

Elenn Soares Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL
PROFUNDA NO NÚCLEO ANTERIOR DO TÁLAMO SOBRE A
APRENDIZAGEM ESPACIAL EM RATOS EPILEPTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina – para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2016

Elenn Soares Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL
PROFUNDA NO NÚCLEO ANTERIOR DO TÁLAMO SOBRE A
APRENDIZAGEM ESPACIAL EM RATOS EPILEPTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina – para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientadora:

Profa. Dra. Luciene Covolan

Co-orientadora:

Dra. Jackeline Moraes Malheiros

São Paulo

2016

Ferreira, Elenn Soares

Avaliação dos efeitos da estimulação cerebral profunda no núcleo anterior do tálamo sobre a aprendizagem espacial em ratos epiléticos. / Elenn Soares Ferreira. - São Paulo, 2016.
xiv, 49 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.
Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em
Neurologia e Neurociências.

Título em inglês: Effects of anterior nucleus of the thalamus deep
brain stimulation on spatial learning in epileptic rats

1. Epilepsia. 2. Estimulação Encefálica Profunda.
3. Memória Espacial. 4. Giro Denteado.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA E
NEUROCIÊNCIAS

Chefe do Departamento: Eliane Beraldi Ribeiro

Coordenador do Programa de Pós-Graduação: Célia Harumi Tengan

Elenn Soares Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL
PROFUNDA NO NÚCLEO ANTERIOR DO TÁLAMO SOBRE A
APRENDIZAGEM ESPACIAL EM RATOS EPILEPTICOS**

PRESIDENTE DA BANCA

Profa. Dra. Luciene Covolan

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Andre Schwambach Vieira

Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Prof. Dr. Clement Hamani

Profa. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros

Dedico aos meus pais, que tanto
me auxiliaram neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À família e aos amigos Alexandre Lopez, Andressa Munis, Azael Neto, Carolina Muniz e Catarina Bueno por acreditarem em mim e pelo apoio nos momentos mais difíceis. Foi uma longa caminhada e sei que, sem vocês, não seria possível.

À Luciene Covolan pela oportunidade e pela confiança. Foram dois anos de muito aprendizado. Agora se fecha mais um ciclo em minha vida e agradeço por você ter feito parte da construção dele.

Às alunas da Luciene Covolan (Beatriz Amorim, Cristiane Amaral, Christiane Gimenes, Jackeline Malheiros e Laís Vieira) pela paciência durante o meu treinamento e ao longo dos experimentos e pela ajuda na realização e na conclusão de um trabalho tão legal.

Ao suporte técnico do laboratório que contribuiu para o andamento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL E A CIRCUITARIA DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL	3
1.2.1 Perda neuronal e a consequente reorganização axonal	7
1.3 MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL INDUZIDO PELA PILOCARPINA	9
1.4 ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA	11
1.4.1 O papel do núcleo anterior do tálamo na memória	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	17
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	17
3.3 CIRURGIA PARA O IMPLANTE DOS ELETRODOS	20
3.4 MODELO DE INDUÇÃO DO ESTADO DE MAL EPILÉPTICO E CRISES EPILÉPTICAS PELA INJEÇÃO DE PILOCARPINA	21
3.5 ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA	22
3.6 VIDEOMONITORAMENTO DE CRISES COMPORTAMENTAIS	23
3.7 TAREFA COMPORTAMENTAL	23
3.7.1 Labirinto aquático de Morris	23
3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA	25
3.8.1 Coloração de Nissl (Cresil violeta)	25
3.8.2 Coloração de neo-Timm	26
4 RESULTADOS	28

4.1	LATÊNCIA PARA O <i>STATUS EPILEPTICUS</i>	28
4.2	ANÁLISE DO VIDEOMONITORAMENTO DIÁRIO	28
4.2.1	Latência para a primeira crise espontânea	28
4.2.2	Número de crises espontâneas recorrentes.....	29
4.3	DESEMPENHO DE RATOS CONTROLES E/OU EPILÉPTICOS NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	30
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA CONTAGEM CELULAR E DA REORGANIZAÇÃO SINÁPTICA.....	32
4.4.1	Nissl.....	32
4.4.2	neo-Timm	34
5	DISCUSSÃO	35
5.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	39
6	CONCLUSÕES	41
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Diagrama da estrutura da formação hipocampal e da região parahipocampal de roedores.** À esquerda, uma representação da secção horizontal do hemisfério direito do cérebro de um rato onde se observa os diferentes setores do hipocampo (setores CA1, CA2 e CA3), o giro denteado, o complexo subicular e o córtex entorrinal. À direita, a representação da vista hemi-sagital do hemisfério direito. DG: giro denteado; MEC: córtex entorrinal medial; LEC: córtex entorrinal lateral; PrS: pré-subículo; PaS: para-subículo (Adaptado de Moser *et al.*, 2014)..... 5
- Figura 2: Circuitaria neural no hipocampo de roedores.** A. Ilustração da via tri-sináptica. B. Diagrama da rede neural no hipocampo. A via tri-sináptica está representada pela setas cheias. A camada II do córtex entorrinal emite projeções ao giro denteado através da via perfurante, o que inclui a via perfurante lateral e medial. O giro denteado projeta à região CA3 do hipocampo através das vias musgosas. Por sua vez, os neurônios de CA3 se projetam aos de CA1 através das vias colaterais de Schaffer. A região CA1 do hipocampo emite projeções de volta à camada mais profunda do córtex entorrinal. A camada molecular do CA3 também recebe projeções diretas da camada II do córtex entorrinal através da via perfurante. CA1 recebe projeções diretas da camada III do córtex entorrinal através da via temporoamônica. A células granulares do giro denteado também se projetam às células musgosas do hilo e aos interneurônios hilares, os quais mandam projeções excitatórias e inibitórias, respectivamente, de volta às células granulares do giro denteado. EC: córtex entorrinal; PP: via perfurante; TA: via temporoamônica; PPL: via perfurante lateral; PPM: via perfurante medial (Deng *et al.*, 2010). 6
- Figura 3: Brotamento de fibras musgosas no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina.** Terminais contendo zinco, característica das fibras musgosas no giro denteado e da região CA3 do hipocampo (A1) após coloração histológica de neo-Timm. Em A2, em detalhe, observa-se a camada densa e escura que identifica os terminais sinápticos das fibras musgosas sobre os dendritos proximais das células granulares. Em B, uma célula granular marcada com biocitina mostrando os dendritos apicais, colaterais axônicos no hilo. Um dos axônios (seta) em direção recorrente (brotamento de fibras musgosas) se projeta de volta à camada molecular através da camada granular. m: camada molecular interna; g: camada granular; h: hilo (Buckmaster, 2012). 8
- Figura 4: Organização geral dos núcleos talâmicos.** Os núcleos talâmicos são divididos em laterais, mediais e anteriores. Os núcleos anteriores são divididos, por sua vez, em anteroventral, anteromedial e anterodorsal (não representados nesta figura) (Adaptado de SlidePlayer)..... 13
- Figura 5: Desenho experimental 1.** O SE foi induzido ela injeção intraperitoneal de pilocarpina. A ECP foi iniciada simultaneamente ao início do SE e mantida por 6h (grupo EpiDBSa). Animais sem eletrodos também foram submetidos ao SE

(Grupo Epi). Ambos grupos foram filmados por 60 dias para o registro da primeira crise espontânea e da frequência de CER. SE: *status epilepticus*; ECP: estimulação cerebral profunda; CER: crises espontâneas recorrentes..... 18

Figura 6: Desenho experimental 2. O SE foi induzido pela injeção de pilocarpina. A ECP foi iniciada simultaneamente ao início do SE e mantida por 20 dias de forma intermitente, ou seja, 6 horas/dia. O vídeo-monitoramento foi realizado 24h/dia para avaliação da latência para a primeira crise espontânea e a frequência de CER. SE: *status epilepticus*; ECP: estimulação cerebral profunda; CER: crises espontâneas recorrentes..... 19

Figura 7: Desenho experimental 3 e 4. Tarefa comportamental e histologia. Quatro meses após o SE, os animais foram submetidos ao labirinto aquático de Morris durante 6 dias. Após o término da tarefa, todos animais foram perfundidos e o tecido cerebral utilizado em análises histológicas. 19

Figura 8: Esquema representativo do local de implante dos eletrodos no núcleo anterior do tálamo de ratos. Em A, a visão superior do crânio de um rato com pontos demonstrando o posicionamento dos eletrodos. Os pontos vermelhos representam os eletrodos de estimulação (polo positivo); os verdes, de referência ou inativos (polo negativo). Em B, um corte coronal do cérebro de um rato mostrando, através dos pontos vermelhos, a localização do núcleo anterior do tálamo (Adaptado de Paxinos e Watson, 1998). 21

Figura 9: Representação gráfica do labirinto aquático de Morris. Uma piscina foi preenchida com água levemente acima do nível da plataforma. As paredes do local contém pistas visuais que auxiliam o animal na procura da plataforma transparente submersa. Quatro pontos de inserção pré-determinados (N, S, L, O) são utilizados durante os baterias para desafiar a memória do animal (Adaptado de Academic). 24

Figura 10: Latência para o *status epilepticus*. Os animais com eletrodos (n=23) apresentam maior latência para o início do SE que os animais sem eletrodos (n=11). Dados expressos como media mais ou menos SE. * $p < 0,05$, 28

Figura 11: Latência para a primeira crise espontânea. Ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p=0,46$). Grupos Epi: epiléptico controle (n=10), EpiDBSa: epiléptico com ECP aguda de 6h (n=11), EpiDBSi: epiléptico com ECP intermitente de 6h/dia (n=12). 29

Figura 12: Frequência de crises espontâneas recorrentes. Representação gráfica da distribuição semanal das crises comportamentais entre os grupos estudados. Não há diferença estatisticamente significaste entre os grupos Epi (n=10), EpiDBSa (n=11) e EpiDBSi (n=12; $p=0,10$). Observa-se uma alteração no padrão de distribuição das crises comportamentais, sendo que há uma tendência ao aumento das crises ao redor da sétima e oitava semanas nos grupos EpiDBSa e EpiDBSi. Cada símbolo representa um animal avaliado..... 30

Figura 13: Desempenho na fase de aquisição e retenção. As representações gráficas em A (latência), B (distância) e C (velocidade) indicam o desempenho dos animais durante os cinco dias de aquisição; a representação em D, o desempenho de retenção. Em A, o diagrama demonstra que todos os animais

aprenderam a tarefa, apesar do grupo Controle ter apresentado uma latência menor que os grupos experimentais. Em B, observa-se a que os grupos Epi, EpiDBSa e EpiDBSi percorrem uma distância maior para cumprir a tarefa, embora o grupo EpiDBSa tenha conseguido reduzir a distância entre o primeiro e o quinto dia da fase de treinamento. Em C, o diagrama demonstra que a velocidade média estabelecida até encontrar a plataforma submersa aumentou progressivamente entre o primeiro e o quinto dia nos grupos experimentais enquanto esta se manteve constante no grupo Controle. Em D, todos os animais permaneceram tempos semelhantes no quadrante alvo (pelo menos, 29%), com exceção do grupo Epi que permaneceu apenas 24% do tempo no quadrante alvo. Grupos Epi (vermelho; n=8); EpiDBSa (verde; n=9); EpiDBSi (roxo; n=10) e Controle (azul; n=7) (*p<0,05). 32

