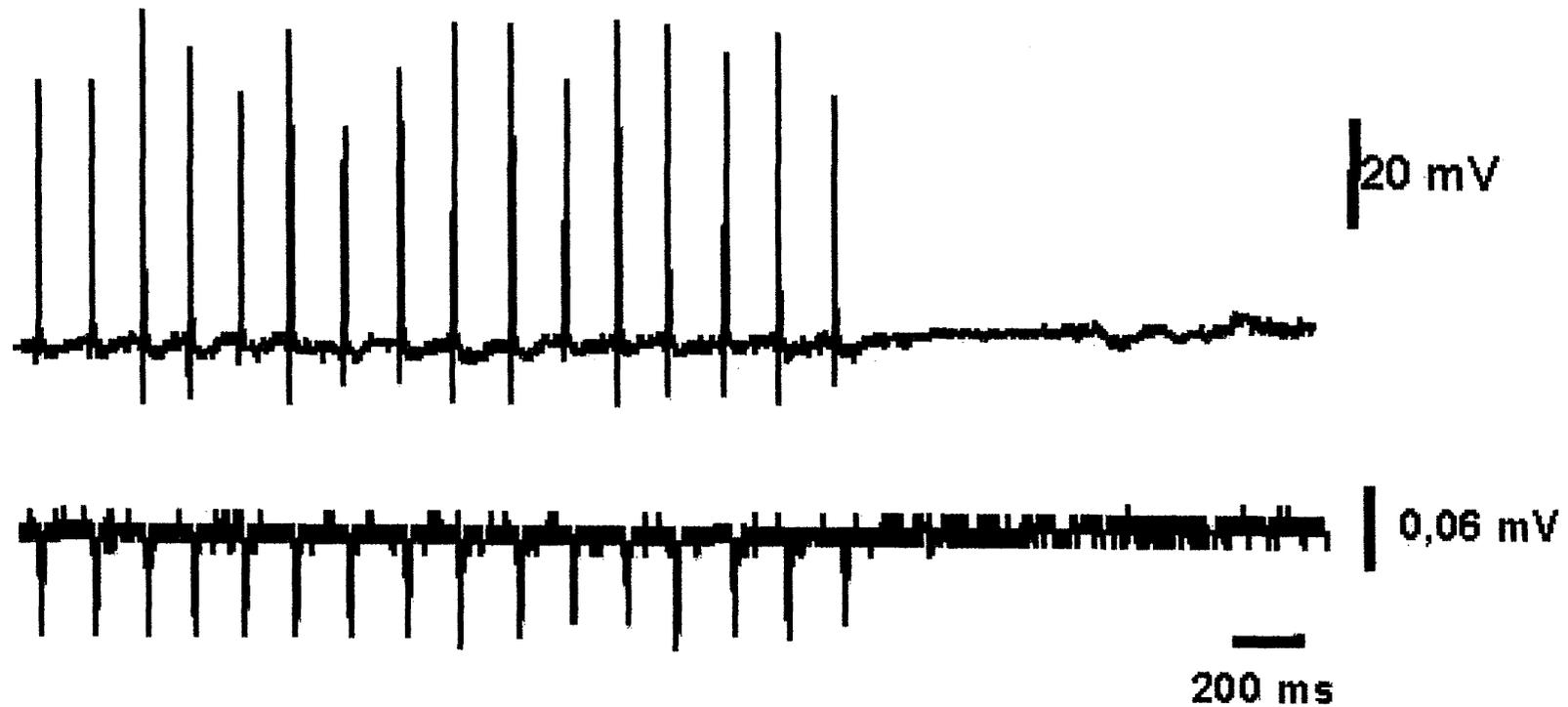


Fig.31. A figura mostra a continuação do registro anterior intracelular e EEG realizado em fatia de hipocampo de rato epiléptico agora perfundido com o Ringer normal. a atividade ictal-símile ainda é observada em 2/3 desse registro. Quando o Ringer normal penetrou na câmara de perfusão substituindo o Ringer 0-Mg²⁺ os disparos cessaram.

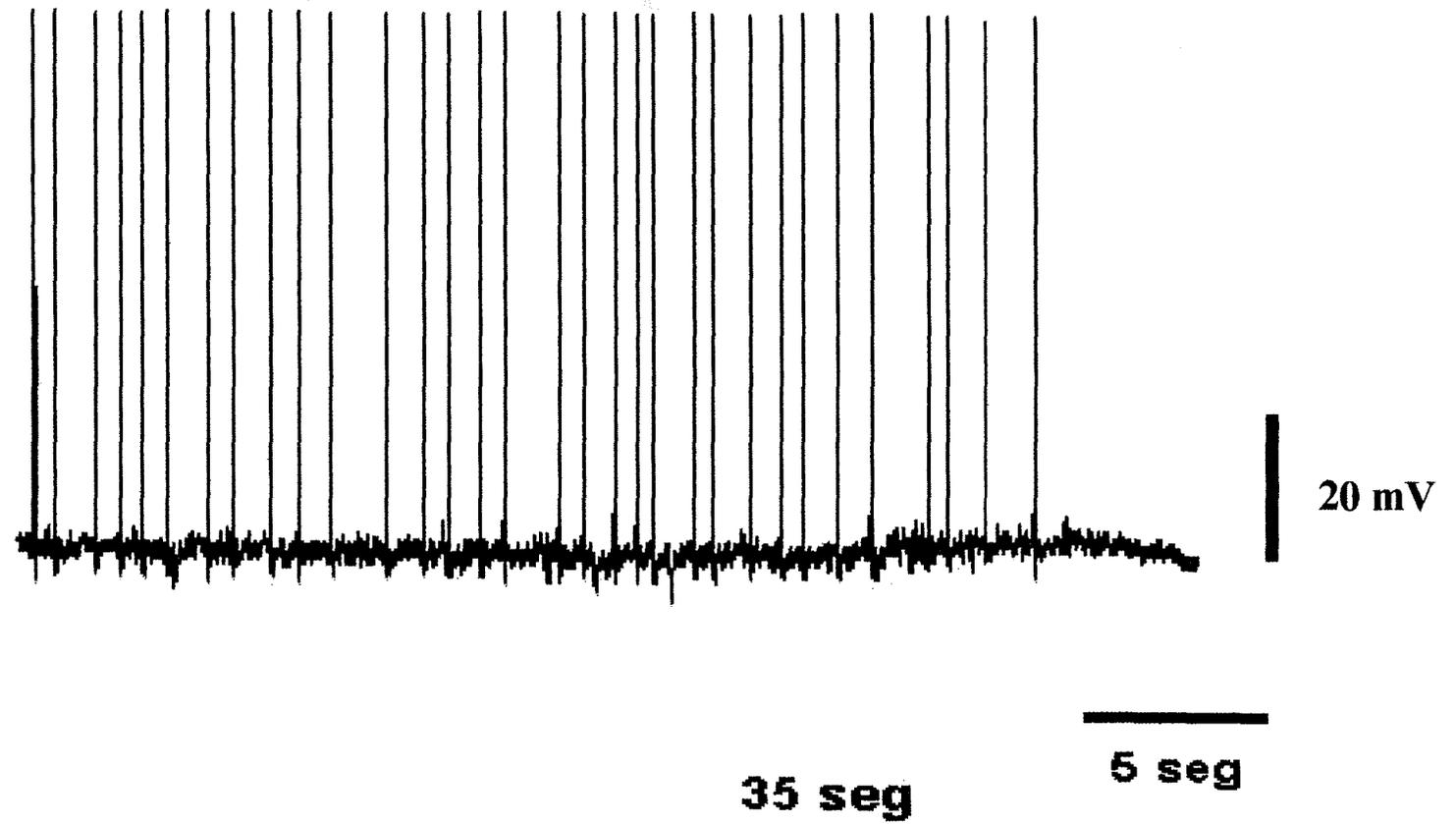


Fig. 32. Mostra a atividade epileptiforme em um outro neurônio onde a perfusão provocou o aparecimento de descargas simples.

* CRISES ESPONTÂNEAS NOS EM TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

A perfusão das fatias de tecido hipocampal humano com Ringer 0-Mg²⁺ não induziu atividade espontânea em 25% dos neurônios de CA1 (n=4 neurônios) que chegaram ao final do experimento, isto é, até a curva de reversão com o Ringer normal (n 16 neurônios), 44% dos neurônios (n=7) responderam com descargas simples e 31% responderam com descargas em salva. O gráfico 52 mostra a distribuição das porcentagem das respostras mediante ao tratamento com o 0-Mg²⁺

A partir das próximas figuras serão relatadas as observações comportamentais das células humanas, mediante a perfusão com o Ringer 0-Mg². Só serão mostrados os registros, em que foram obtidos a obtenção de potenciais de ação.

Gráfico 52

RESPOSTA DO TECIDO HIPOCAMPAL HUMANOS DURANTE
A PERFUSÃO COM O 0-Mg²⁺

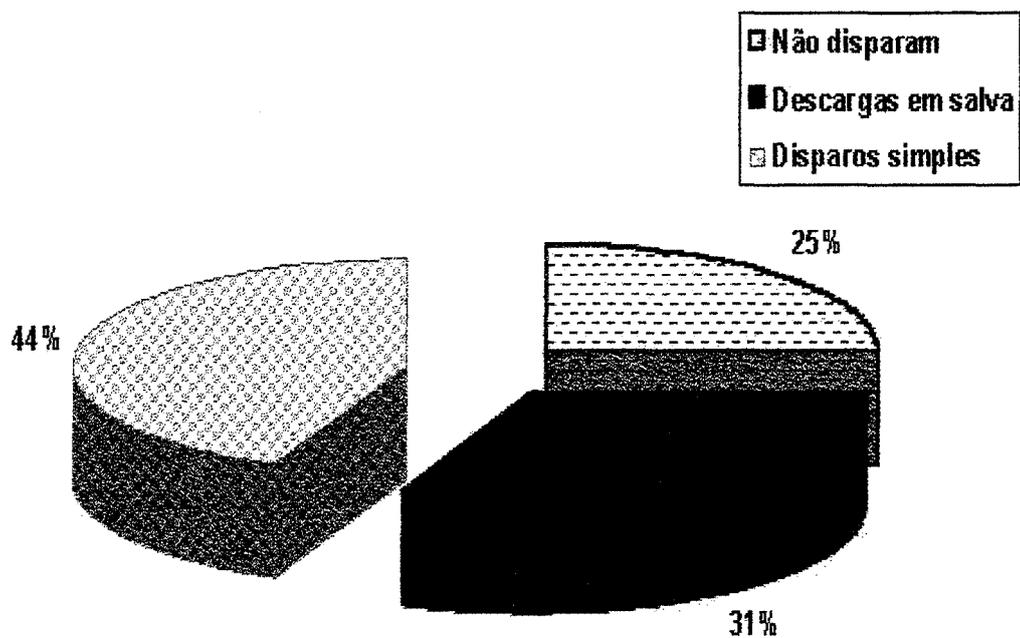


Gráfico 54. O gráfico mostra a distribuição e a porcentagem das respostas dos neurônios mediante a perfusão com o 0-Mg²⁺.

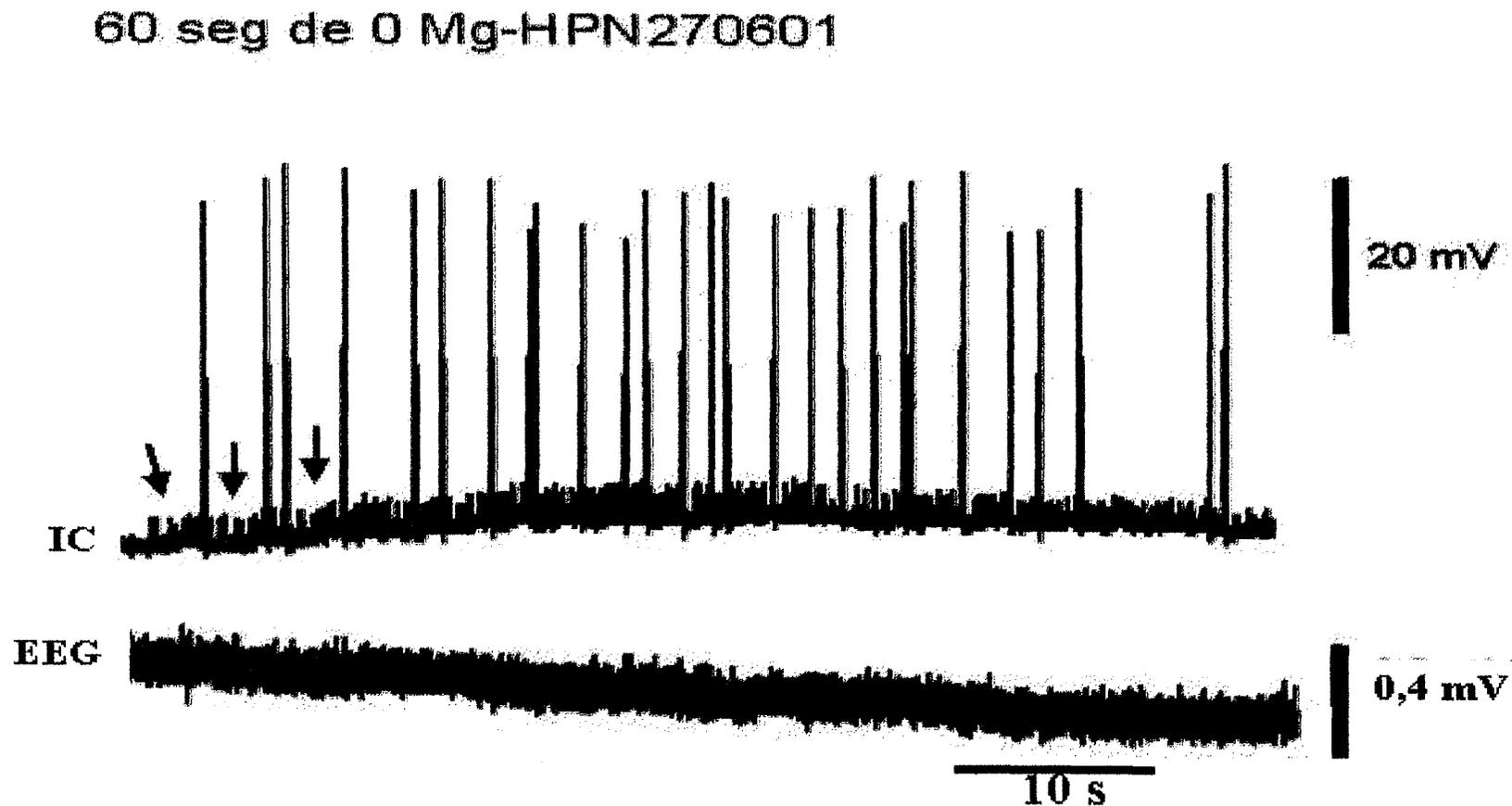


Fig. 32. Mostram 60 segundos de registros intracelulares e de EEG numa célula hipocampal humana, numa atividade epileptiforme. Notar que no registro intracelular além dos disparos simples ficou evidenciado pequenas pontas de despolarização (setas) O traçado mais grosso do EEG mostra a evidente crise, que foi contínua, durante este registro

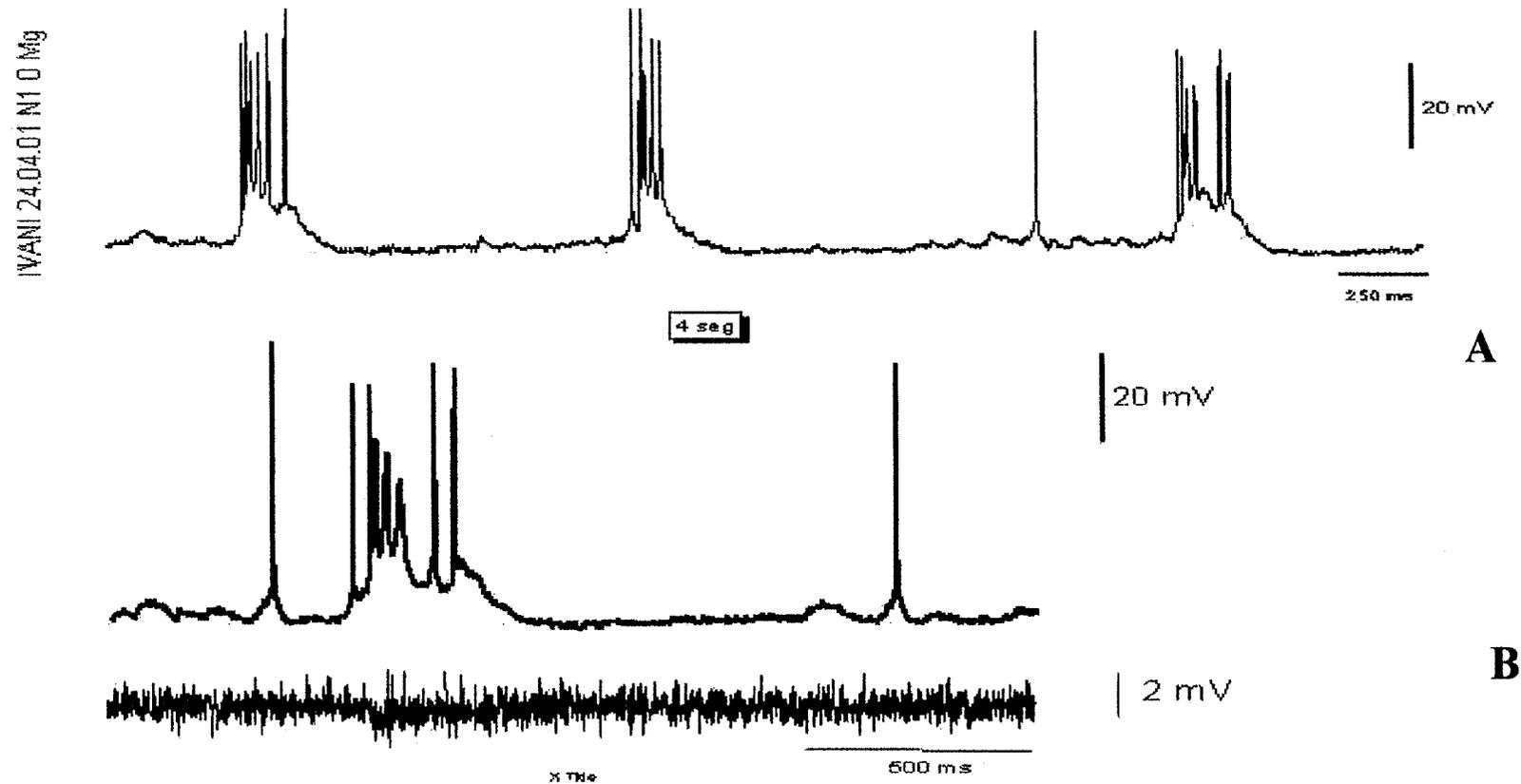


Fig.33. Mostra em A e B o registro Intracelular apresentando uma atividade interictal induzida pela perfusão com o 0-Mg²⁺. Em A foram registrados 3 salvas de potenciais de ação em um período de 4 segundos de registros. Em B) é mostrado um potencial de ação precedendo um PDS. Notar a crise ictal-símile evidenciada no EEG. Em A temos o início dos disparos. Em B temos o máximo de atividade, num registro de 2 s de duração.