Figura 14: Número de células por mm² nos setores CA1 e CA3 e no giro denteado. No CA1, os ratos EpiDBSa apresentaram maior número de células quando comparados aos ratos Epi (*p<0,05). O número de células do setor CA3 foi semelhante entre todos os grupos. O grupo EpiDBSi apresentou mais células granulares no giro denteado quando comparado ao grupo Epi (*p<0,05) e ao grupo Controle (#p<0,05). O grupo EpiDBSi apresentou um número maior de células no hilo quando comparado aos grupos Epi (*p<0,05) e ao grupo EpiDBSa (#p<0,05). Houve perda celular no hilo no grupo Epi comparado ao Controle (*p<0,05). N=5 para todos os grupos. 33

Figura 15: Representação gráfica em unidades arbitrárias da análise do brotamento de fibras musgosas por densitometria e imagens histológicas representativas do giro denteado corado com a técnica de neo-Timm. Em A, o gráfico demonstrando que o brotamento aberrante na camada molecular do giro denteado é similar entre os grupos Epi (B; n=5), EpiDBSa (C; n=5) e EpiDBSi (D; n=5), mas difere do grupo Controle (E; n=5) (*p<0,05). m: camada molecular interna; g: camada granular; h: hilo. 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANS	Agência Nacional de Seguradoras de Saúde
CER	crises espontâneas recorrentes
DG	giro denteado
EC	córtex entorrinal
ECP	estimulação cerebral profunda (do inglês <i>deep brain stimulation</i> , DBS)
ELT	epilepsia do lobo temporal
GL	Gay Lussac
ILAE	Liga Internacional Contra Epilepsia
i.m.	intramuscular
i.p.	intraperitoneal
LTM	lobo temporal mesial
LEC	córtex entorrinal lateral
MEC	córtex entorrinal medial
NAT	núcleo anterior do tálamo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PaS	para-subículo
PP	via perfurante
PPL	via perfurante lateral
PPM	via perfurante medial
PrS	pré-subículo
SE	estado do mal epiléptico ou <i>status epilepticus</i>
SNC	sistema nervoso central
TA	via temporoamônica

RESUMO

Introdução: O déficit cognitivo é uma comorbidade muito comum da epilepsia do lobo temporal mesial (LTM) e tem sido extensamente estudado em roedores. O déficit de memória pode ocorrer logo após o *status epilepticus* (SE), que é um evento associado à extensa perda de células em estruturas do LTM, incluindo o hipocampo. A estimulação cerebral profunda (ECP) do núcleo anterior do tálamo (NAT) tem sido utilizada nos estudos clínico e pré-clínico como um tratamento alternativo para epilepsias focais. Além do efeito anticonvulsivante, foi recentemente demonstrado que a ECP do NAT, durante o SE, tem efeitos neuroprotetores, atuando na redução da apoptose e da resposta inflamatória induzida pelo SE. Objetivos: A partir disso, nós hipotetizamos que a administração da ECP no NAT durante o SE e durante a fase silente no modelo da pilocarpina iria reduzir o prejuízo cognitivo nesse modelo de epilepsia do LTM. Metodologia: Para testar essa hipótese, foi administrada a ECP no NAT durante 6h a partir da caracterização do SE em ratos que desenvolveram o SE induzido pela pilocarpina. No segundo grupo de animais, o tratamento com a estimulação continuou durante a fase silente do modelo. Quatro meses após a indução, todos os grupos foram submetidos ao labirinto aquático de Morris e, subsequentemente, à avaliação histológica. Resultados: Os animais com eletrodos apresentaram maior latência para desenvolver o SE ($p < 0,001$). Animais estimulados apenas durante o SE (grupo EpiDBSa) e também durante a fase silente (grupo EpiDBSi) tiveram latência para a primeira crise espontânea similar quando comparados ao grupo sem implante (grupo Epi); $p = 0,46$). Todos os grupos aprenderam a tarefa espacial, porém todos os animais epiléticos apresentaram um déficit similar. A ECP do NAT resultou em neuroproteção das células hipocâmpais do CA1 e do giro denteado. Não foram observadas diferenças no brotamento de fibras musgosas entre os ratos com ou sem estimulação. Conclusão: Nossos dados sugerem que a ECP do NAT tem um papel neuroprotetor sobre as células hipocâmpais, mas isso não foi o suficiente para prevenir o declínio cognitivo em ratos epiléticos crônicos tratados com pilocarpina.

ABSTRACT

Introduction: Cognitive impairment is a significant comorbidity of temporal lobe epilepsy (TLE) and has been extensively examined in rodent models. Memory deficits may occur soon after status epilepticus (SE), an event associated with extensive cell loss in temporal lobe structures, including the hippocampus. Deep brain stimulation (DBS) of anterior thalamus nucleus (AN) has been used in clinical and preclinical studies as alternative treatment for focal epilepsies. In addition to an anticonvulsant effect, AN DBS delivered during status has been recently shown to have a neuroprotective effects, reducing SE-induced hippocampal inflammatory changes and apoptosis. Objective: Bearing this in mind, we hypothesized that AN DBS administered during SE and the silent phase of pilocarpine TLE model would reduce the cognitive impairment observed in this model. Material and methods: To test this hypothesis, rats that developed pilocarpine-induced SE were given either AN DBS during 6h following the onset of seizures. In a second batch of rats, stimulation treatment continued during the silent phase of the model. Four months following pilocarpine injections, all groups underwent water maze testing and subsequent histological evaluation. Results: DBS-treated animals had longer latency to SE onset ($p < 0.001$). Animals stimulated only during status (EpiDBSa group) or also latent phase (EpiDBSi group) had similar latency to the first spontaneous seizure when compared with non-implanted animals (pilocarpine control, Epi group; $p = 0.46$). All groups learned the spatial task but with significant, but similar deficit observed among all epileptic groups. AN DBS resulted in neuroprotection of hippocampal cells in CA1 and dentate gyrus. No differences were detected in the mossy fiber sprouting among stimulated and non-stimulated epileptic rats. Conclusion: Our data suggest that AN DBS has neuroprotective role on hippocampal cells but this was not enough to prevent the cognitive decline in pilocarpine-treated chronic epileptic rats.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A epilepsia é uma doença do sistema nervoso central (SNC) que possui uma extensa literatura na história das neurociências. No decorrer dos séculos, perdeu o estigma de sobrenatural associado à feitiçaria e à possessão demoníaca e passou a ser estudada sob a ótica da observação de indivíduos acometidos por esta condição na era hipocrática e na medicina moderna (Mota Gomes, 2006).

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS, 2016), a epilepsia apresenta-se como um das doenças neurológicas mais comuns e é representada por mais de 30 formas clínicas. Segundo uma estimativa atual, a epilepsia atinge cerca de 50 milhões de pessoas no mundo e outros 2,4 milhões de novos casos são somados a cada ano. Aproximadamente 80% dessas pessoas vivem em países emergentes e apenas em torno de 25% destes recebe o tratamento adequado.

Essa disfunção cerebral é composta por um diverso grupo de epilepsias que partilham a predisposição a gerar crises epilépticas, as quais se caracterizam pela interrupção recorrente e imprevisível da função cerebral normal (Fisher *et al.*, 2005). Até recentemente, os conceitos e as terminologias para classificar as crises e as epilepsias baseavam-se em observações feitas há muitas décadas. Por este motivo, a Liga Internacional Contra Epilepsia (do inglês *International League Against Epilepsy*, ILAE) propôs, em 2016, uma nova classificação das crises quanto a sua localização e a sua etiologia (Scheffer, 2016).

Em relação à localização, as crises epilépticas podem ser focais ou generalizadas. Enquanto as focais se originam em um foco e se propagam por redes neuronais que se restringem a apenas um hemisfério cerebral, as crises generalizadas, por sua vez, se propagam pelos dois hemisférios podendo atingir estruturas corticais e subcorticais, mas não necessariamente todo o córtex. Em relação à etiologia, as crises podem ser classificadas em 1) genéticas quando a epilepsia é o resultado direto de um ou mais defeitos genéticos; 2) estruturais quando uma avaliação conjunta da neuroimagem com os achados eletroclínicos levam à conclusão de que a epilepsia é o resultado mais provável de uma anormalidade como, por exemplo, a displasia cortical focal, o trauma e a síndrome hipóxica-isquêmica. Tais anormalidades estruturais podem ter uma origem genética,

adquirida ou ambas; 3) metabólicas quando são o resultado secundário de mudanças bioquímicas ou defeitos metabólicos que apresentam causa genética ou adquirida (por exemplo porfiria, uremia, aminoacidopatias, crises dependentes de piridoxina e deficiência cerebral de folato); 4) imunes quando há uma inflamação do SNC mediada por uma causa autoimune; 5) infecciosas quando o paciente apresenta malária cerebral, tuberculose, HIV, neurocisticercose ou toxoplasmose cerebral, por exemplo. Não incluem convulsões no contexto de infecção aguda; 6) desconhecidas quando se desconhece a natureza de sua causa (Berg *et al.*, 2010; Berg e Scheffer, 2011; Scheffer, 2016).

Estudos prospectivos recentes demonstram que 60% dos pacientes recém-diagnosticados com epilepsia remitem, isto é, atingirão dez anos sem crises epiléticas com o tratamento adequado (Kwan e Sander, 2004; Fisher *et al.*, 2014). Pesquisas epidemiológicas evidenciam, ainda, o curso das epilepsias não tratadas e revelam que, em países em desenvolvimento, onde o acesso à terapia farmacológica não se encontra facilmente disponível, as taxas de remissão espontânea são de apenas 30% (Kwan e Sander, 2004).

Devido ao advento de novos métodos de tratamento e de novas terapias farmacológicas, o custo dos cuidados médicos desses pacientes aumentou substancialmente, podendo ultrapassar US\$ 100.000,00 ao ano por paciente em países desenvolvidos (*National Parkinson Foundation*, 2016). Estes gastos tornaram-se mais evidentes com o surgimento de novos métodos no campo da imagenologia diagnóstica e com o uso de procedimentos, antes pouco utilizados, como a cirurgia ressectiva do foco primário e também a terapia com a estimulação cerebral profunda (ECP). Esta última se tornou uma importante alternativa para até 30% dos pacientes com epilepsia focal refratária (para revisão ver Sallet *et al.*, 2009).

Não há uma estimativa atual que evidencie a quantidade de pessoas em todo o mundo que utilizam a ECP como uma alternativa terapêutica para o controle de crises epiléticas. Apesar do elevado custo da cirurgia de inserção dos eletrodos, a qual soma, no mínimo, US\$ 35.000,00, a ECP é uma terapia considerada reversível e relativamente segura. Os estudos recentes são promissores e revelam, agora, novas perspectivas para o uso da ECP além de seu mecanismo de ação sobre as crises, mas, também, sobre as comorbidades associadas às epilepsias cujas manifestações se dão com a progressão da doença como os transtornos

relacionados à memória e à cognição – características da epilepsia do lobo temporal (para revisão ver Sankar *et al.*, 2014; Suthana e Fried, 2014).

Dada a eficácia limitada da farmacoterapia no curso da epilepsia do lobo temporal, nota-se, assim, a enorme importância de estudos nesta área que possibilitem tanto uma forma alternativa para extinção, redução drástica ou mesmo a prevenção para o desenvolvimento das crises epiléticas quanto medidas que tenham um impacto secundário e significativo sobre a memória e o aprendizado. Na busca por alvos de estimulação, o núcleo anterior do tálamo tem demonstrado grande potencial no controle das crises epiléticas. No entanto, dado que esta estrutura medeia memórias episódicas e mecanismos de navegação espacial e visual no circuito hipocampal, estudos que também busquem averiguar os efeitos da estimulação desta estrutura talâmica sobre a memória mostram-se importantes. Seus resultados podem trazer repercussões positivas e diretas no âmbito cognitivo, psicológico e socioeconômico.

1.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL E A CIRCUITARIA DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

A primeira definição de epilepsia surgiu ainda no século XIX em uma época em que se desconhecia, até então, a base eletroquímica da transmissão nervosa. Tal definição foi cunhada, em 1873, pelo neurofilósofo John Hughlings Jackson (1835-1911), como sendo uma “descarga ocasional, súbita, excessiva, rápida e local do tecido nervoso” (Fisher *et al.*, 2005; Hughlings, 1873 apud York e Steinberg, 2011).

Segundo a definição operacional mais moderna da ILAE (2014), imputada à categoria médica com o intuito de introduzir um novo critério diagnóstico, a epilepsia pode ser caracterizada por: 1) ao menos duas crises não provocadas (ausência de um fator reversível ou temporário) ou duas crises reflexas com intervalo de, pelo menos, 24h entre elas; ou 2) uma crise não provocada ou uma crise reflexa com uma elevada chance de nova ocorrência de 60% dentro de um período de dez anos; ou 3) diagnóstico de uma síndrome epilética (Fisher *et al.*, 2014; Schmidt, 2015). Outra definição mais direcionada à categoria não médica (educadores, pesquisadores e pessoas com epilepsia) é a de que a epilepsia é caracterizada pela

presença de crises espontâneas recorrentes (CER) cujos sinais e/ou sintomas transitórios ocorrem devido a uma atividade neuronal sincrônica, anormal e excessiva no cérebro na ausência de condição tóxica-metabólica ou febril (Lothman e Bertram, 1993; Fisher *et al.*, 2005; Fisher e Velasco, 2014; Trinka *et al.*, 2015).

As CER podem originar-se de uma lesão inicial precipitante como o estado do mal epilético (SE) – evento no qual pode ocorrer uma perda de consciência por mais de 30 minutos ou alteração da cognição por mais de quatro horas (Curia *et al.*, 2008). Outras condições frequentemente associadas incluem convulsões febris na infância que se manifestam sem o componente infeccioso (presente em dois terços dos pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT)), um trauma cerebral com perda de consciência, lesão ao nascimento ou durante a primeira infância, infecções como meningite ou encefalite e malformações cerebrais como tumores no lobo temporal mesial (LTM) (*Epilepsy Foundation*, 2016).

A ELT é a forma mais frequente de epilepsia focal em adultos, perfazendo cerca de 60% de todas as epilepsias. Em geral, tem seu início na infância tardia ou adolescência e, tradicionalmente, a excisão temporal é utilizada como um último recurso para tratar indivíduos que apresentam crises focais refratárias ao tratamento farmacológico e representa dois terços dos procedimentos cirúrgicos (Tatum, 2012).

O lobo temporal é a região mais epileptogênica do cérebro, onde a maioria das crises focais se origina. Isso ocorre devido às intrincadas redes neuronais que envolvem o complexo amígdalo-hipocampal e o córtex entorrinal, as quais sofrem modificações após o insulto inicial. Dentre as modificações, pode ocorrer alterações plásticas envolvendo dendritos, botões sinápticos e glia, que levam ao aumento (brotamento ou neosinaptogênese) ou à diminuição (refinamento ou morte do neurônio pré-sináptico) das conexões inibitórias e/ou excitatórias cujo remodelamento favorece o surgimento de crises epiléticas (para revisão ver Bernard, 2012).

A anatomia da formação hipocampal (Figura1) compreende uma estrutura trilaminar composta pelo hipocampo propriamente dito (subdividido em CA1, CA2, CA3 e CA4), giro denteado e complexo subicular (compreende o subículo, o pré-subículo e o para-subículo). Alguns autores aceitam também o córtex entorrinal (ou área 28 de Brodmann) como parte da formação hipocampal (Schultz e Engelhardt, 2014).

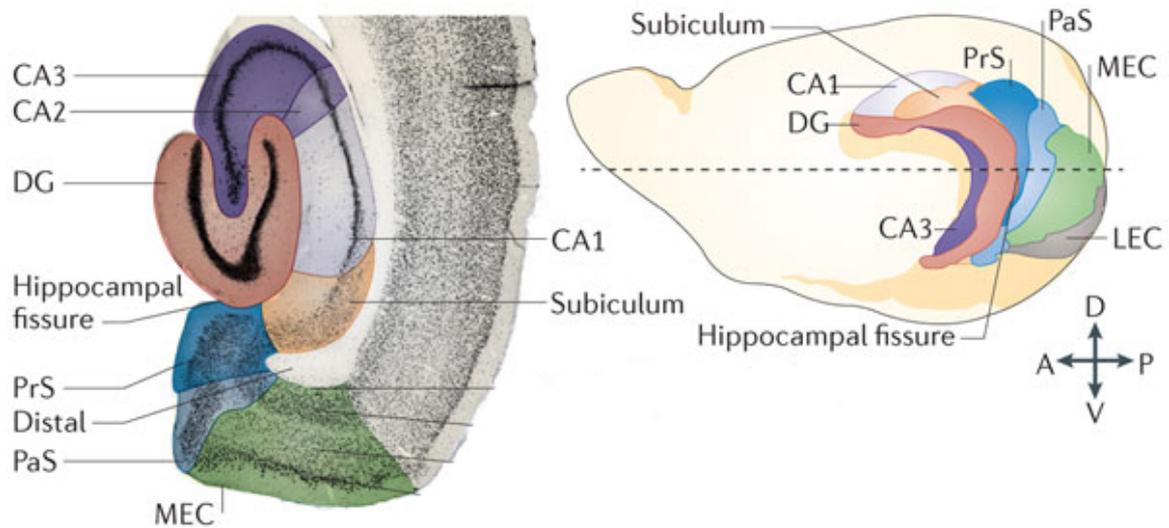


Figura 1: Diagrama da estrutura da formação hipocampal e da região parahipocampal de roedores. À esquerda, uma representação da secção horizontal do hemisfério direito do cérebro de um rato onde se observa os diferentes setores do hipocampo (setores CA1, CA2 e CA3), o giro denteado, o complexo subicular e o córtex entorrinal. À direita, a representação da vista hemi-sagital do hemisfério direito. DG: giro denteado; MEC: córtex entorrinal medial; LEC: córtex entorrinal lateral; PrS: pré-subículo; PaS: para-subículo (Adaptado de Moser *et al.*, 2014)

No indivíduo saudável, as conexões hipocampais intrínsecas formam a via excitatória trisináptica (córtex entorrinal → giro denteado → CA3 → CA1 → córtex entorrinal) (Figura 2). Os axônios da camada II do córtex entorrinal emitem eferências glutamatérgicas à camada molecular externa do giro denteado através da via perfurante (via temporodenteada). As informações recebidas pelo giro denteado são transmitidas, através das fibras musgosas (axônios de células granulares), para os interneurônios e as células musgosas da região hilar e para as células piramidais da região CA3. As projeções hilares (representadas por retângulos azuis claros na figura 2), por sua vez, emitem projeções de volta à camada molecular interna do giro denteado. Axônios das células piramidais do CA3 se projetam, então, para a região CA1 via colaterais de Schaffer e os axônios das células piramidais de CA1, por sua vez, emitem projeções para as camadas mais profundas do córtex entorrinal indiretamente através do subículo (Schultz e Engelhardt, 2014).