MLF

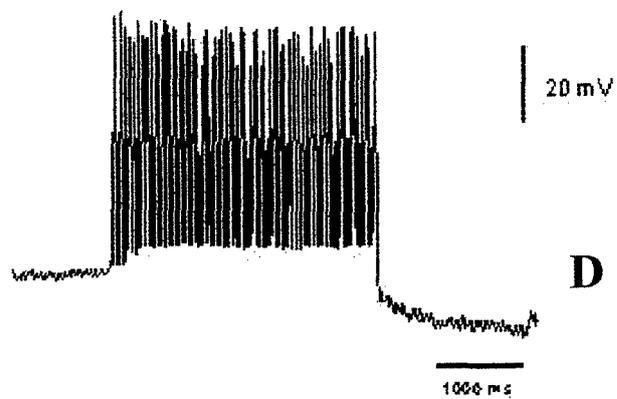
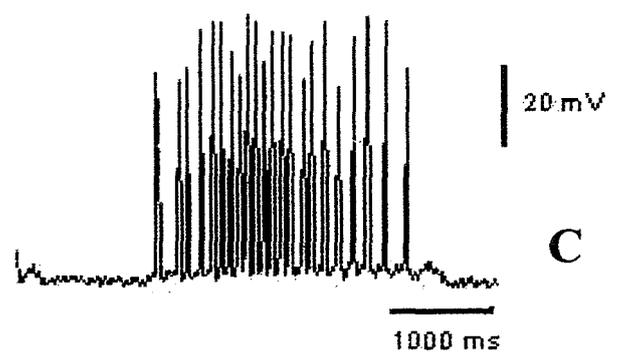
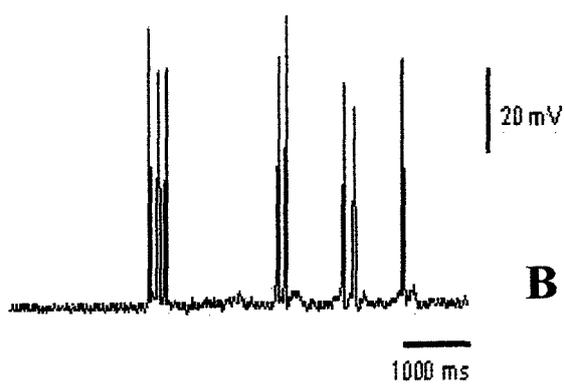
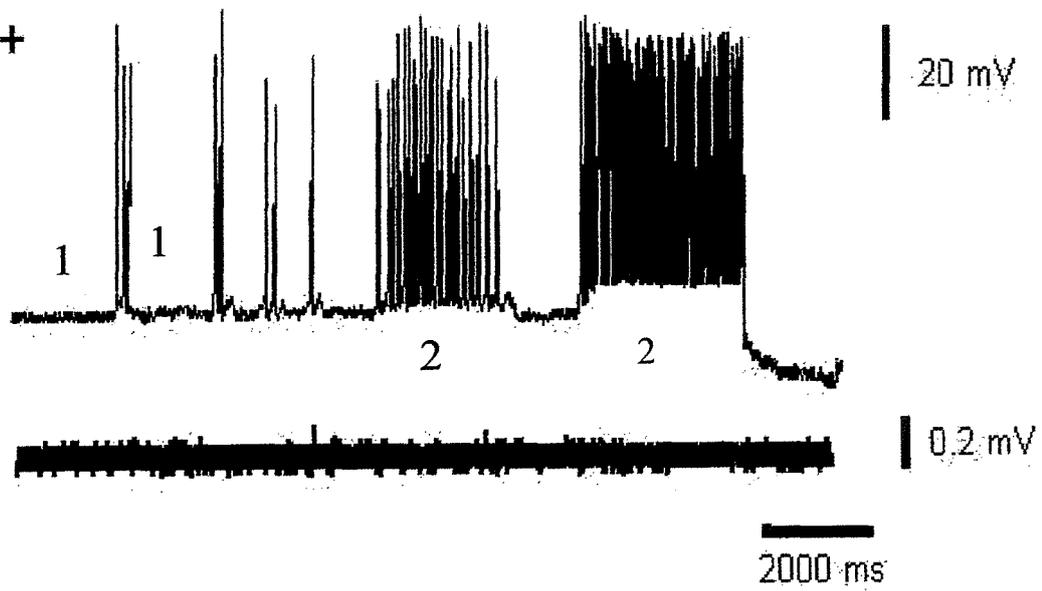
0-Mg⁺⁺

Fig.34 Mostra no registro intracelular a atividade Epileptiforme de longa duração de um neurônio CSDS. Em A) registou-se uma atividade epileptiforme espontânea, em um neurônio hipocampal humano de CA1. Este fenômeno observado se caracterizou por uma despolarização súbita e recorrente em da membrana plasmática (1 e 2), de longa duração do qual emergem Potenciais de ação múltiplos. Em 2 além da despolarização ela é acompanhada por um platô Neste registro vamos observar em: A) um potencial de membrana inicialmente estável. Posteriormente quando aparece a atividade ictal-símile, aumenta o numero de PAs, até que temos o seu pico máximo de disparos terminando com uma hiperpolarização Neste registro também notamos a crise no EEG, embora não seja tão evidente quanto no registro intracelular Em B, Ce D, observamos em detalhes os disparos observados.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo procurou estudar os padrões de respostas eletrofisiológicas nos neurônios hipocampais antes, durante e após a perfusão com o Ringer sem magnésio. Foram realizados estudos das propriedades neuronais passivas e de disparo, conforme as trocas do meio de perfusão. O objetivo inicial era a observação das propriedades neuronais, em Ringer de perfusão normal, em condições próximas das observadas “*in vivo*”. A segunda parte do experimento consistiu na troca do Ringer normal pelo modificado (0-Mg²⁺) e com isso observar como esta modificação interferiria nas propriedades celulares. Na terceira fase o Ringer normal voltou a ser perfundido nas fatias com o intuito de verificar se as propriedades medidas voltavam as suas condições iniciais.

O presente estudo continuou com a análise destes achados por grupo e entre os grupos. Comparamos as respostas nos diferentes momentos e comparamos um grupo com o outro, i.e. ratos normais x ratos epiléticos, ratos normais x tecido hipocampal humano e ratos epiléticos x tecido hipocampal humano:

Com isso buscávamos não só avaliar o padrão de resposta mas também responder a algumas questões a serem discutidas: 1) a retirada do íon magnésio do meio de perfusão influencia as propriedades neuronais intrínsecas? E em caso afirmativo, 2) como se dá essa modificação? 3) O modelo de indução da atividade epileptiforme pela retirada do íon magnésio é um bom modelo de estudo para qualquer grupo? 4) Existem diferenças nas respostas entre os grupos? 5) neurônios hipocampais de ratos são bons controles para tecido hipocampal humano? Durante a perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺ buscou-se a indução da atividade epileptogênica, para a caracterização das propriedades de disparo neuronal, como o aparecimento de descargas simples, em salva e o próprio PDS.

Em um outro momento os neurônios estudados foram classificados de acordo com o intervalo de tempo entre um potencial de ação e outro. Esta classificação foi inicialmente desenvolvida para caracterizar os neurônios de córtex cerebral na impossibilidade de uma marcação com corantes IC (Connors et al 1982, McCormic et al, 1985; Naegele & Katz, 1990).

*** PROPRIEDADES INTRINSECAS NEURONAIS:**

1. RATOS NORMAIS:

O tratamento com o Ringer 0-Mg²⁺ provocou modificações no potencial de membrana, resistência de entrada e na excitabilidade (corrente injetada para o primeiro potencial de ação) desses neurônios. Em contrapartida as outras propriedades não sofreram modificações significativas. Estudos anteriores, que utilizaram o modelo do 0-Mg²⁺, não investigaram o efeito desse íon nas propriedades neuronais intrínsecas (Gutierrez, 1999a, b.).

Em um Ringer normal, com concentrações normais de Mg²⁺, os neurônios encontram-se com o seu potencial de repouso e os canais iônicos NMDA estão bloqueados pelo íon Mg²⁺ e assim o glutamato não produz resposta. No entanto se o neurônio pós-sináptico for previamente despolarizado então o bloqueio do Mg²⁺ é removido o que determina o fluxo

iônico , fazendo com que haja entrada de sódio e cálcio e saída de potássio, produzindo uma grande despolarização (Cole & Nicoll 1984; Dingledine & McBain 1994). Em hipocampo e córtex de ratos com epilepsia induzida pelo abrasamento (“kindling”), e de pacientes com foco epiléptico cortical, foi observado um aumento da sensibilidade de receptores do glutamato (Hwa & Avoli 1992). Isto provoca um aumento da entrada de Ca^{2+} no neurônio durante a atividade sináptica detectada por microeletrodos íons específicos (Louvel & Pumain 1992).

Nossos resultados são relevantes porque sugerem mudanças nas propriedades da membrana plasmática. Assim como um possível mecanismo “compensatório” há um aumento da eletronegatividade neuronal (hiperpolarização) e aumento da resistência de entrada como “uma tentativa de frear o processo excitatório”. As células que apresentam resistências elevadas apresentam volume menores (Kandel 1996) e com isso uma lentidão na propagação do impulso; no caso dos neurônios este aumento da resistência, embora significativo, não parece ser suficiente para que estes neurônios não tenham uma excitabilidade maior.

As alterações que levam a um aumento da excitabilidade neuronal, teoricamente deveriam determinar um menor limiar de disparo do neurônio. Isso permite que um estímulo pré sináptico menor, com menor somação temporal e espacial, leve ao disparo de um potencial de ação (PA). Na gênese desta hiperexcitabilidade poderiam estar envolvidos os mecanismos que levam a um aumento intrínseco da excitabilidade neuronal como, por exemplo, transformações permanentes no número e características dos receptores e canais iônicos pós-sinápticos. Em nosso estudo não houve diferenças significativas no limiar de disparo.

2. RATOS EPILÉPTICOS:

Os ratos epiléticos também apresentaram diferenças significativas no potencial de membrana, onde a tendência foi a maior eletronegatividade. Havia uma nítida tendência ao potencial de equilíbrio do íon potássio (Hille, 1992) Este comportamento, assim como em ratos normais, nos “sugere” uma tentativa do neurônio em manter a eletronegatividade do seu estado de repouso distanciando-se do limiar de disparo do PA.

Neste grupo não foram identificadas diferenças significativas nas resistências de entrada. Nos 3 momentos avaliados, ao contrário dos ratos normais que apresentaram significância nas mesmas condições. Este dado é extremamente interessante pois sugere que o mecanismo “compensatório” observados nos ratos normais não ocorre neste grupo. Provavelmente a epileptogenicidade induzida pela pilocarpina determine a inexistência destes “mecanismos compensatórios” e com isso um aumento da excitabilidade.

A perfusão com o Ringer sem o magnésio provocou um significativo aumento da amplitude e aumento da frequência desses potenciais (durante e após Ringer sem magnésio) dos potenciais de ação; isto pode estar associado ao recrutamento de um número maior de canais de sódio voltagem dependentes. O Ringer sem o magnésio provoca a abertura dos canais NMDAs, que por si só promovem a entrada de sódio e cálcio, gerando uma despolarização da membrana e com isso ocorre um recrutamento dos canais de sódio voltagem-dependentes da vizinhança.

Neste estudo não foram observadas diferenças nos outros parâmetros estudados, porém foram observadas que o valor da constante de tempo estava ainda mais reduzida durante a perfusão com o 0-Mg²⁺. Entretanto, estudo utilizando a técnica de “patch clamp” nas

células granulares de animais com ELT induzida por pilocarpina mostrou que a constante de tempo encontrava-se anormalmente reduzida (Isokawa, 1996). Com base em conceitos biofísicos que envolvem este parâmetro, os autores postularam que este comportamento poderia refletir na morfologia das células granulares, como por exemplo deformações dendríticas, na epileptogênese crônica. Sanabria (1999), à semelhança dos nossos resultados, não observou diferenças significativas na constante de tempo nas células piramidais de CA1 de ratos epiléticos utilizando o modelo da pilocarpina.

Em relação a propriedades PPH, Sanabria (1999) , assim como nosso estudo, não evidenciou alteração. Assim o comportamento desses potenciais segue o padrão já descrito na literatura (Williasson & Alger, 1990). O PPH é produzido por correntes de potássio ativadas pela entrada de cálcio (Alger & Nicoll, 1980, Lorenzon & Foerhinger, 1992) e/ou despolarização da membranas dependentes de voltagem (Schasrtzkroin & Stafstron, 1980), motivo pelo qual pode ser considerado pós-potencial ativo. O papel do PPH, na epileptogênese crônica ainda é pouco conhecido. A análise deste parâmetro em tecido epilético crônico demonstrou a existência de variações, dependendo da ELT. Trabalhos, utilizando o modelo do abraçamento não demonstraram alterações (Asprodine e colaboradores, 1992) . Entretanto, estudos com o modelo induzido pela toxina tetânica mostraram alterações do PPH (Watts e colaboradores, 1993) Apesar dos poucos estudos realizados especula-se que no tecido epilético crônico possam ocorrer anomalias intrínsecas dos canais iônicos .

3. TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

Nos neurônios hipocampais humanos identificamos uma característica muito peculiar, que diferiu dos grupos anteriores: a de não apresentarem diferenças significativas em nenhuma das propriedades analisadas.

O potencial de membrana dos neurônios de CA1 de tecido hipocampal Humano não variou nos três momentos estudados, ficando na ordem de -68mV . O mesmo ocorreu com a resistência de entrada que de um modo geral também não variou. Observou-se que as propriedades do limiar de disparo e amplitude também não sofreram modificações, mantendo-se em um mesmo patamar.

O fato do tecido hipocampal humano comportar-se diferentemente do hipocampo de ratos epiléticos sugere que os mecanismos “compensatórios” celulares observados nos ratos epiléticos estão ausentes nos neurônios hipocampais humanos. Talvez o fato da ELT com longa duração, refrataria, após inúmeras tentativas de tratamento medicamentoso bem como de etiologia diversa do modelo proposto contribuiria para este dado.

* ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RATOS NORMAIS X RATOS
EPILEPTICOS:

A análise das propriedades eletrofisiológicas estudadas das células de CA1 de Ratos normais e epiléticos avaliadas não evidenciaram nenhuma diferença estatística. Ambos os grupos se comportaram de forma similar. Em estudos *in vitro* com animais com epilepsia induzidas foram avaliadas as propriedades dos neurônios, com o Ringer sem o magnésio, sem a preocupação com a evolução dos mesmos em relação as alterações dos parâmetros passivos. A maioria destes estudos não mostrou diferenças nas propriedades intrínsecas neuronais nos modelos de abrasamento na amígdala (McIntyre & Wong, 1986). Estudos com registros intracelulares no modelo do ácido cainico (Franck e colaboradores, 1988) e no modelo de lesão crônica do córtex (Prince & Tseng, 1993) relataram um aumento da RE nas células piramidais de CA1 dos ratos epiléticos em relação ao seus controles. Estudos *in vitro* com o modelo do abrasamento químico por pentilenetrazol mostraram um incremento da RE na fase aguda após 6 meses de indução das crises. (Barkai e colaboradores, 1994). O mesmo foi encontrado no modelo da toxina tetânica (Watts e colaboradores, 1993). Sanabria (1999) observou um ligeiro aumento das propriedades intrínsecas dos neurônios piramidais de CA1 de animais epiléticos em relação ao seu controle, porém estas não foram estatisticamente significativas .

* ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RATOS NORMAIS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:

A análise comparativa das propriedades passivas da membrana entre neurônios hipocampais de ratos normais não detectaram diferenças significativas nos três momentos estudados (antes, durante e após o tratamento com o Ringer 0-Mg²⁺).

As diferenças foram observadas nas propriedades do disparo. A primeira propriedade a se observar uma diferença estatística foi na excitabilidade, isto é na corrente injetada para o primeiro potencial de ação. Esta diferença se deu no instante inicial, onde foram necessárias correntes mais elevadas para o primeiro potencial de ação nos ratos normais. No caso das células humanas a excitabilidade neuronal foi maior. Provavelmente este seja um “marcador” da doença celular observada no tecido hipocampal humano. Durante a perfusão algumas células humanas se comportaram de modo semelhantes aos ratos normais e outras se tornaram mais “resistentes” as correntes elétricas, dificultando a geração dos potenciais de ação (ver no anexo esta propriedade para células neuronais humanas). No grupo de ratos normais houve a necessidade de uma corrente inferior a condição inicial. Após o tratamento ambos os grupos se comportaram de forma similar com a necessidade de aplicação de um pulso de corrente mais elevada para a promoção dos potenciais de ação.

A amplitude dos potenciais de ação apresentou diferenças estatísticas nos três momentos avaliados; os neurônios de ratos normais apresentaram amplitudes de potenciais de ação mais elevadas que os neurônios humanos.

Foram constatadas diferenças na duração dos potenciais de ação com as células humanas apresentando uma duração mais longa que nos ratos normais. Foram encontradas diferenças nos potenciais de membrana ao término do potencial de ação.

Existe uma certa unanimidade em aceitar que não existam grandes diferenças nas propriedades intrínsecas das células do tecido epilético crônicos obtidos nas cirurgias de epilepsia refratária, quando comparadas com tecidos controles (Schwartzkroin, 1994). Contudo a maioria destes estudos se detém nas propriedades passivas e não se aprofundam nas propriedades ativas (Prince & Wong, 1981; Schwartzkroin & Knowles 1984, Knowles, 1992)

Uma serie de dificuldades precisam ser transpostas quando se trabalha com tecido humano. A grande dificuldade reside na questão do grupo controle. Alguns autores sugerem que na porção cerebral removida possam existir neurônios saudáveis, e que estes seriam os controles (Schwartzkroin 1983, 1994); contudo a probabilidade de obtenção de registros eletrofisiológicos nestes neurônios são remotas visto que a baixa densidade destas células no tecido estudado. A maioria do conhecimento sobre as bases celulares do funcionamento neuronal e dos mecanismos que envolvem a geração da atividade epilética provém de estudos em animais . Estes podem ser normais ou com epilepsia induzida por diferentes agentes como por exemplo a pilocarpina. Entretanto estes modelos, não expressam exatamente o fenômeno epilético humano que é bem mais complexo na expressão clínica, variabilidade eletrofisiológica e etiológicas.

* ATIVIDADES ESPONTÂNEAS OBSERVADAS DURANTE A PERFUSÃO
COM O RINGER 0-Mg²⁺ NOS GRUPOS DE ESTUDO:

A perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺ provocou um aumento da excitabilidade neuronal com o aparecimento de descargas simples e/ou descargas em salva nos grupos estudados, que sobreviveram até o final do experimento. Esta atividade foi refletida no registro extracelular (EEG).

Assim o Ringer modificado provocou o aparecimento da atividade epileptiforme nas fatias de hipocampo tanto nos registros intra como extracelulares. Nos neurônios hipocampais humanos além do aparecimento de disparos espontâneos em serie (descargas simples e salva de potenciais de ação) há registros atividade interictal/ictal-símiles espontâneas.

Uma outra situação foi observada nos neurônios hipocampais humanos onde o Ringer só provocou ondas despolarizantes, não sendo detectados nestes neurônios em nenhum momento potenciais de ação. Esta característica foi acompanhada de um potencial de membrana mais negativo e de uma resistência de entrada mais elevada. Isto evidencia uma intensa sinapse excitatória caracterizada por freqüentes potenciais excitatórios pós-sinápticos. Estudos recentes demonstraram o papel das junções gap na modulação da atividade epileptiforme em fatias cerebrais de ratos (Carlen e colaboradores 2000, Kohling e colaboradores 2001). No estudo realizado por Kohling e colaboradores (2001) a atividade epileptiforme foi induzida pela perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺ e ainda foram adicionados drogas bloqueadoras de junções gap; deteve-se na avaliação do aparecimento de descargas em salva nas áreas de CA1 e CA3 do hipocampo. Os autores concluíram que estas junções prolongam a atividade epileptiforme (Kohling e colaboradores 2001). Pode se especular

que o fato de alguns neurônios apresentarem uma intensa atividade sináptica excitatórias mas não geram potenciais de ação com o 0-Mg²⁺ seja uma consequência da diminuição da atuação destas junções.

* INDUÇÃO DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME PELO MODELO DO 0-Mg²⁺ E RECEPTORES NMDA

Nos últimos anos tem-se proposto que a hiperexcitabilidade na ELT é atribuída, pelo menos em parte, a função aumentada de uma subpopulação de sinapses glutamatérgicas que utilizam receptores NMDA (Mody & Heinemann 1987; Martin e colaboradores 1992; Köhr & Mody 1994; Bernard 1997). Dentre os mecanismos responsáveis pela atividade epileptiforme, tem sido proposta a participação não só dos receptores NMDA mas também os receptores AMPA. A base pode estar relacionada a uma alteração na fosforilação do receptor, no caso do receptor NMDA (Köhr & Mody 1994), gerando mudanças na expressão de subunidades do receptor específico para glutamato, observada em pacientes com ELT (Babb e colaboradores 1996; Blümcke e colaboradores 1996b; Mathern e colaboradores 1996c, 1997c) e em modelos experimentais de epilepsia (Mathern e colaboradores 1997b). Essas mudanças na composição das subunidades de receptores glutamatérgicos poderiam ter consequências importantes nas propriedades cinéticas assim como na permeabilidade aos íons cálcio (Nakanishi 1992; Westbrook 1994). Em nossas observações vimos que todos os neurônios de ratos, seja normal ou epilético responderam a perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺. Em contrapartida nos neurônios hipocâmpais de tecido humano uma boa parcela dos neurônios (25%) não responderam a perfusão com este

agente indutor. Isto nos leva a reflexão que além de mecanismos protetores, já relatado anteriormente, haveria a atuação de diferentes famílias de receptores NMDAs. Isto significa que determinados tipos de receptores NMDAs são mais sensíveis ao 0-Mg^{2+} do que outras. Ou outra possibilidade seria as modificações das subunidades fazendo com que algumas apresentem uma sensibilidade aumentada.

Uma outra questão seria quais as diferenças entre os receptores dos grupos e dentro deles que faz com que tenham uma maior resposta ou não. Para o esclarecimento desta hipótese há necessidade de estudo imunohistoquímicos, mas para isto deve existir uma maior especificidade dos anticorpos, para não só marcar os receptores mas permitir sua exata localização. O fato de um neurônio apresentar às vezes mais de uma família de receptores NMDA torna-se sua identificação e localização um tanto difícil.

* APARECIMENTO DE DESCARGAS EM SALVA:

Em nossos experimentos observamos que 30 % dos neurônios de ratos normais, 60% dos ratos epiléticos e 31% dos neurônios hipocámpais humanos desenvolveram descargas em salva durante a perfusão com o 0-Mg^{2+} . Sanabria (1999) verificou que a maioria dos neurônios de CA1 de ratos epiléticos apresentavam uma tendência a gerar descargas em salva. Curiosamente, estudos com eletrodos implantados em zonas epileptogênicas mostraram que 8-10% dos neurônios locais disparavam espontaneamente descargas em salva similares à descargas intrínsecas (Babb e colaboradores, 1987). Autores postularam que esses neurônios participariam da gênese da atividade epileptiforme (Babb 1987).

Estudos clássicos com registros extracelulares intracerebrais, mostraram que neurônios com descargas em salva eram freqüentes no córtex de pacientes epiléticos (Calvin e colaboradores 1973). Na época esses achados levaram ao surgimento da hipótese do “neurônio epilético” (Prince & Wong, 1981). Recentemente, contrariando estas observações, pesquisas com implante de microeletrodos extracelulares em pacientes epiléticos com crises parciais, tem demonstrado que no período interictal da ELT a gênese de descargas em salva não é um fato relevante nas regiões epileptogênicas (Colder e colaboradores, 1996 a). Nesta mesma linha estudos *in vitro* das propriedades eletrofisiológicas dos neurônios humanos em áreas epileptogênicas na ELT humana tem sido desapontadores em identificar os neurônios com descargas em salva (Avoli & Williamson, 1996). Registramos em nosso estudo que 69% das células hipocâmpais humanas não desenvolveram esta atividade com a perfusão de Ringer sem magnésio.

Segundo Traub e colaboradores existem três mecanismos propostos para o aparecimento das descargas epileptiformes do tipo “salva de potenciais de ação”. O primeiro dele conhecido como descarga em salva primária depende das propriedades intrínsecas dos neurônios de CA3 e relacionadas com as correntes de Na^+ , Ca^{2+} e K^+ e pela recorrência das conexões sinápticas excitatórias dessas células (Traub e colaboradores, 1996). A descarga em salva secundária caracteriza-se pelo aparecimento de uma despolarização dendrítica interagindo com propriedades intrínsecas (Traub e colaboradores, 1996). Este tipo de atividade depende do modelo usado e tem sido atribuído a correntes mediadas pelos receptores NMDA nos modelos da Picrotoxina e 0-Mg^{2+} (Traub e colaboradores, 1994). O terceiro mecanismo se confunde com o secundário, por apresentar o envolvimento de outros receptores glutamatérgicos.

Em relação ao aparecimento de descargas em salva alguns neurônios classificados como células que não apresentam descargas em salva (CSDS) passaram a apresentar esse

tipo de atividade com a perfusão do Ringer 0-Mg²⁺, em todos os grupos estudados. No nosso caso a perfusão em Ringer 0-Mg²⁺ provavelmente permitem identificar os neurônios que apresentaram descargas em salva secundárias.

Estudos prévios demonstraram que poucas células de CA1 poderiam disparar descargas em salva em resposta a injeção de correntes despolarizantes no soma (Schwartzkroin 1975). Estudos posteriores demonstraram que as células de CA3 eram mais susceptíveis a esse disparo. Também foram demonstradas que as células de CA1 possuem um padrão diferencial de disparo gerados a nível dendrítico (Wong & Stewart, 1992). Ao contrário do soma que geravam potenciais únicos e repetitivos ao serem estimulados diretamente, as terminações dendríticas possuíam grande predisposição ao aparecimento desta atividade, que também poderiam ser registrados no soma. Wong e Stewart (1992) observaram que em registros IC pareados (dendritos e soma numa mesma célula) o soma poderia disparar de forma repetitiva descargas em salva, sendo que a gênese dessas descargas, ao contrário das células de CA3 que acontecem no soma, não eram locais mais sim dendríticos.

Estudos posteriores questionaram os trabalhos de Wong e Stewart, com uma série de experimentos na área CA1 hipocampal, onde demonstrou-se que embora com pouca frequência, a descarga em salva somática era passível de ser induzida, quando correntes eram injetadas no soma. (Jensen e colaboradores 1994). Esta característica foi observada em alguns neurônios hipocampais independente do instante estudado, enquanto injetávamos correntes durante a aquisição dos dados para análise da curva IV,

Jensen e colaboradores realizaram uma caracterização eletrofisiológica dos neurônios de CA1 em condições normais onde foram induzida a atividades epileptiforme pelo aumento de potássio extracelular (Jensen & Yaari, 1997) Nesse estudo foi possível

observar uma acentuada predisposição a descargas em salva (origem somática) e esta estava associada ao aparecimento e manutenção da atividade epileptiforme.

* APARECIMENTO DE DESCARGAS INTERICTAIS.

As fatias cerebrais expostas a um líquido celorraquidiano artificial (LCRA) livre de Magnésio podem apresentar descargas interictais espontâneas nas áreas CA1 e CA3 (Anderson e colaboradores 1986). O envolvimento do receptor NMDA nessa atividade epileptiforme pode ser observado através da adição do APV (antagonista do NMDA) antes e durante o tratamento com o LCRA livre de Mg^{2+} . Os mecanismos subjacentes a esta atividade poderiam incluir uma redução de carga (Frankenhaeuser e colaboradores 1957) e/ou remoção do bloqueio dos canais NMDA (Nowak e colaboradores 1984) que é normalmente feito pelo Mg^{2+} . A atividade resultante tem sido também descrita em preparações de fatias cerebrais de neocórtex (Silva e colaboradores 1991), bem como em cultura de neurônios hipocâmpais (Gutierrez e colaboradores 1999 a, b).

Este tipo de atividade é frequentemente encontrada em registros eletrofisiológicos de pacientes portadores de epilepsia crônica. É um achado no eletroencefalograma (EEG) de superfície como nos registros eletrocorticográficos ou de estruturas profundas, sendo (Privitera e colaboradores 1990), sendo assim identificadas como área epileptiforme a ser removida na cirurgia (Lantz e colaboradores 1996). Esta atividade interictal pode ser observada de forma espontânea em um dos poucos estudos *in vitro*, pela ausência do íon magnésio e bloqueadores de canais, em células de tecido humano obtidos de cirurgia para o tratamento de ELT (Kohling e colaboradores 1998).

Na atividade EEG também observamos o aparecimento de descargas interictais, de baixa amplitude, durante a perfusão com o Ringer sem magnésio, tanto em neurônios que dispararam potenciais simples quanto em salva. Esta atividade se caracterizou pelo aparecimento de potenciais irregulares bifásicos (pontas). Para Johnston e Brown (1984) as pontas interictais no EEG constituem o marco da atividade epiléptica. Observamos também em nossos registros o aparecimento de descargas ictais-símiles tanto no registro intracelular quanto no EEG. Estas descargas ictais-símiles seriam o correlato da atividade epiléptica ictal observada durante a crise clínica.

Em alguns neurônios hipocâmpais humanos e ratos foi possível identificar descargas interictais epileptiforme espontâneas, durante a infusão com o Ringer sem o magnésio. O estudo da atividade epileptiforme interictal nos modelos que utilizam fatias de tecido tem sido criticados pelo fato de não exibirem esta atividade de modo espontâneo mas só após a aplicação de convulsivantes. (Nagao e colaboradores 1996). Os mecanismos básicos da gênese desta atividade foram estudados profundamente em modelos agudos de epilepsia como por exemplo: alto concentração de potássio (Jensen & Yaari, 1992), baixa concentração de Cálcio (Heinemann & Hamon, 1992), ausência de Mg^{2+} (Churn e colaboradores 1991, Kohr & Heinemann, 1989) e aplicação de antagonistas GABAérgicos (Lee & Hablitz, 1989) Porém, praticamente não existem dados na literatura referindo-se a esta anormalidade no tecido crônico, principalmente tratando-se de células hipocâmpais humanas como foram registrados no presente estudo.

* PADRÕES DE RESPOSTAS QUANTO A ACOMODAÇÃO NEURONAL:

Foram observadas em nossos experimentos diferentes padrões de respostas de acomodação neuronal e foi proposta uma classificação para as mesmas (ver quadro 3 do item classificação dos Neurônios). Esta proposta foi feita associando-se classificações já existentes como as de Connors e Amitai (1993) para neurônios corticais onde os neurônios são classificados em RS, FS e DS associados com a classificação de Azous e colaboradores (1993) que classificaram em CSDS e CDS (AL, BL) , bem como nossas observações experimentais antes do tratamento.

Estudos iniciais em tecido epilético crônico (foco epileptogênico *in vivo*) mostraram que um certo grupo de neurônios disparavam salva de potenciais de ação (Calvin e colaboradores, 1973). Estudos com microeletrodos em tecido epilético humano mostraram resultados contraditórios , mas em alguns casos foi possível detectar um padrão de disparos que se assemelhava a descargas paroxísticas em “salva” de potenciais de ação de natureza intrínseca (Calvin e colaboradores, 1973, Babb e colaboradores 1975) em 7 %-10% dos neurônios do foco epilético crônico. Contudo, a caracterização eletrofisiológica dos neurônios de acordo com o repertório de disparos no tecido epilético crônico , tem sido um tanto negligenciado nos estudos mais recentes.

Connors e Amitai (1993) revisaram a classificação dos neurônios de acordo com os critérios fisiológicos na falta de um estudo histológico ou marcação intracelular destes neurônios durante o estudo *in vitro*. Estudos recentes em eletrofisiologia revelaram que propriedades intrínsecas da membrana de neurônios neocorticais são sistematicamente diversas (Connors & Gutnick, 1990; Connors & Amitai, 1993).

Foram constatados que a grande maioria das células apresentavam um intervalo regular entre um potencial de ação e outro, recebendo por isso a denominação de Células

com Espículas regulares (“regular-spiking”) (RS). Através da marcação intracelular foram identificadas como células piramidais com grande quantidade de espinhos. Um segundo tipo de célula identificada apresentou um intervalo curto entre um potencial de ação e outro sendo classificadas como células com espículas rápidas (“fast-spiking”) (FS). Através da marcação com corantes intracelulares identificou-se como interneurônios GABAérgicos com aspecto liso (McCormic e colaboradores 1985; Naegele & Katz, 1990). Huettner & Baughman (1988) demonstraram em tecidos neocorticais em cultura que as células RS geravam respostas sinápticas excitatórias glutamatérgicas e as FS geravam potenciais pós-sinápticos inibitórios. Tanto as células RS quanto FS geravam disparos temporais repetitivos distintos. As RS se adaptavam após prolongada injeção de pulsos de correntes, já as células FS apresentam uma pequena ou mesmo não apresentavam adaptação aos mesmos pulsos de correntes. Existem evidências de que no hipocampo possam ocorrer interneurônios que apresentam propriedades do disparo intrínsecas semelhantes as dos neurônios RS e portanto distintos dos FS (Lacaille & Schwartztroin, 1988). Foram observadas ainda no córtex um outro grupo com características semelhantes a RS porém disparavam descargas em salva, sendo denominadas de células com descargas em salva (DS) (Connors e colaboradores 1982, McCormic, 1985). Estas células piramidais se restringem as lâminas 4 e 5 do córtex cerebral (Foehring & Wyler, 1990, Connors & Amitai, 1993) enquanto que as células RS e FS são encontradas em todas as camadas do córtex cerebral.