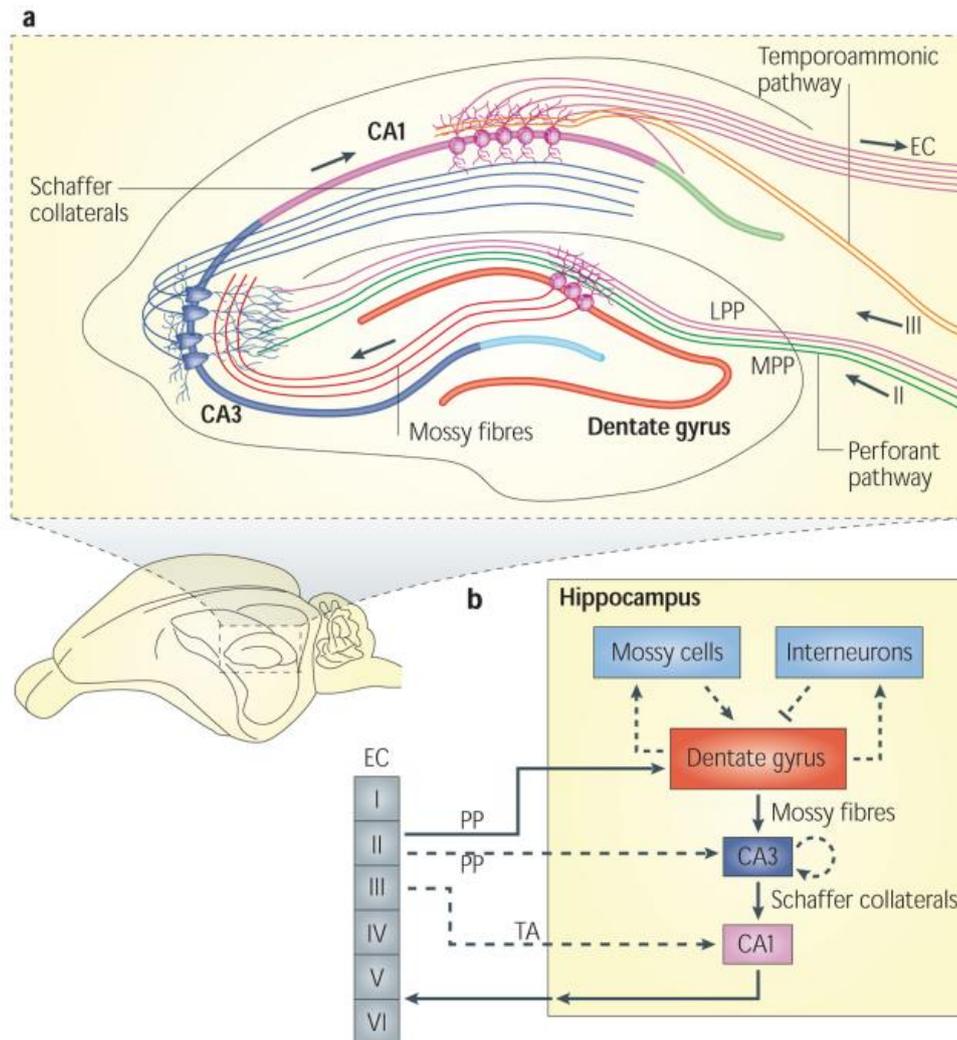


Figura 2: Circuitaria neural no hipocampo de roedores. A. Ilustração da via tri-sináptica. B. Diagrama da rede neural no hipocampo. A via tri-sináptica está representada pela setas cheias. A camada II do córtex entorrinal emite projeções ao giro dentado através da via perfurante, o que inclui a via perfurante lateral e medial. O giro dentado projeta à região CA3 do hipocampo através das vias musgosas. Por sua vez, os neurônios de CA3 se projetam aos de CA1 através das vias colaterais de Schaffer. A região CA1 do hipocampo emite projeções de volta à camada mais profunda do córtex entorrinal. A camada molecular do CA3 também recebe projeções diretas da camada II do córtex entorrinal através da via perfurante. CA1 recebe projeções diretas da camada III do córtex entorrinal através da via temporoamônica. A células granulares do giro dentado também se projetam às células musgosas do hilo e aos interneurônios hilares, os quais mandam projeções excitatórias e inibitórias, respectivamente, de volta às células granulares do giro dentado. EC: córtex entorrinal; PP: via perfurante; TA: via temporoamônica; PPL: via perfurante lateral; PPM: via perfurante medial (Deng *et al.*, 2010).

1.2.1 Perda neuronal e a consequente reorganização axonal

A esclerose hipocampal é o achado anatomopatológico mais frequentemente encontrado (50 a 70%) em espécimes removidos cirurgicamente provenientes de indivíduos com ELT. Outros achados menos frequentes presentes em 5 a 30% dos pacientes incluem angiomas, cavernomas e lesões glióticas devido ao trauma ou à infecção (Tatum, 2012). Além do hipocampo e do giro denteado (esclerose hipocampal), outras estruturas extra-hipocampais também podem ser afetadas como o giro parahipocampal, amígdala e córtex entorrinal (esclerose mesial hipocampal).

O termo 'esclerose' se refere à alteração macroscópica observada pelo endurecimento e pela atrofia do tecido. Microscopicamente a esclerose é caracterizada pela perda neuronal variável e seletiva de neurônios piramidais das subáreas CA1, CA3 e CA4 do hipocampo e de células musgosas e interneurônios hilares do giro denteado seguida de proliferação e hipertrofia de corpos celulares astrogliais. As células piramidais de CA2 e as células granulares do giro denteado são relativamente mais resistentes (Cendes, 2005; Thom *et al.*, 2009).

Como consequência à deafferentação das células granulares no giro denteado, o período epileptogênico progride com a reorganização das conexões sinápticas, por exemplo, na camada molecular interna no giro denteado. Essa reorganização é expressa pelo brotamento aberrante de fibras musgosas e o estabelecimento de sinapses com os próprios dendritos das células granulares (Figura 3). Desta maneira, estabelece-se um circuito excitatório recorrente, uma vez que também há uma degeneração dos interneurônios inibitórios na camada molecular interna (para revisão ver Buckmaster, 2012).

A coloração de neo-Timm (Figura 3) é um procedimento histológico que permite a identificação de terminais sinápticos que contêm zinco. Em animais epiléticos crônicos, a presença de terminais sinápticos contendo zinco na camada molecular interna do giro denteado é considerada característica morfológica desse tecido e é indicativa do remodelamento sináptico denominado brotamento das fibras musgosas.

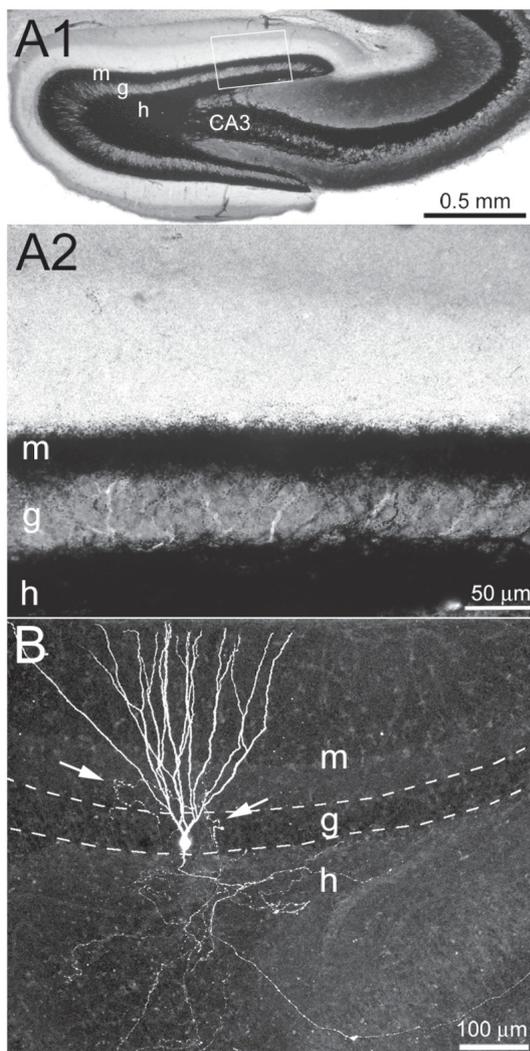


Figura 3: Brotamento de fibras musgosas no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina.

Terminais contendo zinco, característica das fibras musgosas no giro dentado e da região CA3 do hipocampo (A1) após coloração histológica de neo-Timm. Em A2, em detalhe, observa-se a camada densa e escura que identifica os terminais sinápticos das fibras musgosas sobre os dendritos proximais das células granulares. Em B, uma célula granular marcada com biocitina mostrando os dendritos apicais, colaterais axônicos no hilo. Um dos axônios (seta) em direção recorrente (brotamento de fibras musgosas) se projeta de volta à camada molecular através da camada granular. m: camada molecular interna; g: camada granular; h: hilo (Buckmaster, 2012).

Os mecanismos subjacentes ao brotamento de fibras musgosas ainda permanecem obscuros, mas estudos demonstram que, além da neosinaptogênese reativa, a atividade epiléptica e a remoção do alvo sinápticos das fibras musgosas também favorecem o desenvolvimento de fibras colaterais cujo amadurecimento completo ocorre cerca de três meses após o SE em ratos. Somando-se a isso, outros estudos demonstram, ainda, que as células granulares possuem capacidade proliferativa a uma taxa de 6% do total da população a cada mês, a qual se acelera

após um evento ictal. Além disso, demonstrou-se também que apenas a neurogênese que ocorre no intervalo entre quatro semanas antes do SE e quatro dias após o evento desenvolve projeções aberrantes em direção à camada molecular interna do giro denteado. Outro estudo demonstrou que apenas 5% das sinapses estabelecidas nas camadas granular e molecular ocorrem com os interneurônios; os outros 95% são com as células granulares, o que gera um circuito excitatório aberrante (para revisão ver Buckmaster, 2012).

1.3 MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL INDUZIDO PELA PILOCARPINA

O desenvolvimento de modelos experimentais animais na pesquisa pré-clínica que apresentem aspectos semelhantes à ELT têm sido fundamental para a elucidação da fisiopatologia de distúrbios neurológicos bem como para o estabelecimento de abordagens terapêuticas. O uso de modelos experimentais permite que haja um maior controle no número de variáveis envolvidas (como idade, bases genéticas e insulto precipitante inicial) e permite que se estude a fisiopatologia sem a interferência de fatores externos heterogêneos cuja influência na progressão da ELT ainda se desconhece.

Dentre os modelos farmacológicos existentes, um dos mais utilizados é o modelo de administração sistêmica da pilocarpina. Este modelo, desenvolvido por Turski e colaboradores em 1983, produz alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuropatológicas associadas à esclerose mesial temporal semelhantes às observadas em indivíduos acometidos pela ELT (Turski *et al.*, 1983).

A pilocarpina é um alcaloide originalmente isolado das folhas de jaborandi (*Pilocarpis microphyllus*) com propriedades parassimpatomiméticas (agonista muscarínico) capazes de induzir o SE quando administrada sistêmica ou intracerebralmente em ratos (Turski *et al.*, 1983).

Recentemente a ILAE propôs uma nova definição do estado do mal epiléptico. Segundo a ILAE,

o SE é uma condição resultante tanto da falha de mecanismos responsáveis pelo fim das crises quanto da iniciação de mecanismos, os quais levam às crises prolongadas e anormais (t1). É uma condição, a qual pode ter consequências a longo prazo (t2), incluindo morte neuronal, lesão neuronal

e alteração das redes neuronais dependendo do tipo e da duração das crises (Trinka *et al.*, 2015).

A indução da epilepsia nesse modelo é dividida em três fases bem caracterizadas na literatura (aguda, latente/silente/quiescente e crônica), onde cada fase apresenta uma característica específica com algum grau de sobreposição. A segunda fase compõe o que se chama de epileptogênese - o período no qual, a partir do insulto precipitante inicial (fase aguda), ocorre uma intensa reorganização sináptica que culmina na geração de crises epiléticas recorrentes (fase crônica) e ali se encerra. No entanto, a corrente de pensamento atual acredita que o período epileptogênico possa ser contínuo e que, progressivamente, produza mudanças que vão além do período crônico e que se manifestam através da frequência do padrão de crises, da esclerose hipocampal gradual ou mesmo do desenvolvimento de uma resistência farmacológica aos anticonvulsivantes (Maguire, 2016).

A fase aguda é caracterizada pela fase posterior à injúria precipitante inicial, ou seja, o SE, sendo o principal achado desta fase a lesão celular (Fujikawa, 1996; Arida *et al.*, 1999; Covolan e Mello, 2000). Já a fase latente, caracterizada pela normalização eletrográfica e comportamental, apresenta intensa reorganização axonal e altas taxas de proliferação celular (Parent *et al.*, 1997; Covolan, L., Ribeiro, L. T., *et al.*, 2000). Por último, a fase crônica se distingue pela presença de CER que coincidem com o brotamento anormal de fibras musgosas (Mello *et al.*, 1992; Mello *et al.*, 1993) observados na Figura 3 e relativamente pouca lesão neuronal (Mello e Covolan, 1996; Covolan, L. e Mello, L. E., 2006).

Dado o amplo conhecimento já estabelecido na literatura em relação às alterações celulares posteriores à administração farmacológica de pilocarpina, esse modelo se torna interessante para avaliar tratamentos que busquem possíveis benefícios clínicos que levem à redução e/ou extinção das crises. O uso de ECP, cujo exato mecanismo de ação ainda está sob investigação, tem sido uma medida terapêutica promissora na redução das crises focais tanto nos modelos de epilepsia (Covolan *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2016) quanto nos próprios pacientes com epilepsias intratáveis que sejam refratários ao tratamento farmacológico e que não sejam candidatos à excisão cirúrgica (Hodaie *et al.*, 2002; Kerrigan *et al.*, 2004; Graves e Fisher, 2005; Osorio *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Salanova *et al.*, 2015).

1.4 ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA

A ECP (do inglês *Deep Brain Stimulation*, DBS) é uma alternativa interessante às terapias farmacológicas, biológicas e celulares existentes, que permite a modulação bem-sucedida da sintomatologia de diversos distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos de maneira transitória e reversível.

Os primeiros estudos com estimulação elétrica surgiram ainda no século XIX. Na década de 1870, a estimulação elétrica foi introduzida como um instrumento no auxílio à investigação das funções cerebrais em procedimentos neurocirúrgicos. Em 1947, um estudo pioneiro, em humanos, de implante de eletrodos em estruturas cerebrais profundas inaugurou um novo campo de pesquisa para testes clínicos subsequentes para o tratamento, principalmente, de distúrbios neuropsiquiátricos e da dor crônica. Em 1973, surge, então, o primeiro trabalho sobre a estimulação elétrica do cerebelo como terapia para o tratamento da epilepsia (Kringelbach *et al.*, 2007).

A ECP consiste no implante, através de um procedimento minimamente invasivo, de eletrodos intracraniais subdurais que emitem uma descarga contínua e pulsátil de impulsos elétricos de alta frequência em alvos específicos do parênquima cerebral (Lozano e Kopell, 2014). Estes eletrodos estão conectados a estimuladores portáteis que apresentam parâmetros modificáveis como amperagem, voltagem, frequência, pulso, estimulação mono- ou bifásica, intermitente ou contínua, mono- ou multipolar e configuração dos eletrodos. Tais parâmetros variam dependendo do alvo escolhido e permitem um ajuste fino, a fim de maximizar os benefícios clínicos e reduzir os efeitos colaterais secundários relacionados à estimulação (Wyckhuys *et al.*, 2009; Lozano e Kopell, 2014; Sankar *et al.*, 2014). Outra vantagem da ECP reside na possibilidade de se evitar os efeitos colaterais tipicamente associados à intervenção farmacológica.

Apesar do tratamento adequado, mais de 30% dos pacientes não respondem às drogas anti-epilépticas disponíveis comercialmente (Kwan e Brodie, 2000). Por este motivo, a ECP é uma alternativa terapêutica em ascensão, sendo utilizada não só em indivíduos com formas farmacorresistentes de epilepsia, mas também com crises focais múltiplas, generalizadas ou bilaterais ou com convulsões em áreas que acarretem prejuízo ao processamento sensorial, à habilidade linguística ou que

levem à paralisia – denominadas de córtex eloquente – onde a ressecção cirúrgica não é uma opção para esses pacientes (Kahane e Depaulis, 2010).

A ECP tem sido aplicada, principalmente, em alvos subcorticais como os núcleos talâmicos, os gânglios da base, o hipocampo e a amígdala (para revisão ver Wyckhuys *et al.*, 2009). No entanto, independente do alvo, a ECP objetiva reduzir a probabilidade e/ou propagação de novas crises epiléticas e, apesar de paliativa, tem demonstrado ser uma estratégia terapêutica relativamente segura com potencial benefício aos indivíduos com epilepsia refratária (Pilitsis *et al.*, 2008).

Diversos estudos pilotos não controlados vêm apontando para o papel auspicioso do núcleo anterior do tálamo (NAT) na epilepsia (Hodaie *et al.*, 2002; Kerrigan *et al.*, 2004; Graves e Fisher, 2005; Osorio *et al.*, 2007). Tais resultados favoráveis levaram à implementação de um estudo multicêntrico randomizado e duplo-cego denominado SANTE - Estimulação do Núcleo Anterior do Tálamo para Epilepsia (do inglês, *Stimulation of the Anterior Nucleus of the Thalamus for Epilepsy*). Este estudo envolveu a estimulação intermitente e bilateral do NAT em 110 pacientes com crises focais com ou sem generalização secundária e mostrou a redução do número de crises que persistiu mesmo após dois anos de tratamento (Fisher *et al.*, 2010). Um resultado similar, utilizando estimulação aguda do NAT esquerdo de ratos, foi capaz de reduzir as taxas de crises epiléticas induzidas pela pilocarpina (Jou *et al.*, 2013; Covolán *et al.*, 2014). Isso demonstra, portanto, o envolvimento do NAT na redução da frequência de crises em testes clínicos e no estudo com modelos animais devido ao provável papel da estimulação na restauração do balanço entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios no córtex (Liu *et al.*, 2012). Com base nesses resultados, a estimulação desta estrutura já foi aprovada em diversos países como Austrália, Canadá e em países da União Europeia como um tratamento para crises parciais farmacorresistentes e para crises secundárias generalizadas (Fisher e Velasco, 2014). No Brasil, também já foi aprovado pela Agência Nacional de Seguradoras de Saúde (ANS).

É importante ressaltar que, para a epilepsia, os parâmetros de estimulação e melhores alvos para implante têm sido, basicamente, decididos pela prática e resultados clínicos. Nesse sentido, o nosso grupo tem sido um dos pioneiros no Brasil e no mundo a investir em tentativas de sanar esse déficit. Em estudos recentes, utilizando um modelo experimental de ELT (modelo da pilocarpina), foi demonstrado que a ação anticonvulsivante da estimulação do NAT encontra-se

intimamente relacionada à intensidade de corrente (Covolan *et al.*, 2014) e que isso deve variar de acordo com a fase, se aguda (Amorim *et al.*, 2015) ou crônica (Covolan *et al.*, 2014).

O NAT é composto por três subnúcleos (anteroventral, anteromedial e anterodorsal) que possuem uma intrincada relação com o sistema hipocampal (Figura 4). Os neurônios anteroventrais estão implicados na propagação do ritmo *theta*, cujo papel está associado à plasticidade sináptica da formação hipocampal e do córtex retrosplenial. Já os neurônios anteromediais têm um papel na transmissão de sinais provenientes do hipocampo às áreas pré-frontais envolvidas em funções executivas, cognitivas e emocionais. Por sua vez, os anterodorsais têm papel putativo na navegação espacial (Child e Benarroch, 2013). Estudos com modelos animais sugerem, ainda, que o NAT possui um papel na propagação de crises focais (Child e Benarroch, 2013; Fisher e Velasco, 2014), visto que já foi observado uma alta atividade nesta estrutura durante a crise epiléptica (Mirski e Ferrendelli, 1986), mas, quando o NAT é estimulado, lesado ou infundido quimicamente, há uma redução dessas crises induzidas quimicamente (Mirski *et al.*, 1997; Hamani *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2011). Um estudo sugere que pode haver uma supressão da sincronização, da amplificação e, assim, da propagação de crises focais corticais clínicas quando se faz uso de procedimentos como estimulação ou lesão (Takebayashi *et al.*, 2007).

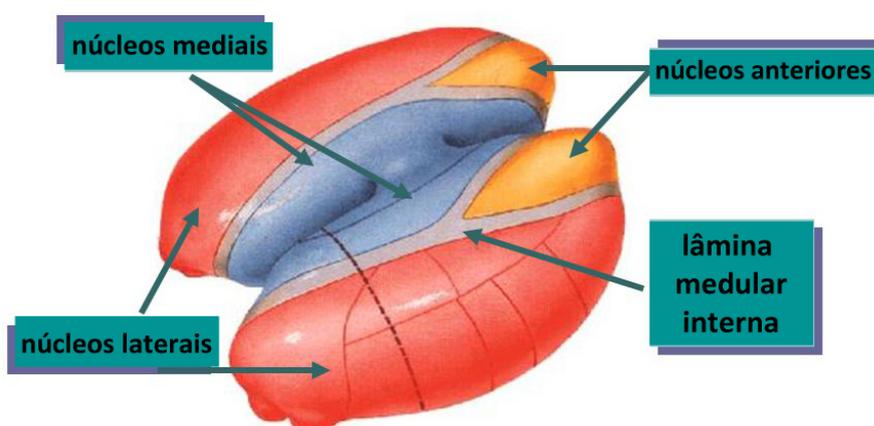


Figura 4: Organização geral dos núcleos talâmicos. Os núcleos talâmicos são divididos em laterais, mediais e anteriores. Os núcleos anteriores são divididos, por sua vez, em anteroventral, anteromedial e anterodorsal (não representados nesta figura) (Adaptado de SlidePlayer).

Desta maneira, devido a sua conectividade central com o sistema hipocampal - visto que emite eferências diretas e indiretas à formação hipocampal (subículo, pré-subículo e para-subículo), a sua consequente capacidade de modular redes neurais e ao seu possível papel na propagação de crises, o NAT se mostra, através da ECP, uma interessante alternativa para tratar disfunções que levam à prejuízos da memória e da cognição (Child e Benarroch, 2013; Suthana e Fried, 2014). Ademais, é um núcleo de projeção difusa com eferências corticais amplas (córtices do cíngulo anterior e posterior e córtex retrosplenial) e possui uma área relativamente grande e bem definida, tornando possível o posicionamento do eletrodo (Lega *et al.*, 2010; Child e Benarroch, 2013).

1.4.1 O papel do núcleo anterior do tálamo na memória

Enquanto a ECP vem sendo utilizada com grande sucesso no controle de crises epiléticas, estudos paralelos vêm apontando para o seu possível papel benfazejo no aumento da memória e da função cognitiva.

O baixo desempenho em tarefas dependentes do hipocampo já foi extensamente demonstrado em estudos com ratos epiléticos crônicos tratados com pilocarpina (Cavarsan *et al.*, 2013; Pearson *et al.*, 2014). É possível que isto esteja relacionado à grande lesão neuronal causada pelo SE (Covolán e Mello, 2000) e à consequente reorganização da circuitaria hipocampal imediatamente após o insulto precipitante inicial, a qual leva à redução na frequência e na potência do ritmo *theta* antes e após tarefas comportamentais (Chauviere *et al.*, 2009).

O LTM tem uma participação crucial na consolidação de memórias de curto em longo prazo nos neo- e paleo-córtices. Além disso, o LTM também tem um papel importante na formação de memórias declarativas (memórias que podem ser explicitamente verbalizadas) como a memória episódica (memória associada à eventos biográficos como tempo e lugar) e memória semântica (memória associada à conceitos). A manipulação dessa circuitaria abre, portanto, um caminho de oportunidades para manipular o aprendizado e a memória.