Quando se faz uma classificação topológica, que se baseia na fenomenologia, deve ser tem em mente que não se trata de uma classificação definitiva podendo ser feitas classificações adicionais subcategorizando essas 3 categorias existentes (FS, RE e DS) nas diferentes regiões cerebrais estudadas, ou mesmo em outras espécies (Gutnick & Grill,

1995). Resultados de estudos com marcação intracelular indicam que cada morfologia celular provavelmente seja consistente com o correlato fisiológico (Gutnick & Grill, 1995).

A maioria dos neurônios encontrados na camada subpial do córtex são neurônios que apresentam potências de ação com intervalos regulares, sendo de baixa frequência de acomodação. Connors & Agmon, (1992) usaram as diferenças na acomodação neuronal para distinguir os dois tipos de neurônios RS no córtex chamando-os de neurônios RS1 e RS2. O neurônio RS1, foi encontrado em todas as camadas corticais e apresentava inicialmente uma frequência de disparos alta, que sofria uma queda precipitada e se mantia numa frequência baixa. Já o tipo RS2 que foi encontrado em camadas mais profundas, apresentava um decréscimo da sua frequência de forma mais tênue. As células apresentaram potenciais de ação complexa seguida por hiperpolarização. No nosso estudo encontramos células que se comportaram como os neurônios do tipo RS1 com sensíveis variações conforme o grupo de estudo.

As células FS se distingue pela capacidade de gerar potenciais de ação repetitivamente com alta frequência (Gutnick & Grill, 1995) com uma pequena ou mesmo ausência de acomodação e os seus potenciais de ação são de rápida repolarização (McCormick e colaboradores, 1985). Encontramos um exemplar deste padrão de acomodação nos neurônios hipocámpais de CA1 humanos.

Os intervalos entre um potenciais de ação e outro são determinadas pelos canais iônicos de potássio. Estas correntes são ativadas por cálcio intracelular e foram identificadas no hipocampo (Brown e colaboradores, 1990). A corrente I_c , além de serem reguladas pela concentração de Cálcio intracelular é tempo-dependente de voltagem (Brown & Griffith, 1983). Essa corrente é ativada durante o potencial de ação simples e sua ativação contribui para a repolarização.

De posse destas informações tentamos transpor estes achados para os hipocampus sugerindo que os neurônios identificados e que apresentaram tanto disparos regulares quanto descargas em salva tratavam-se de neurônios piramidais; entretanto a certeza deste dado só poderá ser demonstrada só com a marcação intracelular (por exemplo, amarelo de Lúcifer ou biocitina). O padrão de PAs repetitivo (espículas regulares- RS) depende da participação de vários canais iônicos voltagem dependentes que “regulam” a intensidade dos PAs . Os neurônios piramidais de CA1 são um exemplo de neurônios com uma rápida adaptação (Hille, 1992) o que foi extensivamente verificado no nosso trabalho. As bases iônicas de acomodação não são completamente conhecidas mas nota-se que ocorre forte depressão da hiperpolarização pós descarga. Além disso os canais de K(Ca) do tipo SK (“small” ou corrente de potássio “pequena”) provavelmente estejam hipofuncionantes e o bombeamento dos íons cálcio para fora do citoplasma estejam aumentadas (Hille, 1992). Já em relação ao único exemplar encontrado nos neurônios hipocampais que apresentou disparos rápidos , nos sugere tratar-se de um interneurônio. O fato de identificarmos só um neurônio FS sugerindo tratar-se de um interneurônio conduz-nos a duas possibilidades: 1) os interneurônios são menores e portanto mais difíceis de serem empalados e/ou 2) no processo de epileptogênese poderá ocorrer maior perda de interneurônios do que neurônios piramidais.

* HIPÓTESE DO NEURÔNIO EPILÉPTICO X AGREGADO NEURONAL

Através de nosso estudo procuramos em comparar as propriedades neuronais intrínsecas obtidas dentro dos grupos e entre os grupos mediante perfusão das fatias de tecido com Ringer sem magnésio. Observamos que a maioria dos neurônios hipocampais que desenvolveram atividade epileptiforme, tiveram alterações de algumas de suas propriedades. Partindo desse princípio tentaremos correlacionar estes achados com as teorias existentes.

Existem duas correntes que tentam explicar a origem das crises epiléticas. Uma delas defende a chamada “hipótese neuronal” que propõe que as propriedades intrínsecas do neurônio estão alteradas, em suma o chamado “neurônio epilético”. A outra defende a hipótese da rede neuronal e baseia-se na atividade sináptica anormal; esta hipótese é também conhecida como a do “agregado neuronal” (Schwartzkroin 1994). Mas ambas as hipóteses tem em comum que a comunicação neuronal responsável pelas crises podem ser geradas também pela atuação de elementos não sinápticos associados com os elementos sinápticos (Trainelis & Dingledine 1988; McNamara 1994).

* NOSSOS ACHADOS E A TEORIA DO NEURÔNIO EPILÉPTICO

Esta teoria defende a idéia do chamado “neurônio epilético, no qual modificações das propriedades biofísicas (passivas ou ativas) da membrana seriam responsáveis pelo início das crises epiléticas. Alguns trabalhos em eletrofisiologia utilizando fatias de tecidos de

hipocampo ou de neocórtex, de pacientes que se submeteram a cirurgia não evidenciaram alterações significativas nestes parâmetros, levando a crer que não seria este o mecanismo responsável pela epileptogênese (Schwartzkroin 1994). Entretanto, outros trabalhos mostraram a existência de alterações específicas em determinadas correntes iônicas em neurônios de pacientes epiléticos (Mody 1998). Estas alterações plásticas dos canais iônicos levando ao desenvolvimento de descargas em “salva” poderiam ser determinantes para o processo de epileptogênese. Estes achados determinaram o surgimento de uma nova hipótese na epileptologia (Mody, 1988): os neurônios expressariam canais iônicos anormais, que por sua vez, alterariam as propriedades biofísicas da membrana plasmática ou mesmo sináptica, e com isso gerariam um agregado neuronal epileptógeno.

No nosso estudo observamos que especificamente os neurônios do tecido hipocampal humano não apresentaram diferenças significativa nas propriedades intrínsecas analisadas nos períodos; anterior, durante e posterior ao tratamento com o 0-Mg²⁺. No grupo dos ratos foram observadas alterações de algumas propriedades estudadas. Esta é uma diferença interessante pois sugere que pelo menos na ELT humana as propriedades intrínsecas neuronais estejam preservadas favorecendo a hipótese do “agregado neuronal”. Entretanto em relação aos animais no modelo da pilocarpina existem evidências que reforçam a teoria do neurônio epilético.

Estudos prévios em tecido epilético crônico mostraram que alguns grupos de neurônios disparavam “trens” de PA (Calvin e colaboradores 1973; Wyler e colaboradores 1975). No modelo do abrasamento (“kindling”) de hipocampo de ratos verificou-se que havia um aumento desta atividade alguns dias após a indução das crises epiléticas (Yamada & Bikey 1991; Zhao & Leung 1993). Em nossas observações vimos que houve um aumento desses disparos com a perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺. Isto sugere que

embora as propriedades intrínsecas estejam preservadas no tecido hipocampal humano, outras propriedades que evoluam a excitabilidade estejam alteradas.

* NOSSOS ACHADOS E A TEORIA DO AGREGADO NEURONAL:

• HIPERFUNÇÃO DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS:

No item “Indução da atividade epileptiforme pelo modelo do 0-Mg²⁺”, (p.240) foi comentado que a hiperfunção glutamatérgica seria devida a modificações das subunidades, mas além disto existem outros que serão abordados agora. Essa hiperfunção dos receptores glutamatérgicos está contida nesta teoria do “agregado neuronal” e reside no fato de que esta hiperfunção dos receptores glutamatérgicos é o determinante da epileptogênese.. Falando especificamente de NMDA, isto pode ser decorrente do aumento da sua expressão isto é síntese de RNAs para diferentes subunidades desses receptores, não só NMDAs como AMPA em modelos experimentais de ELT ou pacientes epiléticos (Pratt e colaboradores, 1993) Assim foram detectados variantes dos receptores originais como por exemplo, o receptor de NMDA variante “kindling” em ratos submetidos ao modelo do abrasamento (Kraus e colaboradores 1994).

A hiperexcitabilidade pode ser atribuída a distribuições topográfica das terminações sinápticas ricas em receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e NMDAs em zonas de reinervação em hipocampo de pacientes epiléticos (Mathern e colaboradores 1997 , Bluncke e colaboradores 1996). Este fenômeno geralmente era acompanhado pelo aumento da expressão desses receptores (Mathern 1998).

Estudos eletrofisiológicos também mostraram que hipocampo e córtex de ratos com epilepsia induzida pelo abrasamento (“kindling”), e de pacientes com foco epilético cortical, houve um aumento da sensibilidade para ação dos receptores do glutamato (Hwa & Avoli 1992) Este provoca um aumento da entrada de Ca^{2+} para dentro neurônio durante a atividade sináptica detectada por microeletrodos íons específicos (Louvel & Pumain 1992). Nossos resultados mostraram que houve um aumento da excitabilidade neuronal durante a perfusão com o $0-Mg^{2+}$, salvo uma porcentagem de células hipocampais humanas onde a excitabilidade não se modificou.

O fato de encontrarmos resultados mistos i.e. situações de propriedades intrínsecas neurônais (mais em ratos e pouco expressiva em tecido hipocampal humano) e modificações epileptogênicas induzida pela interferência dos receptores NMDAs (perfusão de Ringer sem magnésio) nos sugere uma combinação de fatores celulares (teoria do neurônio epilético) e sinápticos (teoria do agregado neuronal) participando da epileptogênese. Dependendo do modelo de epilepsia utilizada há preponderância de um ou outro fator e portanto destacando uma ou outra hipótese.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem as seguintes conclusões:

1. A análise por grupo mostrou que a perfusão com Ringer 0-Mg² provocou alteração em algumas propriedades neuronais intrínsecas em ratos normais (potencial de membrana, resistência de entrada, corrente injetada para o primeiro disparo) e epiléticos (potencial de membrana, resistência de entrada, corrente injetada para o primeiro disparo e amplitude dos potenciais de ação) nos diferentes momentos analisados.
2. Nos neurônios hipocâmpais humanos de CA1 não se verificou qualquer modificação significativa das propriedades neuronais intrínsecas passivas em resposta a troca dos meios de perfusão (antes, durante e após a perfusão com o Ringer sem o Magnésio).
3. O estudo eletrofisiológico comparativo das propriedades intrínsecas da membrana e propriedades do disparo de neurônios hipocâmpais de CA1 de neurônios hipocâmpais de CA1 mediante o tratamento com o 0-Mg²⁺ de um modo geral, demonstrou a existência de similaridade entre as respostas obtidas em ratos normais e epiléticos.
4. Os neurônios hipocâmpais de CA1 de tecido humano e de ratos não demonstraram diferenças significativas nas propriedades intrínsecas passivas.
5. Os neurônios de CA1 ratos demonstraram maior excitabilidade durante a perfusão com o Ringer 0-Mg² do que os neurônios humanos.
6. Foram identificados 17 padrões de respostas eletrofisiológicas nos neurônios hipocâmpais de CA1 nos grupos estudados sendo a maior diversidade encontrada no tecido hipocâmpal humano.

7. RESUMO

A epilepsia é considerada como a ocorrência de paroxismos transitórios de descargas elétricas neuronais encefálicas incontroláveis, que podem ser causadas por uma grande variedade de fatores, e que resultam em crises epiléticas. Cerca de 10-20% dos pacientes tem suas crises inadequadamente tratadas apresentando resistência à terapia medicamentosa.

Dentre as epilepsias refratárias ao tratamento clínico, aquelas com crises parciais complexas com origem no lobo temporal (ELT) são as mais frequentes. Com o objetivo de compreender as bases celulares que envolvem as ELTs buscamos através desse estudo comparar as características eletrofisiológicas de neurônios hipocampais de CA1 em três grupos distintos: ratos normais e epiléticos induzidos pela pilocarpina e células hipocampais de tecido humano obtido de procedimento cirúrgico para epilepsia. Através dessa análise buscamos estabelecer os padrões de resposta (propriedades passivas e disparo) por grupo e compará-los entre si. Foram obtidas fatias de hipocampo (500 μm) que foram mantidos *in vitro* para registros intra e extracelulares. Como meio indutor da atividade epileptiforme utilizamos a perfusão do tecido com Ringer sem magnésio.

O estudo eletrofisiológico antes, durante e depois da perfusão em Ringer sem magnésio, nos diferentes grupos evidenciou que o grupo dos ratos normais e epiléticos apresentaram alterações em algumas propriedades neuronais intrínsecas (potencial de membrana, resistência de entrada e corrente injetada para o primeiro potencial de ação.) e todos os neurônios responderam com disparos à perfusão com o Ringer 0-Mg²⁺. Ao contrário, as células hipocampais humanas, não mostraram diferenças eletrofisiológicas nas suas propriedades; 25.% dos neurônios hipocampais humanos não apresentaram hiperexcitabilidade à perfusão com Ringer sem magnésio.

A análise entre os grupos demonstrou que as propriedades intrínsecas passivas são similares entre os neurônios hipocampais de CA1 de ratos e do tecido humano.

A classificação das células estudadas segundo suas características eletrofisiológicas e padrão de acomodação permitem identificar 17 padrões de respostas nos grupos estudados, sendo a maior diversidade encontrada no tecido hipocampal humano.

Nossos achados validam a utilização de neurônios hipocampais de CA1 de ratos como grupo controle para estudos com tecido hipocampal humano, no modelo do meio de perfusão livre de magnésio. Também sugere que dependendo do modelo de epilepsia induzida utilizado há preponderância de mecanismos neuronais (“neurônio epilético”) ou de circuito neuronal (“agregado neuronal”) na epileptogênese.

8. ABSTRACT

Epilepsy is considered the occurrence of transitory paroxysms of uncontrolled neuronal electrical discharges, which can be caused by a great diversity of factors, and that results in epileptic seizures. About 10-20% of patients have medically refractory epileptic seizures. Among the medically refractory epilepsies, those with complex partial seizures from the temporal lobe (TLE) are the most frequent. In order to understand the cellular basis of the TLEs we aim in this study to compare the electrophysiological characteristics of CA1 neurons of three distinct groups: normal rats, rats with epilepsy induced by pilocarpine and human hippocampal tissue obtained from epileptic patients underwent to surgical treatment of temporal lobe epilepsy. Through this analysis we try to describe the passive and firing properties for each group and to compare them.

The 500 μ m hippocampal slices were maintained in vitro for intra and extracellular recordings. The ictal and interictal epileptic activity were induced with Magnesium-free medium. The electrophysiological analysis before, during and after perfusions with Magnesium-free Ringer solution came to show us that both normal (control) and epileptic rats present different intrinsic neuronal properties (input resistance, membrane potential, excitability) but the neurons respond with firing when perfused with Magnesium-free Ringer solution. However in the human hippocampal neurons it was not detected changes in their electrophysiological properties; also, 25% of the human hippocampal neurones did not show hyperexcitability when perfused with Magnesium-free Ringer solution.

The analysis among the groups demonstrates that many properties are similar among human and rats CA1 neurons.

We classified the recorded neurons according to their electrophysiological and accommodation patterns. So, it was possible to identify 17 different electrophysiological

patterns; however the greatest diversity was found in the human hippocampal CA1 neurons.

Our results suggest that rats CA1 hippocampal neurons are valid as control group during experimental studies with human hippocampal tissue. Also we can speculate that the hypothesis of “epileptic neurons” or “neuronal aggregate” to explain the pathogenesis of the epileptic activity is dependent of the experimental epileptic model used.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agmon A and Connors BW. Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *Journal Neuroscience*. 12: 319-29, 1992.
2. Ajmone M C . Electrographic aspects of epileptic neuronal aggregates. *Epilepsia*, 2:22-8, 1961
3. Alger B E, McCarren M and Fisher R S. On the possibility of simultaneously recording from two cells with a single microelectrode in the hippocampal slice. *Brain Research*, 270(1):137-41, Jun, 27, 1983.
4. Alger B E and Nicoll R A. Epileptiform burst afterhyperpolarization: calcium dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science*, 210: 1122-1124, 1992.
5. Al Kadhi K A and Tian L M. Veratridine-enhanced persistent sodium current induces bursting in CA1 pyramidal neurons. *Neuroscience* 71: 625-32, 1996
6. Al- Noori S, Pierson M G, Swann J W. Bases celulares da epileptogenicidade estudadas in vitro. Editores: da Costa J C, Palmieri A, Yacubian E M T e Cavalheiro. *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias: Aspectos Clínicos e Cirúrgicos*. Editorial Lemos, 1998, p.43-59.
7. Aicardi G and Schwartzkroin P A. Suppression of epileptiform burst discharges in CA3 neurons of rat hippocampal slices by the organic calcium channel blocker, verapamil. *Experimental Brain Research*, 81: 288-96, 1990.
8. Andreasen M and Lambert J D. Regenerative properties of pyramidal cell dendrites in area CA1 of the rat hippocampus. *Journal Physiology (London)*, 483:421-441.
9. Andersen P; Eccles J.C and Loynning Y. Pathway of postsynaptic inhibition in the Hippocampus. *Journal Neurophysiology*. 27:608.619; 1964.

10. Anderson W.W.; Lews D.V; Swartswelder H.S et al. Magnesium free medium activates seizure like events in the rat hippocampal slice. *Brain research*, 215-219. 1986.
11. Andrew R D. Endogenous bursting by rat supraoptic neuroendocrine cells is calcium dependent. *Journal Neurophysiology (London)* , 384: 451-465, 1987.
12. Assaf YS and Chung S.H. Release of endogenous Zn^{2+} from brain tissue during activity. *Nature*. 308:734-6. 1984.
13. Asprodini EK, Rainnie DG, Anderson AC et al. In vivo kindling does not alter afterhyperpolarizations (AHPs) following action potential firing in vitro in basolateral amygdala neurons. *Brain Research*. 588(2):329-34 1992
14. Avanzini G., De Curtis M., Franceschetti, S. and Frassoni, C. GABA and epilepsy: a study on thin hippocampus slices in vitro. *Acta Neurol Napoli* 7, 191-99, 1985
15. Avoli, M., Louvel, J., Pumain, R. and Olivier, A. Seizure-like discharges induced by lowering $[Mg^{2+}]_o$ in the human epileptogenic neocortex maintained in vitro. *Brain Research*, 417:199-203, 1987.
16. Avoli, M and Olivier, A.. Bursting in human epileptogenic neocortex is depressed by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Neuroscience Letters* 76, 249-54, 1987
17. Avoli A and Olivier A. Electrophysiological Properties and Synaptic responses in the Deep Layers of the Human Epileptogenic Neocortex *In Vitro*. *Journal Neurophysiology* . 61(3):589-606. 1989.
18. Avoli A; Jacques L; Drapeau et al. GABA A. mediated Inhibition in Vitro Epileptogenesis in the Neocortex. *Journal Neurophysiology*. 73(2):468-484. 1995.

19. _____; HWA G; Louvel; et al. Functional and Pharmacological Properties of GABA-mediated Inhibition in The Human Neocortex. *Canadian Journal physiology Pharmacological*; 75:526-534; 1997.
20. Avoli M and Williamson A .Functional pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro. *Program Neurobiology*, 48: 519-54, 1996
21. Av Ron E. The role of a transient potassium current in a bursting neuron model. *Journal Math. Biol*, 33:71-87, 1994.
22. AXON, T G. The Axon guide for electrophysiology & biophysics. Laboratory Tecniques. CA, Axon Instruments, INC, 1993.
23. Azous R, Jensen M S and Yari Y. Ionic basis of spike after-depolarzation and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Journal Physiology (London)*, 492:211-23, 1996
24. Babb T.L and Brown W.J. Pathological findings in Epilepsy – Surgical Treatment of the Epilepsies. New York; Raven Press, p.511-540. 1987.
25. Babb TL; Kupfer WR; Pretorious JK; et al. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*, 42 (2): 351-363. 1991.
26. Babb TL, Lieb JP, Brown WJ et al. Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia*, 25(6):721-8. 1984.
27. Babb TL ,Matherm GW, Leite JP et al. Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and Kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Research* 26 :193-205,1996.
28. Babb T. Axonal growth and neosynaple genesis in human and experimental hippocampo epilepsy . *Adv neurol*, 72: 45-51,1997.

29. Barkai E, Grossman Y and Gutnick M J. Long Term changes in neocortical activity after chemical kindling with systemic pentileneletrazole:na in vitro study *Journal Neurophysiology*, 72: 72-83, 1994.
30. Bashir, Z.I and Vignes, M . Electrophysiological Recording in Brain Slices. Neuroscience. LABFAX. Lynch MA and O'Mara SM editors; Academic press cap 2, p:13.32 1997.
31. Behs T , Pseudocrises não epilepticas . *Epilepsia :The Lancet*, p.29.38.1990
32. Bernard C and Wheal H.V. Plasticity of AMPA and NMDA receptor. Mediated epileptiform activity in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 21: 95-107. 1995.
33. Blumcke I; Beck H; Scheffler B et al. Altered distribution of the alpha.amino.3.hydroxy.5.methyl.4.isoxazole propionate receptor subunit GluR2(4) and the N.methyl.D.aspartate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathologica*. Dec 92 :576-587. 1996.
34. Bluncke , I; Beck , H; Ailing, A. L; Otmar, D.W. Molecular Neuropathology of Human Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy research*; 36:205-223; 1999.
35. Branco D .Input Resistance. Texto destinado aos bolsistas do neurolab, 1998.
36. Brook-Kayal A . R; Shumate M; Hong J; Rikhter, T; Coulter, D.A . Seletive Changes in Single Cells GABA_A Receptor Subunit Expression and function in Temporal lobe Epilepsy . *Nature Medicine*, 4(10):1116-72 .
37. Buckmaster PS and Dudek F E . Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol* 1997 Sep 1;385(3):385-404

38. Buhl EH, Otis TS, Mody I. Zinc-induced collapse or augmented inhibition by GABA in a temporal lobe epilepsy model. *Science*; 271:369-73. 1996;
39. Brown D A and Griffith W H. Calcium-activated outward current in voltage clamped hippocampal neurones of the guinea pig. *Journal Physiology (London)*337: 287-301, 1983.
40. Brown T H and Zador AM. Hippocampus . edited by Shepperd G M. Synaptic Organization of The Brain. Oxford University Press; 3 ed, 1990, cap 11, p. 346-88.
41. Carlen P L, Skinner F, Zhang L, et al. The role of gap junctions in seizures. *Brain Research Review*, 32:235-41, 2000.
42. Cavalheiro, E. A . Leite, J. P; Bortolotto, Z.A et al. Long Term effects of Pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32: 778.-82; 1991.
43. Calvin, W.H., Ojemam, G.A., Ward, A.A. Human cortical neurons in epileptogenic foci: comparison of interictal firing patterns to those of "epileptic" neurons in animals. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 34: 337-51, 1973.
44. Chamberlin NL, Dingledine R. GABAergic inhibition and the induction of spontaneous epileptiform activity by low chloride and high potassium in the hippocampal slice. *Brain Research.* 445:12-18 (1988).
45. Cockerell O C e Shorvon D.S. Epidemiologia . Epilepsia: Conceitos atuais. Direitos ped. Lemos. 1997. P. 1-13 .
46. Coder B W , Frysinger R C Wilson C L , et al. Decreased neuronal burst discharge near site of seizure onset of epileptic human temporal lobes. *Epilepsia* 37: 113-21, 1996.

47. Connor Bw. Initiation of synchronized neuronal bursting in enocortex. *Nature* 310:685-87,1984
48. Connors e Bw, Gutnick MJ and Prince DA. Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *Journal Neurophysiology*.48:1302-320. 1982..
49. Connors BW; Gutnick MJ. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons . *Trends Neurociencia*.13:99-104. 1990.
50. Connors BW and Amitai Y. Generation of Epileptiform discharge by local circuits of neocortex. In: Schwartzkroin P.A, ed. Epilepsy: models, mechanisms and concepts. New york: Cambridge Uninersity press: 388.423.
51. Cole AE and Nicoll RA. The pharmacology of cholinergic excitatory responses in hippocampal pyramidal cells. *Brain Res*.Jul 9;305(2):283-90. 1984.
52. Coutinho, L. M. B.; Hilbig, A; Calgagnotto et al.. Neuropatologia das epilepsias de difícil controle . *Arquivos de Neuropsiquiatria* , 57 :405-14. 1999.
53. Coulter DA. Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system after status epilepticus. *Epilepsia* 1999; 40 Suppl 1:S23-33; discussion S40-1.
54. Coyle, J.T., Bird, S.J., Evans, R.H., Gulley, R.L., Nadler, J.V., Nicklas, W.J. and Olney, J.W. (1981). Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity, and mechanisms of action. Based on an NRP one day conference held June 30, 1980. *Neurosci Res Program Bull* 19 (4)1-427.
55. Cronin J. Obenhaus A, Houser CR et al .Electrophysiology of dentate cells after kainate induced synaptic reorganization of the mossy fibers. *Brains Res* , 573:305-10. 1992;
56. Da Costa, J.C; Russo, R; Guillermo, G et al. Bases Celulares da Epilepsia. *Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia*, 5(1):9.17; 1992.

57. De Lanerole, N.C. et al. Distribution of NMDA and quisqualate acid receptors in the hippocampus of human temporal lobe epilepsy (abstract). *Epilepsia* 31:625, 1990
58. de Paula; L, Palmini, A ; Sakamoto, A , Cendes, F ; Arruda , F; Castro, LH. Critérios Mínimos para a Realização do tratamento Cirúrgico de Epilepsia. Indicação para a admissão de pacientes em protocolos de Investigação para o tratamento cirúrgico das Epilepsia.. *Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology* .76.79 (2001)
59. Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD (1980) Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp Brain Res* 40:432-439.
60. Dingledine, R. Hippocampus: synaptic pharmacology. *In: DINGLEDINE, R. (ed.) Brain slices*, Plenum Press, New York and London, 87-112, 1984.
61. Dingledine R and Gjestad L. Reduced Inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. *Journal Physiology* (London), 305: 297-313, 1980.
62. Dingledine R; McBain C. Excitatory Amino Acid Transmitters . *Basic Neurochemistry: Molecular* . edited by G.J. Siegel et al. Cellular and Medical Aspects, 5 th Ed, 1994. cap 17:, p.367-386;
63. Du F F.; Whetsell W.J; Abou, K.B et al . Preferential Neuronal Loss in Layer III Entorhinal cortex in Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy research* 16:223-233, 1993.
64. Dutar P and Nicoll R A . A physiological role for GABA_B receptors in the central nervous system. *Nature*, 332(6160):156-8. Mar 10, 1988.
65. Engel J Jr. Brain Metabolism and pathophysiology of human epilepsy. *In: March Dichter (Ed). Mechanism of epileptogenesis* , Plenum press, pp. 1.15, 1988.

66. Engel J Jr (1996b). Clinical evidence for the progressive nature of epilepsy. *Epilepsy Research Suppl.*;12:9-20.
67. Engel J Jr (1996a). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* Dec;26(1):141-50. Review.
68. Esclapez, M., Hirsch, J.C., Khazipov, R., et al. Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 94 : 12151-156. Oct, 1997.
69. Feder R and Ranck JBJ. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. Hippocampal slow waves and theta cell firing during bar pressing and others behaviours . *Experimental Neurology* 41: 532-55, 1973..
70. Fernandes, JG. Epidemiologia das crises epiléticas em Porto Alegre: um estudo populacional. Tese de Doutorado, apresentada ao Curso de pós-graduação em Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, junho de 1993.
71. Foehring R C and Wyler A R. Two patterns of firing in human neocortical neurons. *Neuroscience Letters*, 110: 279-85, 1990.
72. Fox Re and Ranck JBJ. Electrophysiological characteristics of hippocampal complex-spike cells and theta cells. *Experimental Brain Research*, 41:399-410.1981.
73. Franck, J.E., Kunkel, D.D., Baskin, D.G. and Schwartzkroin, P.A.. Inhibition in kainate-lesioned hyperexcitable hippocampi: physiologic, autoradiographic, and immunocytochemical observations. *Journal Neuroscience*, 8: 1991-2002, 1988.
74. Franck JE, Pokorny J, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 36:543-58. 1995.

75. Frankehaeuser B., Hodkin AL. The Action of Calcium on the electrical properties of the squid axon. *Journal Physiology*, 218.224, 1957
76. Fustes O.J.H. and Fustes O J H. Historia de Las Epilepsias: Apuntes Historicos Cubanos. *Jornal Brasileiro de Epilepsia*; 5(2):47-49; 1992.
77. Gall CM, Isackson PJ . Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science* 18: 245(4919):758-61, aug 1989.
78. Gastaut H. Letter: 'Epileptic seizures' *Dev Med Child Neurol* 1973 Oct;15(5):688.9
79. Gibbs, J.W., Zhang, Y.F., Kao, C.Q. et al.. Characterization of GABA(A) receptor function in human temporal cortical neurons. *Journal Of Neurophysiology*. 75: 1458-1471, 1996.
80. Gibbs J W III, Sombati S; De Lorenzo et al. Physiological and pharmacological alterations in postsynaptic GABA A receptors function in a hippocampal culture model of chronic spontaneous seizures. *Journal Neurophysiology*, 77:2139-52; 1997.
81. Gibbs Jw, Shumote MD adn Coulter DA Differential epilepsy-associated alterations in post-synaptic Gaba A receptor function in dentar granule and CA4 neurons-*Journal Neurophysiology*, 77:1451-1471.1997.
82. Gibbs J W III , Zhang Y, Chang.Ging K; et al . Characterization of GABA A receptor function in human temporal cortical Neurons – *Journal Neurophysiology*; 75(4):1458-71; 1997.
83. Guerreiro, C. A. M. Aspectos Gerais. *In*: Guerreiro, C. A. M. e Guerreiro, M.M.,(eds.), *Epilepsia*. São Paulo, Lemos, 2a. ed. pp. 1-11, 1996.
84. Gutierrez R, Armand V, Schuchmann S, et al. Epilepiform activity by low Mg^{+2} in cultured rat hippocampal slices. *Brain research*. 815:294-303; 1999a.

85. Gutierrez R and Heinemann U. Synaptic Reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. *Brain research*. 815:304- 16; 1999_b.
86. Gutnick M J and Grill W E. The cortical neuron as an electrophysiological unit. *The cortical Neuron*, edited by Gutnick M J and Mody I. Oxford University press, cap 3, 33-51, 1995.
87. Guyton, A C . *Neurociencias básica: Anatomia e Fisiologia*. 2 ed, Guanabara Koogan, 1993.
88. Hablitz JJ, Heinemann U. Alterations in the microenvironment during spreading depression associated with epileptiform activity in immature cortex. *Dev Brain Res* 46:243-52, 1989.
89. Heinemann U, Beck H, Dreier JP, et al. The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptic activity. In: Ribak CE, Gall CM, Mody I, eds. *The dentate gyrus and its role in seizures*. Amsterdam: Elsevier, 1992:273.80.
90. Henderson G. Pharmacological analysis of Synaptic Transmission in brain slices. edited by Wallis DI . *Electrophysiology: A practical Approach* . Oxford University press, 1993 cap 5, p: 89-107.
91. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2 ed; Sinauer associates Inc. Sunderland, 1992.
92. Howell G A, Welch M G, Frederickson C J. Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 308: 736-38. 1984;
93. Huettner J E and Baughman R W. The pharmacology of synapses formed by identified corticocollicular neurons in primary cultures of rat visual cortex. *Journal Neuroscience*. 1988 Jan;8(1):160-75, jan 8, 1988.

94. Hwa G G. and Avoli M. Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA and non.NMDA receptors in the superficial/middle layers of the epileptogenic human neocortex maintained in vitro. *Neurosci Lett* 143: 83-6, 1992.
95. Isokawa M , Levesque M , Fried I., Engel Jr . Glutamate Currents in Morphologically Identified Human Dentate Granule Cells in Temporal Lobe Epilepsy. *Journal Neurophysiology*; 77:3355-69; 1997.
96. Isokawa M and Levesque MF. Increased NMDA responses and dendritic degeneration in human epileptic hippocampal neurons in slices. *Neuroscience Letters*;132(2):212-6, Nov 11, 1991
97. Isokawa M. Decreased time constant in Hippocampal dentate granule cells in pilocarpine-treated rats With Progressive seizures frequencies. *Brain Research*, 718:169-75, 1996.
98. Jefferys JGR, Haas HL. Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature* 300:448-50, 1982..
99. Jensen MS, Azouz R, Yaari Y. Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *Journal Neurophysiology*;71(3):831-9, 1994.
100. Jensen M S and Yaari Y. Role of Intrinsic Burst Firing, Potassium Accumulation, and Electrical Coupling in the Elevated Potassium Model of Hippocampal Epilepsy *Journal Neurophysiology* , 77: 1224-33, 1997.
101. Johnston D and Brown TH. Mechanisms of neuronal burst generation. In Eds. PA Schwartzkroin and H Wheal . *Electrophysiology of Epilepsy*.. 1984. Academic Press New York, 277.301.

102. Jorge C.L; Grossmann R.M; Yacubian E.M.T and Valerio R.M. Epilepsia com esclerose mesial temporal: Aspectos clínicos e fisiopatológicos. *Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*; 2(4): 215-27, 1996.
103. Kandel E R, Scharstz J H Jessel T M Fundamentos da Neurociências e do Comportamento. Capítulo 8 Prentice Hall do Brasil, p.111-131.1996
104. Kandel ER. and Spencer WA. Electrophysiology of hippocampal Neurons II. After potentials and repetitive firing. *J. Neurophysiology.*, 24:243-59. 1961.
105. Keefe e Dostrovski 1971.
106. Kelso S R and Brown T H. Differential conditioning of associative synaptic enhancement in hippocampal brain slices. *Science*, 232: 85-7. 1986
107. Knowles W D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation *Journal of Clinical Neurophysiology* ; 9(2):252-63, 1993.
108. Knowles WD and Schwartzkrain, PA, Axonal ramifications of hippocampal CA1 pyramidal cells *Journal Neuroscience*. 1:1236-41,1981
109. Kohling, R. Gladwel, S J ; Bracci, et al. Prolonged Epileptiform Bursting induced by 0 Mg ²⁺ in Rat Hippocampal Slices Depends on Gap junctional Coupling. *Neuroscience*, 105(3):579-587, 2001
110. Köhling, R., Schmidinger, A., Hülsmann, S et al- Anoxic Terminal negative DC. Shift in human neocortical slices *IN VITRO* . *Brain Research*. 741:174- 79; 1996
111. Kohling R; Luck A .; Straub, H, et al- Spontaneous sharp waves in neurocortical slices excised from epileptic patients- *Brain*. 121:1073-87; 1998.

112. Kohr G, De Koninck Y and Mody I. Properties of NMDA receptor channels in neurons acutely isolated from epileptic (kindled) rats. *Journal Neuroscience*, (8):3612-27, Aug;13, 1993.
113. Kohr G. and Mody I. Kindling increases N.methyl.D.aspartate potency at single N.methyl.D.aspartate channels in dentate gyrus granule cells. *Neuroscience*, 62:975-81. 1994
114. Kokaia, M., Pratt, G.D., Elmer, E., et al Biphasic differential changes of GABAA receptor subunit mRNA levels in dentate gyrus granule cells following recurrent kindling-induced seizures. *Molecular Brain Research* 23:323-32, 1994.
115. Konnerth A , Heinemann U and Yaari Y. Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro .I development of seizure like activity in low extracellular calcium. *Journal Neurophysiology*. 56:409-23.1996.
116. Kraus, J.E., Yeh, G.C., Bonhaus, D.W. et al. Kindling induces the long-lasting expression of a novel population of NMDA receptors in hippocampal region CA3. *Journal Neuroscience* 14, 4196-205, 1994.
117. Lantz G, Holub M, Ryding E, Rosen I. Simultaneous intracranial and extracranial recording of interictal epileptiform activity in patients with drug resistant partial epilepsy: patterns of conduction and results from dipole reconstructions. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*.99(1):69-78. Jul, 1996.
118. Lloyd, K.G., Bossi, L., Morselli, P.L., Munari, C., Rougier, M. and Loiseau, H. . Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. *Adv. Neurol*. 44, 1033-1044. 1986.
119. Longo, B.M. and Mello, L.E. Blockade of pilocarpine- or kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. *Neuroscience Letters* 226, 163-166, 1997.