Recentemente, foi demonstrado o potencial da ECP no NAT para melhorar, a longo prazo, o processamento verbal e oral de pacientes com ELT (Oh *et al.*, 2012). A eficácia da ECP pode aumentar substancialmente, a medida que os mecanismos neurobiológicos subjacentes ao efeito da estimulação do NAT forem melhor

compreendidos e que se encontre os melhores parâmetros de estimulação. A estimulação bem sucedida de alvos centrais, que sejam componentes chaves do circuito hipocampal, reforçam a ideia de que, com o êxito no controle das crises parciais mesiais (com ou sem generalização secundária) em indivíduos refratários à intervenção farmacológica, pode haver uma reversão nos déficits de memória e nos prejuízos cognitivos.

Tendo em vista, principalmente, a íntima relação entre o NAT e o hipocampo no que tange à propagação do ritmo *theta* e à navegação espacial, hipotetizamos que a intervenção terapêutica intermitente e premeditada desta estrutura, após e/ou durante o insulto precipitante inicial (muito anterior à fase de processamento ou consolidação), poderia alterar as propriedades neurofisiológicas intrínsecas da rede epiléptica de tal maneira a trazer benefícios cognitivos posteriores. Além disso, a perda progressiva de neurônios no tecido epiléptico está associada ao declínio do desempenho cognitivo progressivo. Portanto, indivíduos com extenso dano do LTM podem se tornar amnésicos com inabilidade de formar e reter novas memórias. Desta maneira, considerando que ECP do NAT durante o SE induzido pela pilocarpina tem um papel neuroprotetor (Amorim *et al.*, 2015) e os achados de nosso (Covolan *et al.*, 2014) e de outros grupos (Fisher *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012) demonstrando o papel da ECP do NAT na redução das crises epiléticas, hipotetizamos também que, caso a estimulação fosse administrada precocemente, poderia alterar o processo de epileptogênese e, a longo prazo, ser capaz de reverter os danos cognitivos causados pela instalação do quadro epiléptico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a estimulação cerebral profunda do núcleo anterior do tálamo durante o SE induzido pela pilocarpina sistêmica, é capaz de aumentar a latência para a primeira crise espontânea e melhorar o desempenho dos animais em testes de memória espacial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a ECP aguda (6h, durante o SE) ou intermitente (6h/dia, durante a fase silente) são capazes de alterar a latência para a primeira crise espontânea e a frequência das CER no modelo da pilocarpina;
- Avaliar se a ECP aguda (6h, durante o SE) ou intermitente (6h/dia, durante a fase silente) são capazes de melhorar a aprendizagem em ratos epiléticos crônicos;
- Avaliar se a ECP aguda (6h, durante o SE) ou intermitente (6h/dia, durante a fase silente) são capazes de interferir nos achados histopatológicos característicos do modelo da pilocarpina tais como a morte celular e a reorganização sináptica (brotamento das fibras musgosas).

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente estudo está de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEUA Nº 8637170214), cumprindo, também, as normas de utilização de animais do laboratório CONCEA e as normas internacionais de experimentação animal.

Neste trabalho foram utilizados ratos *Wistar* jovens (*Rattus norvegicus*) e machos com, aproximadamente, oito semanas de idade e peso variando entre 250-320 gramas. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e mantidos em caixas de polipropileno individuais no biotério (10 x 20 x 30 cm) com livre acesso à água e à comida e sob temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (6 - 18h) controlados.

O desenho experimental original contemplou a utilização de 44 animais, sendo 8 para o grupo Controle, 12 para grupo Epi (epilépticos sem eletrodos), 12 para o grupo EpiDBSa (epilépticos com estimulação aguda de 6h a partir do SE) e 12 para o grupo EpiDBSi (epilépticos com estimulação intermitente de 6h/dia durante 20 dias). Detalhes sobre os grupos experimentais e sobre os procedimentos podem ser encontrados nos itens 3.2 à 3.8.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

EXPERIMENTO 1: Para determinar o quanto a estimulação cerebral profunda é capaz de alterar o padrão de frequência de crises e a latência para a primeira crise espontânea no modelo experimental da pilocarpina, foram implantados eletrodos no núcleo anterior do tálamo em animais controles. A seguir, a epilepsia foi induzida pela administração sistêmica de pilocarpina (ver item 3.3). Imediatamente após o início do SE, todos os animais com eletrodos implantados foram estimulados com 400 μA durante seis horas contínuas (ver detalhes sobre os parâmetros de estimulação no item 3.5). Um grupo de animais sem eletrodos, que também recebeu a injeção de pilocarpina, foi utilizado como grupo Controle. Sete dias após a indução, os animais foram conduzidos para a filmagem durante 60 dias. Nesse experimento

foram utilizados 21 animais (Epi, n=10; EpiDBSa, n=11). Desenho experimental representado abaixo:

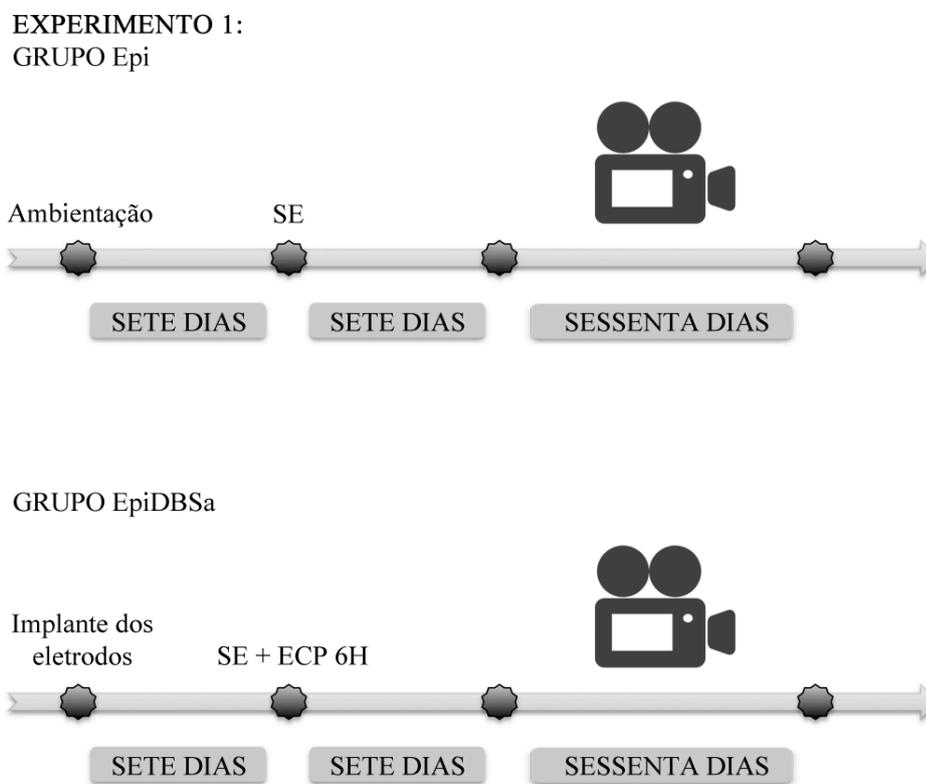


Figura 5: Desenho experimental 1. O SE foi induzido pela injeção intraperitoneal de pilocarpina. A ECP foi iniciada simultaneamente ao início do SE e mantida por 6h (grupo EpiDBSa). Animais sem eletrodos também foram submetidos ao SE (Grupo Epi). Ambos os grupos foram filmados por 60 dias para o registro da primeira crise espontânea e da frequência de CER. SE: *status epilepticus*; ECP: estimulação cerebral profunda; CER: crises espontâneas recorrentes.

EXPERIMENTO 2: Para avaliar se a ECP realizada diariamente durante a fase silenciosa do modelo da pilocarpina poderia alterar a latência para a primeira crise espontânea e o padrão de frequência de CER, um dia após o SE, o grupo EpiDBSa foi subdividido e parte dos animais passou a ser estimulada de forma intermitente, ou seja, 200 μ A por 6 horas/dia durante mais 19 dias (Grupo EpiDBSi). Sete dias após a indução, os animais foram conduzidos para a filmagem onde permaneceram durante 60 dias. Nesse experimento foram utilizados 12 animais EpiDBSi. Desenho experimental representado abaixo:

EXPERIMENTO 2:
GRUPO EpiDBSi

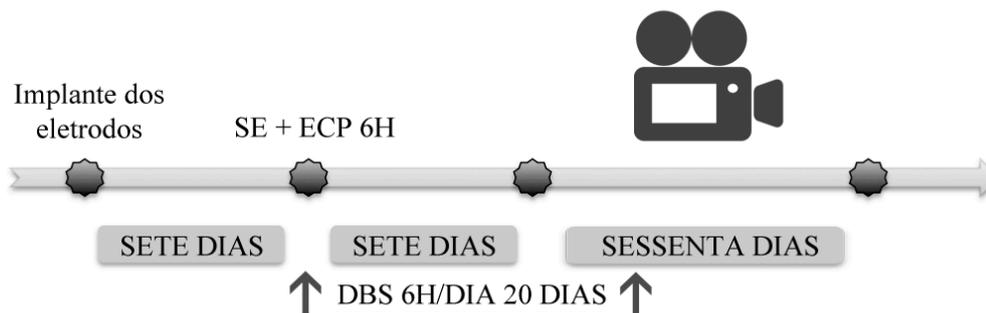


Figura 6: Desenho experimental 2. O SE foi induzido pela injeção de pilocarpina. A ECP foi iniciada simultaneamente ao início do SE e mantida por 20 dias de forma intermitente, ou seja, 6 horas/dia. O vídeo-monitoramento foi realizado 24h/dia para avaliação da latência para a primeira crise espontânea e a frequência de CER. SE: *status epilepticus*; ECP: estimulação cerebral profunda; CER: crises espontâneas recorrentes.

EXPERIMENTO 3: O labirinto aquático de Morris foi utilizado para analisarmos as possíveis mudanças na memória espacial de animais após a ECP. Essa tarefa foi realizada, quatro meses após a indução do SE, nos mesmos animais utilizados nos experimentos 1 e 2 (Grupos Epi, n=8; EpiDBSa, n=9 e EpiDBSi, n=10). Sete animais naive, de mesma idade, foram acrescentados como Controle. Desenho experimental representado abaixo:

EXPERIMENTO 3:
GRUPOS Epi, EpiDBSa, EpiDBSi E CONTROLE

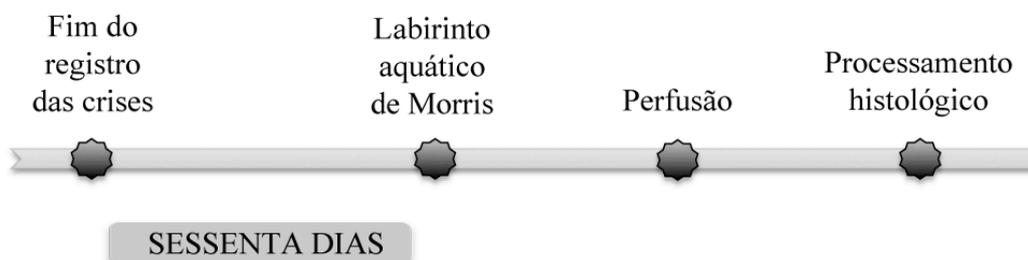


Figura 7: Desenho experimental 3 e 4. Tarefa comportamental e histologia. Quatro meses após o SE, os animais foram submetidos ao labirinto aquático de Morris durante 6 dias. Após o término da tarefa, todos animais foram perfundidos e o tecido cerebral utilizado em análises histológicas.