120. Lorenzon N.M. and Föehring R. C . Relationship between repetitive firing and after hyperpolarizations in human Neocortical Neurons. *Journal Neurophysiology*. 67(2):350-363; 1992.
121. Loscher, W. Basic aspects of epilepsy. *Curr.Opin.Neurol.Neurosurg*. 6, 223-32, 1993.
122. Lothman, E.W., Bertram, E.H., 3rd, Kapur, J. and Bekenstein, J.W. (1996). Temporal lobe epilepsy: studies in a rat model showing dormancy of GABAergic inhibitory interneurons. *Epilepsy Res Suppl* 12, 145-156.
123. Louvel J, Pumain R.(1992) N.methyl.D.aspartate.mediated responses in epileptic cortex in humans: an in.vitro study. *Epilepsy Res Suppl* 1992;8:361.6; discussion 366.7.
124. Louvel, J., Pumain, R., Avoli, M, et al . GABA_A inhibition controls the calcium flows during NMDA-dependent epileptiform activity in human epileptogenic neocortex. *Epilepsy Res Suppl* 12: 293-300 1996.
125. Lux HD, Heinemann U, Dietzel I (1986) Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. In: *Advances in neurology*, Vol 44, Basic mechanisms of the epilepsies (Delgado-Escueta AV, Ward AA, Woodbury DM, Porter RJ, eds), pp 619-639. New York: Raven.
126. MacVicar B.A. and Dudek F.E. Intracellular recordings from hippocampal CA3 pyramidal cells during repetitive activation of the mossy fibers in vitro. *Brain Res* 168, 377-381, 1979
127. Mangan P.S., Rempe, D.A. and Lothman E.W. Changes in inhibitory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Journal Neurophysiology* 74: 829-40.1995.

128. Mangan, P.S. and Bertram, E.H. 3rd. Shortened-duration GABA_A receptor-mediated synaptic potentials underlie enhanced CA1 excitability in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 80: 1101-11. 1997.
129. Marino, Jr R.; Cukiert A. e Pinho E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo. Um estudo da prevalência. *Arq Neuro.Psiquiatr* (São Paulo) 1986; 44(3):243-54
130. Martin D., McNamara J.O. and Nadler, J.V. Kindling enhances sensitivity of CA3 hippocampal pyramidal cells to NMDA. *Journal of Neuroscience* 12, 1928-35. 1992.
131. Mathern, G.W., Bertram, E.H., Babb, T.L. et al In contrast to kindled seizures, the frequency of spontaneous epilepsy in the limbic status model correlates with greater aberrant fascia dentata excitatory and inhibitory axon sprouting, and increased staining for N-methyl-D-aspartate, AMPA and GABA(A) receptors. *Neuroscience* 77,:1003-19. Apr 1997a.
132. Mathern, G.W., Leite, J.P., Babb, T.L., et al. Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. *Neuroreport* . 1029-103. Apr 7, 1996.
133. Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Kornblum, et al.. Human hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Brain* 120:1937-59. 1997c
134. Matsuda, S, Li, Y., Desaki, J., et al. . Development of Purkinje cell bodies and processes with basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *Neuroscience* 59: 651-62, 1994.
135. Matsumoto H and Ajmore Marsan,. Cortical Cellular Phenomena in experimental Epilepsy: interictal Manifestations. *Experimental Neurology* : 9:286.304. 1964.
136. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263, 1984.

137. McNamara JO . Cellular and molecular basis of epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 14:3413-25, 1994.
138. McGonigle P. and Molinoff P. Receptors and Signal Transduction: Classification and Quantitation. *Basic Neurochemistry: Molecular , Cellular and Medical Aspects*, 5 th Ed, edited by G.J. Siegel et al, cap 10:209-16; 1994.
139. McCormic D A, Connors B W; Lighthall J W; Prince D A. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny neurons of neocortex. *Journal of neurophysiology*,54: 782-0806, 1985.
140. Mckernan R M and Whiting P J Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neuroscience*;19(4):139-43. Review, Apr, 1996).
141. McIntire D C and Wong R K. Cellular and synaptic properties of amygdala-Kindled pyriform cortex in vitro. *Journal Neurophysiology*, 55:1295-307, 1986
142. Meldrum, B.S. Anatomia , Fisiologia e Patologia. *Epilepsia: The Lancet*, p.29.38.1990
143. Mello, L.M.A . Aspectos Neurofisiologicos das epilepsias do Lobo Temporal. *Jornal da liga Brasileira de Epilepsia*; 6(3):1-4; 1993
144. Mello L.M.A, Cavalheiro E. A ; Tan M. A , et al . Circuit mechanisms of seizure in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fibers sprouting. *Epilepsia*, 34(6):985- 94; 1993
145. Mello L E A. Mecanismos Básicos. Editores:Guerreiro C A M, Guerreiro M M, Cendes, F.; Lopes.Cendes – Epilepsia – Lemos editorial and gráficas ltda, cap 3 ; 420 pp, 2000.

146. Mody I., Heinemann U., MacDonald J.F. and Salter M.W. Recruitment of NMDA receptors into synaptic transmission after kindling-induced epilepsy and its possible mechanism. *Epilepsy Res Suppl* 8, 307-10 1992.
147. Mody, I. . Ion channels in epilepsy. *International Review Neurobiology* 42, 199.226, 1998.
148. Monaghan DT; Bridges, RJ. 1989. The Excitatory aminoacid receptors: Their Classes, Pharmacology, and distinct properties in the function of Central Nervous System. *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 29:365-402, 1989.
149. Moraes WA. Inibição do epileptogênese no modelo da pilocarpina. Tese apresentada à universidade Federal de São Paulo escola paulista de medicina para obtenção do título de mestre em Neurologia, 1995 92p.
150. Mozrzymas, J.W. and Cherubini, E. Changes in intracellular calcium concentration affect desensitization of GABA(A) receptors in acutely dissociated P2-P6 rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 79: 1321-28.1998.
151. Muller HP, Levey AI, Rothstein JD, et al Alterations in glutamate transporter protein levels in kindling-induced epilepsy. *J Neurochem* 1997 Apr;68(4):1564-70
152. Muller M, Gahwiler, B. H.; Rietschin, L , et al Reversible loss of dendritic spines and altered excitability after chronic epilepsy in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*;; 90(1):257-61; 1993a.
153. Muller M . Morfological and Functional consequences of chronic epilepsy in rat Hippocampal Slice Cultures. *European Journal of Physiology (Pflugersrs Arch)*; 422(4):418.423;1993b.
154. Nadler J.V., Perry B.W. and Cotman C.W. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Research*, 182: 1-9, 1980.

155. Naegele J R and Katz L C. Cell surface molecules containing N-acetylgalactosamine are associated with basket cells and neurogliaform cells in cat visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 10: 540-57 ; 1990.
156. Nakajima, S., Franck, J.E., Bilkey, D. and Schwartzkroin, P.A.. Local circuit synaptic interactions between CA1 pyramidal cells and interneurons in the kainate-lesioned hyperexcitable hippocampus. *Hippocampus*, 1, 67-78. 1991
157. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 258(5082):597-603. Review. Oct 23;1992.
158. Nicholson C. Regulation of the ion microenvironment and neuronal excitability. In: *Basic mechanisms of neuronal excitability*, Jasper HH, van Gelder NM, eds, pp 185-216. New York: Liss, 1983
159. Nurse, V; Lacaille, J.C. Do GABAA and GABAB Inhibitory Postsynaptic Responses Originate from Distinct Interneurons in the Hippocampus? – *Canadian Journal of Physiology Pharmacological*; 75:520-25; 1997.
160. Nowak, L.; Bregestovsk, P.; Herbert, A et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neocortex – *Nature*, 462-65, 1984.
161. Okazaki M M ; Evenson DA and Nadler VD. Hippocampal Mossy fiber Sprouting and Synapse Formation after Status Epilepticus in Rats: Visualization after Retrograde Transport of Biocytin. *The journal of comparative Neurology*, 352:515-34. 1995
162. Olney, J.W., Collins, R.C. and Sloviter, R.S. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv. Neurology*. 44, 857-77.
163. Patrylo.P.R. and Dudeck FE. Physiological unmasking of new glutamic pathways in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-induced epileptic rats. *Journal Neurophysiology*. 79: 418-29, 1998.

164. Pan E H and Stringer J L. Burst characteristics of dentate gyrus granule cells: evidence for endogenous and nonsynaptic properties. *Journal Neurophysiology*, 75: 124-32, 1996.
165. Penney, J.B et al. Excitatory aminoacid binding sites in the hippocampal region of Alzheimer's disease and other dementias. *Journal Neurology Neurosurgery Psychiatry*; 53: 313-20; 1990.
166. Perez, Y., Morin, F., Beaulieu, et al, J.C.. Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate-treated rats. *European Journal Neuroscience* 8: 736-48. 1996.
167. Pitckamen, A. Tuunanen, J. Kalviainen, et al. Amigdala Damage in Experimental and Human temporal lobe Epilepsy. *Epilepsy research* 32: 233-253; 1998
168. Prince D A and Tseng G F. Epileptogenesis in chronically injured cortex: in vitro studies. *Journal Neurophysiology*, 69: 1276-91, 1993.
169. Prince D A and Wong R K S. Human epileptic neurons studied in Vitro. *Brain research*; 210: 323-33, 1981.
170. Privitera MD ; Quinlan J G and Yeh H S. Interictal Spike detection Comparing subdural and depth electrodes during electrocorticography. *Electroencephalograph Clin. Neurophysiology*, 29: 496-510, 1990.
171. Quigg, M.; Bertran, E.H; Jackson, T. Longitudinal Distribution of Hippocampal atrophy in mesial temporal lobe epilepsy– *Epilepsy research*; 27: 101-110 ;1997.
172. Ranck J B J. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. Part I Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp. Neurol.*, 14: 462-31, 1973.

173. Rempe D.A., Bertram E.H., Williamson J.M. and Lothman E.W. Interneurons in area CA1 stratum radiatum and stratum oriens remain functionally connected to excitatory synaptic input in chronically epileptic animals. *Journal of Neurophysiology*. Sep 78, 1504-15, 1997.
174. Represa, A. and Ben Ari, Y. Kindling is associated with the formation of novel mossy fibre synapses in the CA3 region. *Experimental Brain Research*, 92:69-78. 1992
175. Ribak, C.E.. Local circuitry of GABAergic basket cells in the dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl* 7, 29.47. 1992.
176. Ribak, C.E., Harris, A.B., Vaughn, J.E. and Roberts, E. Inhibitory, GABAergic nerve terminals decrease at sites of focal epilepsy. *Science* 205: 211-14 1979.
177. Rogawiski, M A and Porter , RJ – Antiepileptic drugs : pharmacological Mechanisms and Clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds . *Pharmacol. Ver.*, 42:223.286, 1990
178. Rudy, B. and Iverson E.L. *Ion Channels: Methods in Enzymology*. vol.207. Academic press, 1992, 917pp.
179. Sander , J W; Hart, H.M. *Epilepsia : Um Guia Prático*. editora: Merit; 182 pp; 1999.
180. Sanabria E R Estudo eletrofisiológico da epileptogênese crônica no modelo de epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina. Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina para a obtenção do título de Doutor em Neurociências, São Paulo, 200 pp. 1999.
181. Sanabria E.R.G; Scorza, F.A and Cavalheiro E.A .O Uso de Fatias de Tecido Cerebral (“Brain slices”) no Estudo da Epilepsia do Lobo temporal. *Rev. Neurociências*, 5 (1):34-46, 1996.

182. Sanabria E R G e Cavalheiro E A . Epileptogênese : Contribuição dos Modelos Experimentais. Editores:Guerreiro C A M, Guerreiro M M, Cendes F., Lopes-Cendes I. *Epilepsia* . Lemos editorial e gráficas Ltda, cap 4 ; p. 29-57, 2000.
183. Sah P, Gibb A J and Cage P H. The sodium current underlying action potentials in Guinea pig Hippocampal CA1 neurons. *Journal General Physiology*, 91:373-98, 1988.
184. Schwartzkroin, P.A. Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain Research*, 85: 423-36, 1975.
185. Schwartzkroin PA. Secondary range rhythmic spiking in hippocampal neurons . *Brain Research* 149: 247-50, 1978.
186. Schwartzkroin P.A. Cellular electrophysiology of human epilepsy. *Epilepsy research*; 27: 185-192 ;1994.
187. Schwartzkroin P.A and Knowles W.D. Intracellular of Human Cerebral Cortex Study of human epileptic cortex: In Vitro maintenance of Epileptiform activity?. *Science*; 223:709-12, 1984.
188. Schwartzkroin PA and Prince DA. Microphysiology of human cerebral cortex studied in vitro. *Brain Research*, 115:497-500, 1976.
189. Sloviter, R.S .Epileptic brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of perforant path. I. acute electrophysiological and light microscopic studies *Brain Research Bulletin*; 10: 675-97, 1983.
190. Sloviter, R.S.. Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. *Hippocampus*. 1, 31-40, 1991.
191. Sloviter, RS. Status Epilepticus.Induced Neuronal Injury and network Reorganization. *Epilepsia*; 1999. 40(suppl 1):S34.S39.

192. Shorvon, S.D. *Epidemiologia, Classificação, História Natural e Genética da Epilepsia*. The Lancet: Epilepsia, 120pp, 1990.
193. Silva, L.R. ; Amitai Y.; Connors, B.W. Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons—*Science* , 432:435; 1991.
194. Soltes I, Smatter DK, Mody I. Tonic inhibition originates from synapses close to the soma. *Neuron* 1995;14:1273-83.
195. Stringer JL and Lothman EW .Model of Spontaneous hippocampal epilepsy in the anesthetized rat electrographic and response patterns. *Epilepsy Research* . 4:177-186. 1989.
196. Swedberg MD, Jacobsen P, Honore T. Anticonvulsant, anxiolytic and discriminative effects of the AMPA antagonist 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline (NBQX). *J Pharmacol Exp Ther* 1995 Sep;274(3):1113-21
197. Tauck D and Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid treated rats. *Journal of Neuroscience* 5: 1016-22; 1985
198. Trainelis S.F. and Dingledine, R. Potassium induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *Journal Neurophysiology*, 59: 259-76. 1988.
199. Traub, R.D. Simulation of intrinsic bursting in CA3 hippocampal neurons. *Neuroscience* 7, 1233-42, 1982.
200. Traub RD, Borck C, Colling SB, Jefferys JG. On the structure of ictal events in vitro. : *Epilepsia* ;37(9):879-91 sep 1996
201. Traub RD, Jefferys JG, Miles R, Whittington MA, et al . Enhanced NMDA conductance can account for epileptiform activity induced by low Mg²⁺ in the rat hippocampal slice. *Journal Physiology.*, 478: 379-93, Aug 1 1994.

202. Trevisol, P.C et al .Epilepsia do Lobo temporal. *Jornal da liga Brasileira de Epilepsia*; 27-30; 1992.
203. Solis JM, Nicoll RA (1992) Pharmacological characterization of GABA B-mediated responses in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 12: 3466-3472.
204. Taylor CP, Dudek FE (1984) Ecitation of hippocampal pyramidal cells by an electrical field effect. *J. Europhysiol* 52: 126-142.
205. Urban, L., Aitken, P.G., Friedman, A. and Somjen, G.G. An NMDA-mediated component of excitatory synaptic input to dentate granule cells in 'epileptic' human hippocampus studied in vitro. *Brain Research*. 515, 319-22. (1990).
206. Valerio, R.M.F;Yacubian ; E.M.T; Rosemberg,S; et al. Anatomia patológica em 33 pacientes cim Epilepsia do Lobo Temporal. *Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*; 1(2):67-74; 1995.
207. Watts A E , Whittington M A and Jeffreys J G. Epileptic focus induced in rat by intrahippocampal cholera toxin: neuronal properties in Vitro. *Neuroscience*: 55: 45-56, 1993.
208. Waxhan M N. Neurotransmitter Receptors. Edited by Zigmond J M, Bloon F E, Landis S C, Roberts J L and Squire L R. *Fundamental Neuroscience* . Academic press. Cap. 7, 1999 p. 155-192..
209. Westbrook GL Glutamate receptor update. *Current Opinion in Neurobiology*. 1994 Jun;4(3):337-46. Review, 1994.
210. Williams S., Vachon, P and Lacaille J.C. Monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic potentials in CA1 pyramidal cells of hyperexcitable hippocampal slices from kainic acid-treated rats. *Neuroscience* 52: 541-54, 1993.

211. Willianson A and Alger B E . Characterization of na early afterhiperpolarization after a brief train of action potential in rat hippocampal neurons in vitro. *Journal Neurophysiology*, 63: 72-81, 1990.
212. Wyler A R, Fetz E E and Ward AA Jr. Firing Patterns of epileptic and normal normal neurons in the chronic alumina focus in undrugged monkeys during different behavioral states. *Brain research*, 98:1-20, 1975.
213. Wong R K and Stewart M. Different firing patterns generated in dendrites and somata of CA1 pyramidal guinea-pig hippocampus. *Journal Physiology (London)*, 457:675-87, 1992.
214. Wong R K and Prince D A . Participoacion of Calcium Spikes during intrinsic Burst firing in hippocampal neurons. *Brain research*, 159:385-90, 1978
215. Wong RKS and Prince DA. Afterpotential Generation in Hippocampal Pyramidal Cells. *Journal Neuro physiology*, 40(1):86-97,1981.
216. Wong, R.K. and Traub, R.D. Synchronized burst discharge in disinhibited hippocampal slice. I. Initiation in CA2-CA3 region. *J Neurophysiol* 49, 442-458. 1983.
217. Wyler AR; Fetz EE and Ward AA Jr. Firing patterns of epileptic and normal neurons in the chronic alumina focus in undrugged monkeys during diferent behavioral states. *Brain Res.*, 98:1-20, 1975.
218. Yamada N and Bikey DK, Kindling-Induced persistent alterations in the membrane and synaptic properties of CA1 pyramidal neurons. *Brain Research*,561:324-31.1991;
219. Zhao D and Leung LS. Partial hippocampal Kindling increase paired pulse facilitation and burst frequence in hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience Letters*.154:2816-25. 1993

10. ANEXO 1

⇒ GRUPOS DE RATOS NORMAIS:

Tabela de valores totais: PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA

- Tabela 1- Potencial de Membrana (PM)

	PMMA (n:40)	PMMD(n:24)	PMMP(n:20)
	-69,93	--	--
	-71	--	--
	-51	--	--
	-71	--	--
	-73	--	--
	-69	--	--
	-72	-70	--
	-68	--	--
	-69,93	-76	-89
	-71	-89	-100
	-51	-67	-74
	-71	-57	-61
	-73	-63	-60
	-69	-78	-90
	-69	-55,33	-67
	-70,04	-72	--
	-69,5	-75	--
	-73,87	-76,6	-60
	-57	--	--
	-50	--	--
	-53	-66,43	--
	-66,4	--	--
	-65	-59	-52
	-84,04	--	--
	-57	--	--
	-69,93	-76	-89
	-71	-89	-100
	-51	-67	-74
	-71	-57	-61
	-73	-63	-60
	-69	-78	-90
	-69	-55,33	-67
	-70,04	--	--
	-69,5	-75	-85,23
	-70,04	-74	-80
	-69,5	-75	-85,23
	-69,87	-73,6	-60
	-71	--	--
	-73	--	--
	-69	--	--
Média:	-67,524	-70,303	-75,225
Desvio Padrão:	±7,46	9,531	15,003

- Tabela 2- Resistência de Entrada (RE):

	REMA (n=40)	REMD (n=24)	REMP (n=20)
	41,3	--	--
	48,73	--	--
	39,13	--	--
	41,3	--	--
	48,73	--	--
	43,7	--	--
	29,3	33,02	--
	45,9	--	--
	41,3	56	69,7
	48,73	73,34	101
	39,13	54,03	78,24
	41,3	36,89	23,12
	48,73	67	45,76
	43,7	32,23	27,08
	29,3	38,06	56,42
	48	32,22	--
	42,96	54,32	--
	44,5	67,8	56,32
	39,57	--	--
	41,58	--	--
	70,87	86,08	--
	35	--	--
	37,64	22,2	31,07
	25,95	--	--
	73,661	--	--
	41,3	56	69,7
	48,73	73,34	101
	39,13	54,03	78,24
	41,3	36,89	23,12
	48,73	67	45,76
	43,7	32,23	27,08
	29,3	38,06	56,42
	48	--	--
	42,96	54,32	62,36
	48	32,22	43,21
	42,96	54,32	62,36
	44,5	67,8	56,32
	41,3	--	--
	48,73	--	--
	43,7	--	--
Média	43.558	50.808	55.714
Desvio Padrão:	8,842	17,069	23,310

• Tabela3- Constante de tempo

	CTMA (n=40)	CTMD (n= 24)	CTMP (n=20)
	4,17	--	--
	13,5	--	--
	10,38	--	--
	4,73	--	--
	13,43	--	--
	10,35	--	--
	11,26	12,07	--
	6,03	--	--
	4,17	2,85	13,4
	13,5	-9,56	5
	10,38	8,96	3,89
	8,32	7,12	12,34
	13,43	8,25	11,53
	10,35	9,54	11,26
	11,26	9,5	12,32
	10,35	13	--
	13,72	12,2	--
	6,1	8	3,89
	5,68	--	--
	2,92	--	--
	3,15	5,53	--
	10,63	--	--
	6,23	3,32	11,53
	8,17	--	--
	16,7	--	--
	4,17	2,85	13,4
	13,5	9,56	12,26
	10,38	8,96	6,12
	4,173	3,6	4,34
	13,43	8,25	12,3
	10,35	12,089	11,34
	11,26	9,5	12,06
	10,35	--	--
	13,72	12	14,34
	10,35	13	11,28
	13,72	12,2	11,53
	6,1	8	3,89
	4,22	--	--
	13,43	--	--
	10,35	--	--
Média:	9,460	7,949	10,85
Desvio Padrão:	3,736	4,913	3,593

Tabela de valores totais: PROPRIEDADES DO DISPARO

- :Tabela4 – Corrente Injetada para o 1° PA:

	CIPAA (n=40)	CIPAD (n=24)	CIPAP(n=20)
	0,1	--	--
	0,3	--	--
	0,1	--	--
	0,6	--	--
	0,4	--	--
	0,1	--	--
	0,8	0,5	--
	0,2	--	--
	0,1	0	0,3
	0,3	0,3	0,4
	0,9	0,4	0,6
	0,3	0,1	0,5
	0,3	0,3	0,7
	0,3	-0,5	0,2
	0,1	-0,7	0,3
	0,1	0	--
	0,1	0	--
	0,6	0,3	0,4
	0,2	--	--
	0,2	--	--
	1	0,6	--
	0,5	--	--
	0,8	0,7	1
	0,7	--	--
	0,5	--	--
	0,1	0	0,3
	0,3	0,3	0,4
	1	0,4	0,6
	0,3	0,1	0,5
	0,3	0,3	0,7
	0,3	-0,5	0,2
	0,1	-0,7	0,3
	0,1	--	--
	0,1	0	0,3
	0,1	0	0,4
	0,1	0	0,3
	0,6	0,3	0,4
	0,6	--	--
	0,4	--	--
	0,1	--	--
Média:	0,352	0,091	0,44
Desvio	0,247	0,376	0,19
Padrão:			

- Tabela5 – Limiar do Disparo:

	LAMA (n=40)	LAMD(n=24)	LAMP(n=20)
-60		--	--
-58		--	--
-40		--	--
-39		--	--
-58,17		--	--
-50,1		--	--
-57		-56	--
-57,7		--	--
-57,1		-60	-60
-58		-37	-50
-42		-56	-50
-40		-31	-39
-37		-54,6	43,2
-56		-62,1	-60
-31		-43	-34
-64,6		-56	
-64,6		-66	--
-43		-67	-57
-56		--	--
-66		--	--
-67		-61	
-55		--	--
-66		-62	-42
-61		--	--
-66		--	--
-62		-64,6	-56
-65		-43	-62
-34,6		-54,3	-64,6
-60,3		-42	-50
-43		-67	-43
-50		-55	-50
-58		-40	-66
-60		--	--
-55		-56	-60
-66		-60	-66
-43		-61	-61
-54		-56	-51,2
-62		--	--
-60		--	--
-54		--	--
Média	-54,429	-54,608	-49,319
Desvio padrão:	9,955	10,014	9,014

• Tabela 6 – Amplitude do PA

	AMA(n=40)	AMD(n=24)	AMP (n=20)
80	--	--	
82	--	--	
83	--	--	
81	--	--	
87,3	--	--	
60	--	--	
88	90	--	
85,2	--	--	
86,8	80	79	
78	85	80	
77	82	76	
79,5	80	80	
86	90	89	
91	100	100	
83	100	89	
78	79		
72,8	77		
80	80	83	
90	--	--	
90	--	--	
100	102		
79	--	--	
80	85	95	
89	--	--	
100	--	--	
89	89	94	
84	89	80	
84	84	84	
68	72	76	
65	70	65	
100	105	100	
89	84	91	
84	--	--	
77	84	85	
68	72	65	
65	70	75	
88	93	100	
89	--	--	
80	--	--	
84	--	--	
Média:	82,515	85,083	84,956
Desvio padrão:	9,039	9,912	10,882

- Tabela 7- Duração de PA

	DPMA (=40)	DPMD(n=24)	DPMP (n=20)
	5	--	--
	2	--	--
	2,5	--	--
	2,7	--	--
	2	--	--
	5	--	--
	2,9	3	--
	3	--	--
	2,3	2,3	3
	2	2	3
	3,4	3,3	2,9
	3,2	3	3,1
	3	3	3
	2	2	2
	3,0	3,1	3,1
	2,7	2,7	
	3	3	
	3	3	3
	2	--	--
	2,5	--	--
	2,7	3,1	
	2	--	--
	3	2	2
	2,8	--	--
	3	--	--
	2,3	3	3
	2	5	5
	3,3	2	2
	3,0	3,1	3,1
	2	2	2
	2	2	2
	3,2	3,1	3,1
	2,7	--	--
	3	3	3
	5	5	5
	2	2	2
	5	3	3
	2,7	--	--
	2	--	--
	5	--	--
Média:	2,89	2,862	2,917
Desvio Padrão:	0,916	0,814	0,797

- Tabela 8 - PPH::

	PPHMA (n=40)	PPHMD(n=24)	PPHMP(n=20)
	-60	--	--
	-59	--	--
	-44	--	--
	-41	--	--
	-59	--	--
	-50,1	--	--
	-58	-59	--
	-58,4	--	--
	-59	-61	-65
	-58	-62	-67
	-42	-56	-51
	-40	-31	-42
	-37	-55,6	-45
	-56	-62,6	-62
	-31	-43	-36,1
	-64,6	-56	--
	-64,6	-66	--
	-43	-54	-58
	-56	--	--
	-66	--	--
	-67	-61	--
	-55	--	--
	-66	-62	-42
	-61	--	--
	-66	--	--
	-62	-64,6	-56
	-65	-43	-62
	-64,6	-56	-64,6
	-64,6	-66	-50,3
	-43	-67	-43
	-56	-55	-53
	-60	-42	-66
	-67	--	--
	-55	-66	-60,5
	-66	-64,6	-66
	-61	-43	-61
	-66	-56	-52,1
	-62	--	--
	-65	--	--
	-54,6	--	--
Média	-56,837	-56,35	-55,44
Desvio Padrão:	9,541	9,495	9,173

⇒GRUPO DE HIPOCAMPOS DE RATOS EPILÉPTICOS

Tabela de valores totais: PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA

- Tabela 9- Potencial de Membrana (PM)

	PMMA (n=22)	PMMD(n=17)	PMMP(n=15)
	-55	--	--
	-68	--	--
	-72	-70	--
	-68	--	--
	-69.93	-76	--
	-71	-89	-100
	-61	-67	-74
	-71	-57	-61
	-73	-63	-60
	-69	-78	-90
	-69.93	-76	-89
	-71	-89	-100
	-75	-67	-78
	-71	-57	-61
	-73	-63	-60
	-69	-78	-90
	-69	--	--
	-70.04	--	--
	-69.5	-75	-85.23
	-70.04	-72	-80
	-69.5	-75	-85.23
	-69.87	-73.6	-60
Média	-69,309	-72,094	-78,23
Desvio Padrão:	4,129	9,248	14,761

- Tabela 10- Resistência de Entrada (RE):

	REMA (n=22)	REMD (n=17)	REMP (n=15)
	56	--	--
	67	--	--
	29.3	33.02	--
	45.9	--	--
	41.3	56	--
	48.73	73.34	101
	100.13	111.03	104.24
	41.3	36.89	23.12
	48.73	67	45.76
	43.7	32.23	27.08
	41.3	56	69.7
	48.73	73.34	101
	88.13	102.09	110.24
	41.3	36.89	23.12
	48.73	67	45.76
	43.7	32.23	27.08
	29.3	--	--
	48	--	--
	42.96	54.32	62.36
	48	32.22	43.21
	42.96	54.32	62.36
	44.5	67.8	56.32
Média	49,531	57,983	60,156
Desvio Padrão:	16,456	23,753	31,095

- Tabela 11 - Constante de Tempo (CT):

	CTMA (n=22)	CTMD (n= 17)	CTMP (n=15)
	8.43	--	--
	10.35	--	--
	11.26	12.07	--
	6.03	--	--
	4.17	2.85	--
	13.5	-9.56	5
	10.38	8.96	3.89
	9.212	10.35	12.34
	13.43	8.25	11.53
	10.35	9.32	13.32
	10.17	12.85	13.4
	13.5	9.56	13.003
	10.38	8.96	6.12
	4.173	3.6	4.34
	13.43	8.25	12.3
	10.35	12.089	11.34
	11.26	--	--
	10.35	--	--
	13.72	12	14.34
	10.35	13	11.28
	13.72	12.2	11.53
	6.1	8	3.89
Média	10,209	8,397	9,841
Desvio padrão	2,934	5,469	3,925

TABELA DE VALORES TOTAIS PROPRIEDADES DO DISPARO

- Tabela 12 - Corrente Injetada para o 1º disparo:

	CIPAA (n=22)	CIPAD (n= 17)	CIPAP (n=15)
	-0.7	--	--
	0.2	--	--
	0.1	0.5	--
	0.3	--	--
	0.9	0	--
	0.3	0.3	0.4
	0.1	-0.7	0.4
	0.3	0.1	0.5
	0.1	0.3	0.7
	0.3	-0.5	0.2
	1	0	0.3
	0.3	0.3	0.4
	-0.7	0	0.2
	0.3	0.1	0.5
	0.1	0.3	0.7
	0.1	-0.5	0.2
	0.1	--	--
	0.1	--	--
	0.1	0	0.3
	0.6	0	0.4
	-0.7	0	0.3
	0.1	0.3	0.4
Média	0,15	0,029	0,393
Desvio Padrão:	0,426	0,325	0,157

- Tabela 13 : Limiar do disparo

	LAMA(n=22)	LAMD (n=17)	LAMP (n=15)
	-54.35	--	--
	-43	--	--
	-56	-64.6	--
	-54	--	--
	-53	-56	--
	-55	-66	-61
	-53	-67	-41
	-61.2	-38	-50
	-64.4	-66	-31
	-43	-61	-63
	-56	-64.6	-58.6
	-66	-43	-60
	-60	-56	-56
	-61.4	-36	-36.2
	-59.2	-62	-27.8
	-53	-55	-55
	-56	--	--
	-66	--	--
	-60	-64.6	-62
	-55	-43	-56
	-66	-56	-65
	-59	-46	-25
Média:	-57,025	-55,576	-49,89
Desvio Padrão:	6,281	10,499	13,835

- Tabela 14- : Amplitude de PA

	AMA(n=22)	AMD (n=17)	AMP (n=15)
68		--	--
65		--	--
93		103	--
89		--	--
94		100	--
89		89	89
84		84	84
81		88	84
70		78	89
65		78	82
80		78	100
89		89	89
82		103	94
90		100	97
80		86	84
74		80	77
68		--	--
65		--	--
70		88	84
89		92	89
77		78	75
73		70	78
Média:	78.863	87.294	86.333
Desvio Padrão	9,852	9,86	7.138

- Tabela 15 : Duração do PA:

	DPMA (n=22)	DPMA (n=17)	DPMP (n=15)
	2.9	--	--
	3	--	--
	2.3	3.1	--
	2	--	--
	3.3	2	--
	3.1	3.1	3.1
	3	2.7	2.7
	2	3	3
	3.1	5	5
	2.7	2	2
	3	3.1	3.1
	5	2	2
	2	3.1	2
	2.5	2	3.1
	2.7	2	2.7
	2	3.1	3
	5	--	--
	2.9	--	--
	3	5	3.1
	2.3	2	2
	2	2	2
	3.3	3.1	3.1
Média:	2,868	2,841	2,793
Desvio Padrão	0,823	0,959	0,783

- Tabela 16: Potencial de Membrana ao final de PA (PPH):

	PPHMA (n=20)	PPHMD(n=16)	PPHMP (n=11)
	-56.2	--	--
	-45	--	--
	-56.3	-65.6	--
	-54.9	-45	--
	-53.7	-56.7	--
	54.3	-65	--
	-55	-67.3	-43
	-62	--	-51
	-64.6	67.1	-33
	-44	-63	-63.7
	-56.6	-64.9	-59.3
	-68	-45	-61
	-61	-56.6	-57
	-61.2	-38	--
	-59.8	-63	--
	--	-54	-56
	-57.2	--	--
	-67	--	--
	-60.3	-65.9	-63
	-56.4	--	-57
	-66.1	-57	-65.5
	--	-47.2	--
Média:	-53.18	-49.19	-55.409
Desvio Padrão	7,39	8.288	9.775

⇒GRUPO DE HIPOCAMPOS HUMANOS

Tabela de valores totais: PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA

- Tabela 17- Potencial de Membrana (PM)

	PMMA (n:30)	PMMD(n:20)	PMMP(n:16)
-90	--	--	
-90	--	--	
-68	--	--	
-70	--	--	
-59,5	--	--	
-67,5	--	--	
-70	--	--	
-80	-95	-110	
-82	-83	-86	
-77	-68	-53	
-67,7	-70	-77	
-68	-80	-63	
-56	-56	-58	
-72	-77	-71	
-65	-66	-63	
-70	--	--	
-70	-70,4	-71	
-65	-68	-63	
-67	--	--	
-58,5	-55	-59	
-60	-72	--	
-77	-68	-53	
-67,7	-70	-77	
-65	-66	-63	
-60	--	--	
-57,5	-70	--	
-57	-78	--	
-76	-56	--	
-61	-50	-65	
-62	-64,5	-68	
Média	-68,546	-69,145	-68,75
Desvio Padrão:	8,975	10,482	14,139