EXPERIMENTO 4: Após o término da tarefa espacial, todos animais foram perfundidos e o tecido cerebral foi submetido a processamentos histológicos. As análises histológicas foram realizadas para avaliar a neosinaptogênese e a lesão celular no hipocampo em todos os grupos do estudo (Figura 7).

3.3 CIRURGIA PARA O IMPLANTE DOS ELETRODOS

Os animais com aproximadamente oito semanas de idade foram anestesiados com uma solução de cloridrato de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (ip.). Após atingirem o plano anestésico, o pelo da região craniana foi aparado e as cabeças fixadas ao aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, US). A seguir, foi realizada a assepsia da região craniana com álcool 70°GL (Gay Lussac) seguida de iodopovidona tópica e os planos cirúrgicos foram anestesiados através da administração local de lidocaína 2% (anestesia tópica contendo norepinefrina). A pele, o tecido celular subcutâneo e o periósteo foram, então, divulsionados com auxílio de um bisturi lâmina nº 15 até a exposição das suturas interósseas.

Após a hemostasia, dois pequenos furos (cerca de 1 mm cada) foram realizados na tábua óssea com uma broca odontológica, a fim de que dois eletrodos de aço inoxidável (com cerca de 125 micrômetros de diâmetro) totalmente encapados com verniz, com exceção dos 0,5 mm distais, fossem implantados estereotaxicamente nos alvos. Dois pequenos furos adicionais foram realizados próximos ao lambda para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável, que serviram tanto para fixação do cimento acrílico quanto para o aterramento de dois eletrodos desencapados fixados aos parafusos.

Os eletrodos foram implantados bilateralmente no núcleo anterior do tálamo de acordo com as coordenadas do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1998): 1,5 mm posterior ao bregma, 1,5 mm lateral ao bregma (direita ou esquerda) a uma profundidade de 5,5 mm da superfície cortical (Figura 8).

Uma vez finalizado o implante, os eletrodos foram conectados a um pequeno pedestal de plástico e seguros com auxílio de cimento acrílico. Por fim, foi realizada novamente a assepsia com iodopovidona tópica e, a seguir, foi administrada uma

dose de 0,5 mL/kg, intramuscular (im.), de uma suspensão poli-antibiótica de estreptomicinas e penicilinas (Pentabiótico Veterinário Reforçado *Fort Dodge*) como profilático para um potencial risco de infecção.

Durante o procedimento, o plano anestésico foi checado com frequência e suplementos de quetamina e xilazina foram administrados conforme necessário. Todo o procedimento foi realizado com o uso de luvas, máscara e materiais cirúrgicos lavados com álcool 70°GL.

Após a cirurgia, foi aguardada a recuperação dos animais durante sete a dez dias antes de dar início a indução do SE através do protocolo de administração de pilocarpina.

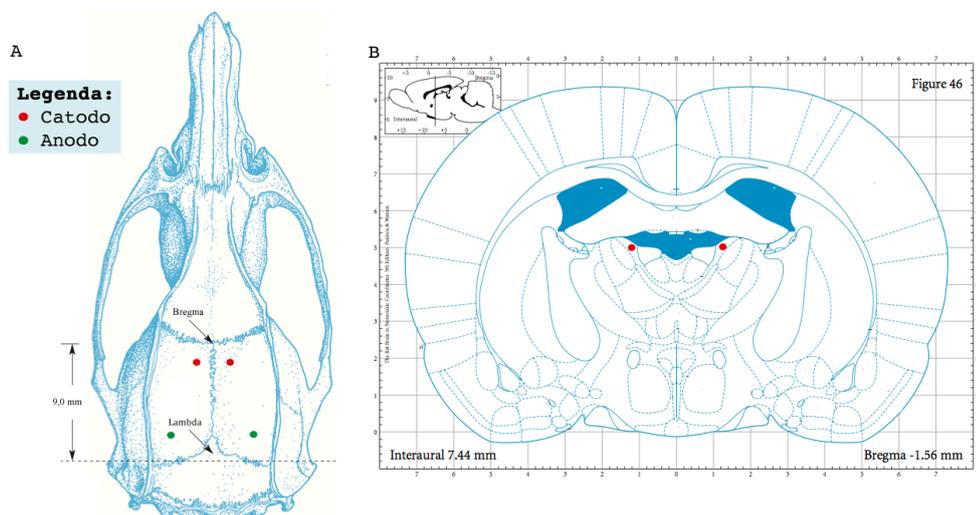


Figura 8: Esquema representativo do local de implante dos eletrodos no núcleo anterior do tálamo de ratos. Em A, a visão superior do crânio de um rato com pontos demonstrando o posicionamento dos eletrodos. Os pontos vermelhos representam os eletrodos de estimulação (polo positivo); os verdes, de referência ou inativos (polo negativo). Em B, um corte coronal do cérebro de um rato mostrando, através dos pontos vermelhos, a localização do núcleo anterior do tálamo (Adaptado de Paxinos e Watson, 1998).

3.4 MODELO DE INDUÇÃO DO ESTADO DE MAL EPILÉPTICO E CRISES EPILÉPTICAS PELA INJEÇÃO DE PILOCARPINA

Os animais receberam uma injeção de metil-escopolamina (10 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção de pilocarpina (320 mg/kg, i.p.). Noventa minutos após o início do SE, os animais receberam uma injeção de tionembutal (30 mg/kg, i.p.). Os animais que não entraram em SE após a administração de pilocarpina receberam

uma segunda dose uma hora após a primeira. Todos os detalhes quanto aos cuidados com os animais, posteriores ao SE propriamente dito, podem ser obtidos em diversos estudos (Covolan, L *et al.*, 2000; Covolan, L. e Mello, L., 2006).

A determinação do SE teve como base a escala proposta por Racine (Racine, 1972). Nesta escala a crise é dividida em 5 estágios:

- Estágio 0** sem mudanças comportamentais;
- Estágio I** movimentos orofaciais ou automatismos de língua, salivação exagerada;
- Estágio II** clonia facial e em todo o corpo;
- Estágio III** mioclonias, movimentos automáticos e repetitivos da cabeça, náuseas, defecação;
- Estágio IV** clonia das patas dianteiras, empinamento do corpo, *wild running* e *wild jumping*;
- Estágio V** clonia das patas dianteiras e convulsões tônico-clônicas generalizadas com perda da postura.

O intervalo de tempo entre a administração sistêmica de pilocarpina e o momento do início do SE (cuja caracterização se dá pela presença ininterrupta, durante 5 minutos, de clonias e automatismos orofaciais) foi aferido e posteriormente comparado entre os grupos com e sem eletrodos.

3.5 ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA

Nesse estudo foram utilizados dois protocolos de ECP, cuja variação foi a corrente utilizada. No grupo EPIDBSa, imediatamente ao início do SE, a estimulação foi iniciada com os parâmetros de 400 μ A de corrente, 90 μ s de duração de pulso e 130 Hz de frequência. Nesse grupo a ECP foi realizada por 6h. No grupo EPIDBSi, os mesmos parâmetros foram usados no dia do SE. Nos dias subsequentes, a estimulação foi intermitente, 6h/dia com os parâmetros de 200 μ A de corrente, 90 μ s de duração de pulso e 130 Hz de frequência. No grupo EPIDBSi, a ECP foi feita por 20 dias.

A escolha deste momento para aplicação da ECP deve-se ao fato dos modelos de indução de crises epiléticas, como o da pilocarpina, apresentarem o conceito de período de latência entre o insulto precipitante inicial e o

desenvolvimento das crises epilépticas crônicas. Assim, existe o conceito clínico de que a epilepsia adquirida, em geral, ocorre muitos meses ou anos após algum tipo de lesão progressiva, tornando-se essencial o desenvolvimento de tratamentos, como o aplicado neste protocolo, para se evitar a epileptogênese (Jefferys, 2010).

3.6 VIDEOMONITORAMENTO DE CRISES COMPORTAMENTAIS

Sete dias após a administração de pilocarpina, os animais foram colocados em uma sala de filmagem em gaiolas individuais e transparentes com livre acesso a água e comida sob as mesmas condições do biotério.

As câmeras de filmagem de alta resolução filmaram a atividade dos animais 24h/dia durante 60 dias e o armazenamento destes dados foi feito em um aparelho Intelbras®. Os *backups* das filmagens foram realizados rotineiramente, a fim de se evitar a perda dos dados.

Essas filmagens foram analisadas com o auxílio do programa Intelbras Media Player® em velocidade variável, conforme a taxa de atividade dos animais e, a partir da análise destas filmagens, foi realizado o levantamento da frequência de crises e do tempo médio de latência para a primeira crise espontânea.

A determinação da ocorrência de CER teve como base a observação dos estágios IV e V da escala de Racine descrita no item 3.4.

O teste estatístico utilizado para analisar a latência para o SE, a primeira crise espontânea e a frequência de CER foi a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste post hoc de Newmann-Keuls. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

3.7 TAREFA COMPORTAMENTAL

3.7.1 Labirinto aquático de Morris

O labirinto aquático de Morris consiste de duas fases: treino (cinco dias consecutivos) e retenção (um dia). Esta tarefa foi realizada aos quatro meses após o SE sempre no período matinal (7-11 h). Nesse experimento foi utilizada uma piscina redonda (180 cm de diâmetro) totalmente pintada de preto e preenchida com cerca

30 cm de água a uma temperatura que variou entre 23 à 26°C, a qual foi trocada diariamente. A piscina foi preenchida com água de maneira a permitir que uma plataforma transparente permanecesse submersa, porém, acessível ao animal (cerca de dois cm abaixo da superfície da água). A área da piscina foi dividida em quadrantes e nela cada animal pode locomover-se livremente durante 60 segundos, com o auxílio de pistas visuais presentes no ambiente, até encontrar a plataforma que permaneceu localizada no centro de um dos quadrantes (Figura 9).

Os animais foram organizados de maneira a permitir que os grupos se intercalassem (por exemplo: Epi > EpiDBSa > EpiDBSi > Controle e, assim, sucessivamente) até que todos animais de todos os grupos completassem a primeira bateria diária. Ao todo foram realizadas quatro baterias/dia por animal. Em cada uma delas o ponto de início foi diferente da anterior e mantido para todos animais. O ponto de início sempre foi referente a um dos pontos cardeais (N – S – L – O) de acordo com a divisão de quadrantes da piscina. Para impedir que o tempo entre os baterias fosse muito grande, permitiu-se que nadassem, no máximo, oito animais a cada semana.