- Tabela 18- Resistência de Entrada (RE):

	REMA (n=30)	REMD (n=19)	REMP (n=15)
	78,45	--	--
	67,2	--	--
	41,78	--	--
	67,26	--	--
	37,44	--	--
	62,02	--	--
	64	--	--
	56,9	53,51	--
	101,19	107	110,2
	33,57	29,28	31,5
	28,63	30,47	37,63
	39,28	15,9	35,9
	56,42	22,5	22,5
	111,07	126	126
	59,2	58,51	60,59
	117,85	--	--
	28,51	16,51	25,59
	16,42	--	26,58
	45,78	--	--
	44,82	46	43,1
	40,82	45	--
	39,28	15,9	24,39
	56,42	22,5	22,5
	111,07	126	126
	31,71	--	--
	14,8	11,9	--
	12,5	16	--
	38,71	39,64	--
	28,8	30,6	32,06
	36,175	36,69	36,8
Média	52,269	44,784	48,865
Desvio Padrão:	28,244	36,08	38,334

- Tabela 19 - Constante de Tempo (CT):

	CTMA (n=30)	CTMD (n= 20)	CTMP (n=16)
	3,93	--	--
	5,8	--	--
	2,3	--	--
	2	--	--
	4,94	--	--
	5,94	--	--
	7,4	--	--
	9,24	11,3	8,34
	9,28	10,4	7,23
	12,25	14,37	9,17
	2,71	8,73	27,84
	2,18	6,45	7,3
	7,36	8,36	6,89
	2,85	7,3	6,45
	7,53	5,75	7,35
	8	--	--
	9,31	16,6	18,96
	18,73	20,43	21,9
	10	--	--
	13,05	14,37	9,17
	11,125	14,37	--
	7,16	8,36	6,89
	2,85	7,3	6,45
	7,53	5,75	7,35
	3,21	--	--
	3,11	3,1	--
	3,44	4,92	--
	16,5	5,41	--
	10,34	12,34	11,26
	15,27	13,21	12,27
Média	7,528	9,941	10,92
Desvio padrão	4,509	4,542	6,38

Tabela de valores totais PROPRIEDADES DO DISPARO

- Tabela 20 - Corrente Injetada para o 1º disparo:

	CIPAA (n=30)	CIPAD (n= 20)	CIPAP (n=30)
	0,4		
	0,7		
	0,4		
	0,8		
	0,3		
	0,3		
	0,3		
	0,1	0,4	0,5
	0,1	0,4	0,3
	0,3	0,1	0,1
	0,2	-0,7	0,3
	0,4	-0,6	0,3
	0,2	-0,7	0,2
	0,8	1,2	1,2
	0,5	0,4	0,5
	0,4		
	-0,7	-0,7	0
	0	-0,7	0,4
	-0,7		
	-0,7	0,2	0,5
	0,8	0,4	
	0,2	0,3	0,5
	0,3	0,2	0,4
	0	0,1	0,3
	-0,7		
	0,5	1,5	
	-0,7	1,8	
	0,4	0,1	
	0,2	0,1	0,3
	0,2	0,2	0,2
Média	0,176	0,2	0,375
Desvio Padrão:	0,45	0,701	0,264

- Tabela 21 : Limiar do disparo

	LAMA(n=30)	LAMD (n=20)	LAMP (n=16)
	-74	---	--
	-74	--	--
	-54,9	--	--
	-44,9	--	--
	-50,07	--	--
	-56	--	--
	-45	--	--
	-66	-72	-62,2
	-60	-50	-54
	-55	-58	-56
	-63,9	-61	-58
	-60	-65	-56
	-48	-46	-47
	-56	-48,6	-46
	-57,22	-58	-54
	-40	--	--
	-63	-59,95	-62
	-51	-56	-58
	-53	--	--
	-48,2	-40	-45
	-52	-48	--
	-61,04	-46	-40
	-52	-57	-59
	-53	-56	-54
	-54	-58	--
	-40	--	--
	-55	-57	--
	-56,9	-42,05	--
	-48,4	-43	-47
	-60	-56,9	-58
Média:	-55,084	-54,236	-53,512
Desvio Padrão:	8,233	8,312	6,569

- Tabela 22 : Amplitude de PA

	AMA(n=30)	AMD (n=20)	AMP (n=16)
	61	---	--
	101	--	--
	56	--	--
	60	--	--
	67	--	--
	65	--	--
	69	--	--
	60	68	73
	79	69	70
	75,04	80	76
	73	84	72
	71	65	60
	60	66,2	63
	70	76	74
	78	76	73
	70	--	--
	74	70	71
	60	67	64
	66	--	--
	64	66	59
	61	68	--
	57	65	60
	60	61	60
	60	61	60
	64	--	--
	60	--	--
	61	65,4	--
	74	--	--
	61	61	63
	70,05	72	73
Média:	66,906	68,976	66,533
Desvio Padrão	9,092	6,674	6,266

- Tabela 23 : Duração do PA:

	DPMA (n=30)	DPMA (n=20)	DPMP (n=16)
	4	---	---
	4	--	--
	4,2	--	--
	4	--	--
	4	--	--
	4	--	--
	3	--	--
	5	3	2,5
	2	3	3
	2	3	3
	5	2	2
	4	6	3
	5	4	4
	4	5	3
	3	4	4
	4	--	--
	3	3	3
	4	4	4
	3	--	--
	4	2	2
	5	3	--
	4	6	3
	5	4	4
	4	5	3
	3	--	--
	15	--	--
	6	3,5	--
	3	--	--
	3	3	3
	3	4	3
Média:	4,206	3,794	3,133
Desvio Padrão	2,234	1,186	0,63

- Tabela 24: Potencial de Membrana ao final de PA (PPH):

	PPHMA (n=22)	PPHMD(n=13)	PPHMP (n=10)
	-84	--	--
	-79,4	--	--
	-57,94	--	--
	--	--	--
	--	--	--
	--	--	--
	-69,9	--	--
	--	--	--
	--	--	--
	-70,94	-69,9	-65
	-67,4	-63	-65,32
	-69,4	-77,34	-69
	-58,4	-59,13	-59,4
	-61,9	-62	-64
	-60,2	--	--
	-61	--	--
	-67	-65,9	-64
	-64,5	-62	-61
	--	--	--
	-60	--	--
	--	--	--
	-63	-49,2	--
	-52	-57	-69
	--	--	--
	-63	--	--
	-57,4	--	--
	-55	-59,22	--
	-57,09	-42,06	--
	-49	-69,8	-49
	-63	-58,22	-60
Média:	-63,248	-61,136	-62,572
Desvio Padrão	8,205	9,045	5,08

10. ANEXO 2: ÍNDICE COMPLETO

1. INTRODUÇÃO	1
1. Epilepsia	2
1.1 Conceito Geral	2
1.2 Classificação	4
2. Epilepsia do Lobo Temporal (ELT)	9
2.1 Lobo Temporal, Formação Hipocampal	9
2.2 Patologia Hipocampal na ELT	16
2.3 Bases Celulares na ELT e Geração da Atividade Epileptiforme	19
2.3.1 Receptores Glutamatérgicos	19
2.3.2 Receptores Gabaérgicos	21
2.3.3 Descarga Interictal e Ictal:	22
2.3.3.1 Definição de Descarga interictal e ictal	23
2.3.3.2 Extinção da Descarga Interictal	27
3. O Uso de Fatias Cerebrais (“Brain Slice”) no estudo da ELT	27
3.1 Modelo de Indução Da Atividade Epileptiforme pela ausência do íon Magnésio no meio de perfusão.	29
4. Geração da Atividade Epileptiforme	30
4.1 Alteração das Propriedades Intrínsecas do Neurônio:	29
“O Neurônio Epiléptico”	30
4.1.2 Aumento do Número de Neurônios que Disparam Descargas em Salva	31
4.1.2.1 Classificação	31
4.1.2.2 Gênese da DS Neuronal Intrínseca	32
4.1.2.3 Classificação do Disparo Neuronal	35
4.2 Agregado Neuronal	38
4.2.1 Hiperfunção dos Receptores Glutamatérgicos	38
4.2.1.1 Alteração Funcional	39
4.2.2 Defeito dos Mecanismos Inibitórios Mediados pelo GABA	39
4.2.2.1 Hipótese das Células Dormentes	40
4.2.2.2 Circuitos Recorrentes: “Brotamento”	47
4.2.3 Hipótese da Sensibilidade dos receptores GABA ao Zinco Associado ao brotamento (“Sprouting”) das Fibras Musgosas	49

4.2.4	Interação dos mecanismos sinápticos e não sinápticos	53
5.	MODELOS DE EPILEPSIA EM ANIMAIS	57
5.1	MODELO DE EPILEPSIA CRÔNICA INDUZIDA PELA PILOCARPINA:	60
6.	CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA DESTE TRABALHO	61
2.	OBJETIVOS	62
2.1	Geral	63
2.2	Específicos	63
3.	MATERIAL & MÉTODOS	64
1.	Grupos de Estudo	65
1.1	Modelo de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina	66
1.2	Ratos Normais	69
1.3	Grupo de Hipocampos Humanos	70
2.	Ética	71
3.	Técnica de Fatiamento Cerebral (“Brain Slice”)	72
3.1	Equipamentos Utilizados Para a Técnica de Fatias Cerebrais	73
3.2	Técnica do Fatiamento Cerebral: Ratos	73
3.3	Obtenção das Fatias de Hipocampo Humano	80
4.	Registros Eletrofisiológicos	82
4.1	Equipamentos Utilizados	82
4.2	Meio de Perfusão e Modelos Indutor da Atividade Epileptiforme IN VITRO	82
4.3	Microeletrodos Para Registros Eletrofisiológicos	86
4.4	Metodologia Usada Para os Registros Intracelulares (IC)	87

4.5	Protocolo de Estimulação Elétrica	89
4.6	Parâmetros Eletrofisiológicas Analisados:	90
	A. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA:	90
	B. PROPRIEDADES DO DISPARO	
	C. PADRÃO DE RESPOSTAS NEURONAIS	96
4.7	Registros Extracelulares EEG	100
5.	Análise Estatística	101
4.	RESULTADOS	102
1.	ANÁLISE DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DAS CÉLULAS PIRAMIDAIIS DE CA1 POR GRUPO: ANTES DURANTE E DEPOIS DA PERFUSÃO COM O RINGER LIVRE DE Mg²⁺	104
1.1.	PROPRIEDADES PASSIVAS DA MEMBRANA E PROPRIEDADES DO DISPARO	104
•	RESPOSTA AO RINGER 0-Mg ²⁺ : GRUPO DE RATOS NORMAIS	105
I.	PROPRIEDADES PASSIVAS DA MP	105
✓	Potencial de Membrana (PM)	105
✓	Resistência de Entrada (RE)	107
✓	Constante de Tempo(CT)	109
II.	PROPRIEDADES DO DISPARO	113
✓	Corrente Injetada para o primeiro Potencial de Aço	113
✓	Limiar de Disparo	114
✓	Amplitude do PA	115
✓	Duração do PA	117
✓	Potencial de Membrana ao final de PA, valor máximo do pós-potencial de hiperpolarização rápida (PPH)	118
•	RESPOSTA AO RINGER 0-Mg ²⁺ : GRUPO DE RATOS EPILÉPTICOS	122
I.	PROPRIEDADES PASSIVAS DA MP	122

✓	Potencial de Membrana (PM)	122
✓	Resistência de Entrada (RE)	124
✓	Constante de Tempo(CT)	125
II. PROPRIEDADES DO DISPARO		127
✓	Corrente Injetada para o primeiro Potencial de Aço	127
✓	Limiar de Disparo	129
✓	Amplitude do PA	130
✓	Duração do PA	131
✓	Potencial de Membrana ao final de PA, valor máximo do pós-potencial de hiperpolarização rápida (PPH)	133
•	RESPOSTA AO RINGER 0-Mg²⁺: GRUPO DE TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO	134
I. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MP		135
✓	Potencial de Membrana (PM)	135
✓	Resistência de Entrada (RE)	136
✓	Constante de Tempo(CT)	137
II. PROPRIEDADES DO DISPARO		139
✓	Corrente Injetada para o primeiro Potencial de Aço	139
✓	Limiar de Disparo	140
✓	Amplitude do PA	142
✓	Duração do PA	143
✓	Potencial de Membrana ao final de PA, valor máximo do pós-potencial de hiperpolarização rápida (PPH)	144
2. ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DAS NEURÔNIOS PIRAMIDAIIS DE CA1 ENTRE OS GRUPOS EM DIFERENTES MOMENTOS DO		147

TRATAMENTO COM O RINGER LIVRE DE Mg^{+2} .

* HIPOCAMPOS DE RATOS NORMAIS X HIPOCAMPOS DE RATOS EPILEPTICOS:	148
I. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MP	148
✓ Potencial de Membrana (PM)	148
✓ Resistência de Entrada (RE)	150
✓ Constante de Tempo(CT)	151
II. PROPRIEDADES DO DISPARO	152
✓ Corrente Injetada para o primeiro Potencial de Ação	152
✓ Limiar de Disparo	154
✓ Amplitude do PA	155
✓ Duração do PA	156
✓ Potencial de Membrana ao final de PA, valor máximo do pós-potencial de hiperpolarização rápida (PPH)	157
* HIPOCAMPOS DE RATOS NORMAIS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO	162
I. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MP	162
✓ Potencial de Membrana (PM)	162
✓ Resistência de Entrada (RE)	164
✓ Constante de Tempo(CT)	165
II. PROPRIEDADES DO DISPARO	166
✓ Corrente Injetada para o primeiro Potencial de Ação	166
✓ Limiar de Disparo	167
✓ Amplitude do PA	168
✓ Duração do PA	169
✓ Potencial de Membrana ao final de PA, valor máximo do pós-potencial de	171

hiperpolarização rápida (PPH)

* HIPOCAMPOS DE RATOS EPILEPTICOS X TECIDO HIPOCAMPAL	176
HUMANO	
I. PROPRIEDADES PASSIVAS DA MP	176
✓ Potencial de Membrana (PM)	176
✓ Resistência de Entrada (RE)	177
✓ Constante de Tempo(CT)	179
II. PROPRIEDADES DO DISPARO	180
✓ Corrente Injetada para o primeiro Potencial de Ação	180
✓ Limiar de Disparo	181
✓ Amplitude do PA	182
✓ Duração do PA	183
✓ Potencial de Membrana ao final de PA, valor máximo do pós-potencial de hiperpolarização rápida (PPH)	184
3. CLASSIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS DE ACORDO COM OS PADRÕES DE RESPOSTA NEURONAL:	188
• PADRÕES OBSERVADOS	190
A. SEM DESCARGAS EM SALVA:	191
NEURÔNIO: CSDS-RS	191
✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO A	
✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO B	
✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO C	
✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO D	
✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO E	
✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO F	
✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO G	

- ✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO H
- ✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO I
- ✓ NEURÔNIO: CSDS-RS TIPO J

NEURÔNIO: CSDS-FS

B. COM DESCARGAS EM SALVA:

NEURÔNIO DO TIPO: CDSBL-DS TIPO I

NEURÔNIO DO TIPO: CDSAL-DS TIPO IIa

NEURÔNIO DO TIPO: CDSAL-DS TIPO IIb

NEURÔNIO DO TIPO: CDSAL-DS TIPO IIc

NEURÔNIO DO TIPO: CDSAL-DS TIPO II d

NEURÔNIO DO TIPO: CDSAL-DS TIPO III

NEURÔNIO DO TIPO: CDSAL-DS TIPO I

• PADROES OBSERVADOS EM RATOS NORMAIS:	204
• PADROES OBSERVADOS EM RATOS EPILÉPTICOS:	205
• PADROES OBSERVADOS EM TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO	207
• TABELA 13 PADRÕES DE RESPOSTAS NEURONAIAS:	209
4. ANÁLISE DAS CRISES ESPONTÂNEAS NOS NEURÔNIOS DE CA1 INDUZIDA PELA PASSAGEM DO RINGER LIVRE DE Mg²⁺:	210
A. CRISES ESPONTÂNEAS EM RATOS NORMAIS	210
B. CRISES ESPONTÂNEAS EM RATOS EPILÉPTICOS	216
C. CRISES ESPONTÂNEAS EM TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:	221
5. DISCUSSÃO:	228
* PROPRIEDADES INTRINSECAS NEURONAIAS:	230
1. RATOS NORMAIS:	230
2. RATOS EPILÉPTICOS:	232

3. TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:	234
* ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RATOS NORMAIS X RATOS EPILEPTICOS:	235
* ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RATOS NORMAIS X TECIDO HIPOCAMPAL HUMANO:	236
* ATIVIDADES ESPONTÂNEAS OBSERVADAS DURANTE A PERFUSÃO COM O RINGER 0-Mg ²⁺ NOS GRUPOS DE ESTUDO:	238
* INDUÇÃO DA ATIVIDADE EPILEPTIFORME PELO MODELO DO 0- Mg ²⁺ E RECEPTORES NMDA	239
* APARECIMENTO DE DESCARGAS EM SALVA:	240
* APARECIMENTO DE DESCARGAS INTERICTAIS.	243
* PADRÕES DE RESPOSTAS QUANTO A ACOMODAÇÃO NEURONAL	245
* HIPOTESE DO NEURÔNIO EPILEPTICO X AGREGADO NEURONAL	249
* NOSSOS ACHADOS E A TEORIA DO NEURÔNIO EPILEPTICO	249
* NOSSOS ACHADOS E A TEORIA DO AGREGADO NEURONAL	251
• HIPERFUNÇÃO DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS:	251
6. CONCLUSÕES	252
7. RESUMO	254
8. ABSTRACT	257
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	260
10. ANEXO 1 (TABELAS)	I
ANEXO 2 (ÍNDICE COMPLETO)	XXVI