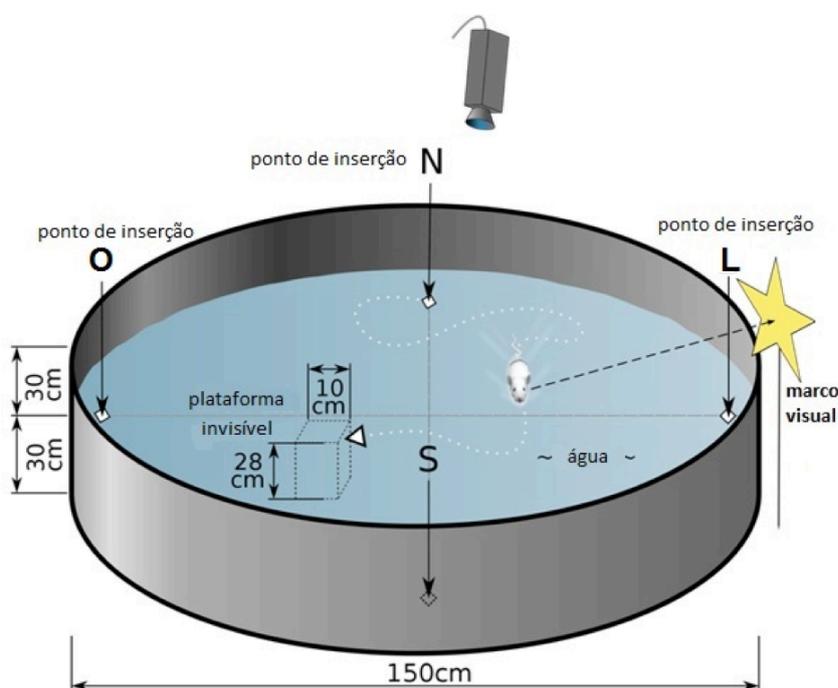


Figura 9: Representação gráfica do labirinto aquático de Morris. Uma piscina foi preenchida com água levemente acima do nível da plataforma. As paredes do local contém pistas visuais que auxiliam o animal na procura da plataforma transparente submersa. Quatro pontos de inserção pré-determinados (N, S, L, O) são utilizados durante os baterias para desafiar a memória do animal (Adaptado de Academic).

Na fase de aquisição, cada animal realizou quatro baterias por dia durante cinco dias consecutivos com um intervalo de, no máximo, 20 minutos entre as baterias. Nesta etapa, o animal foi colocado em um dos pontos de inserção (norte, sul, leste ou oeste) que alternou-se entre os dias e, também, entre as baterias. Em seguida, cada rato teve 60 segundos para localizar a plataforma e, caso não a encontrasse, era guiado até a mesma com o auxílio de uma espátula onde permaneceu por 15 segundos antes de ser retirado da piscina. Os animais que encontraram a plataforma também permaneceram 15 segundos na mesma, mas, se saísse da plataforma antes dos 15 segundos, era novamente guiado até ela para que o tempo na mesma totalizasse 15 segundos.

Na fase de retenção, a plataforma foi retirada da piscina e o animal nadou por 90 segundos para aferir o real aprendizado espacial dos animais: quanto mais preciso o animal for em seu caminho para a plataforma, maior terá sido seu aprendizado.

A iluminação do ambiente permaneceu reduzida durante os testes e o nado dos animais foi registrado e coletado a partir de uma câmera de vídeo afixada no teto conectada a um computador com sistema de análise integrado pelo programa Ethovision (Noldus). Em seguida, foi aplicado o ANOVA de medidas repetidas para analisar os dados.

3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

3.8.1 Coloração de Nissl (Cresil violeta)

Ao final do teste comportamental, todos os animais foram profundamente anestesiados com uretana (1,2 g/kg) e perfundidos por via transcardíaca para fixar o tecido cerebral de modo a permitir a coloração de Nissl e também a de neo-Timm (item 3.8.2). A perfusão foi iniciada com solução salina seguida por 100 mL de Na₂S a 1,15% (m/v) em solução tampão de fosfato a 0,1 M, e 100 mL de formaldeído a 4% (v/v) em solução tamponada de fosfato a 0,1 M. Secções coronais de 30 µm foram cortadas em um criostato e montadas em lâminas revestidas com gelatina, utilizando-se um a cada seis cortes coletados. A seguir, as lâminas foram coradas com a técnica de Nissl para uma análise quantitativa do dano neuronal no hipocampo. O método de Nissl utiliza o cresil violeta - um corante básico utilizado

para evidenciar o citoplasma de neurônios. O citoplasma contém várias estruturas, inclusive os corpúsculos de Nissl, que são corpúsculos compostos basicamente por RNA. Dessa maneira, tal coloração serve como indicador de viabilidade neuronal, pois, quando ocorre a lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer - fenômeno conhecido como cromatólise. Após serem montados em lâminas gelatinadas, os cortes foram hidratados nas seguintes soluções: xilol, álcool 100%, álcool 95%, álcool 70%, álcool 50% e água destilada. Após essa etapa, os cortes foram mergulhados sequencialmente em solução aquosa de violeta de cresil (0,38g de violeta de cresil em 100 mL de água destilada) por cerca 5 minutos, ácido acético 1 M, e então em água destilada. Para a desidratação dos cortes, estes foram mergulhados nas soluções de álcool 50% e 70% e depois no diferenciador (1 mL de ácido acético em 100 mL de álcool 70%). Depois foram passados em soluções crescentes de etanol, no xilol e, em seguida, cobertos com Enthelan®. As imagens dos cortes histológicos corados com cresil violeta foram capturadas por uma câmera digital de alta resolução (Nikon DXM1200) instalada em microscópio Nikon (Eclipse E600FN) e convertidas em sinais digitais transmitidos a um computador. As imagens foram adquiridas com objetiva de 40 vezes e a contagem foi realizada utilizando a ferramenta *cell counter* do *software Image J*. O número de células foi contado nas subregiões hipocâmpais (giro denteado, CA1, CA3 e hilo), bilateralmente e em quadruplicata na extensão rostro-caudal do hipocampo. A área de contagem determinada apresenta duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão). As células que tocaram as linhas proibidas não foram contadas, porém, as células que tocaram as linhas aceitáveis e que se encontraram dentro da área, foram contadas. Cada subregião hipocâmpal foi subdividida em três campos, sendo que o resultado obtido para cada subregião hipocâmpal foi determinado através da média dos valores dos campos. Para a estatística foi aplicado ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Fisher. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

3.8.2 Coloração de neo-Timm

Com secções adjacentes às avaliadas pela técnica de Nissl foram montadas para a análise do brotamento de fibras musgosas pelo método de neo-Timm. Todas

as secções foram desenvolvidas no escuro numa solução contendo: goma arábica a 50% (m/v) (160 mL) a 26°C, citrato de sódio 2M (30 mL), hidroquinona a 5,7% (m/v) (80 mL), e de nitrato de prata a 10% (w/v) (2,5 mL) durante 45 minutos. Posteriormente, as secções foram enxaguadas com água destilada por 10 minutos, desidratadas em etanol e, então, fechadas com Bálsamo do Canadá. As imagens dos cortes histológicos foram captadas por uma câmara digital de alta resolução (Nikon DXM1200) instalada em um microscópio Nikon (Eclipse E600FN) e convertidas em sinais digitais transmitidos a um computador. Estas imagens foram adquiridas com objetiva de 10 vezes e analisadas utilizando o *software Image J*. A análise quantitativa das densidades ópticas em regiões do hipocampo foi realizada a partir de valores expressos na forma de níveis de cinza, tendo como controle o corpo caloso adjacente. Para cada animal foram utilizados três cortes, um em cada nível ao longo da extensão rostro-caudal do hipocampo, e para cada corte realizadas medidas na zona supragranular do giro denteado superior e inferior tanto no hipocampo direito quanto no esquerdo, obtendo-se assim um total de 12 imagens para cada animal. Para os resultados não sofrerem intervenção de fatores externos, a iluminação foi mantida estável durante a aquisição das imagens.

Para a estatística foi aplicado ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Tukey. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 LATÊNCIA PARA O *STATUS EPILEPTICUS*

Através do protocolo de administração sistêmica de pilocarpina foi medido o intervalo de tempo entre a administração e a caracterização do início do SE. Os resultados demonstram que os animais com a presença de eletrodos apresentaram uma latência maior para desenvolver o SE ($102,03 \pm 17,22$ minutos) quando comparados aos animais sem implante ($34,87 \pm 4,39$ minutos; $p=0,00$)

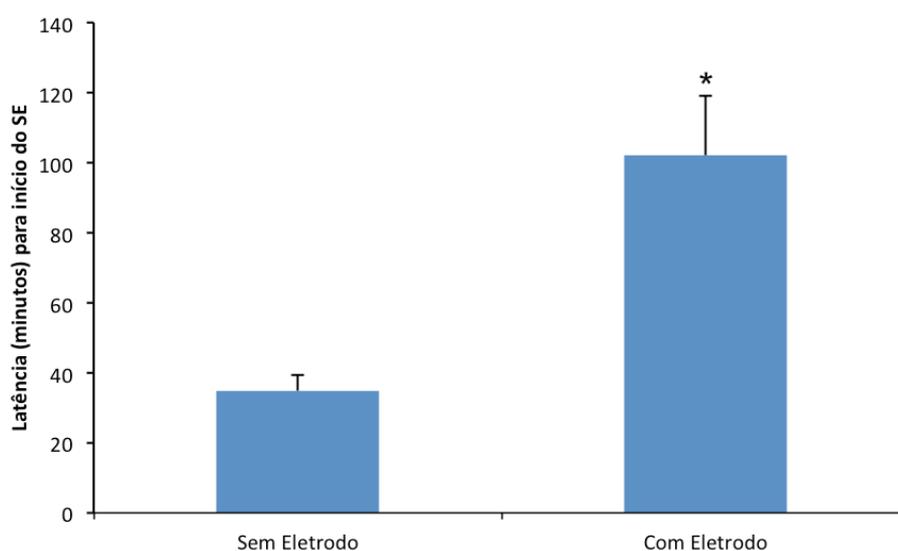


Figura 10: Latência para o *status epilepticus*. Os animais com eletrodos ($n=23$) apresentam maior latência para o início do SE que os animais sem eletrodos ($n=11$). Dados expressos como média mais ou menos SE. * $p<0,05$,

4.2 ANÁLISE DO VIDEOMONITORAMENTO DIÁRIO

4.2.1 Latência para a primeira crise espontânea

A análise do videomonitoramento demonstrou que não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F_{[2,60]}=0,76$; $p=0,46$) para a latência para a primeira crise espontânea (EpiDBSa = $26,11 \pm 3,04$ dias; EpiDBSi = $21,35 \pm 3,14$ dias e Epi = $21,80 \pm 2,32$ dias),

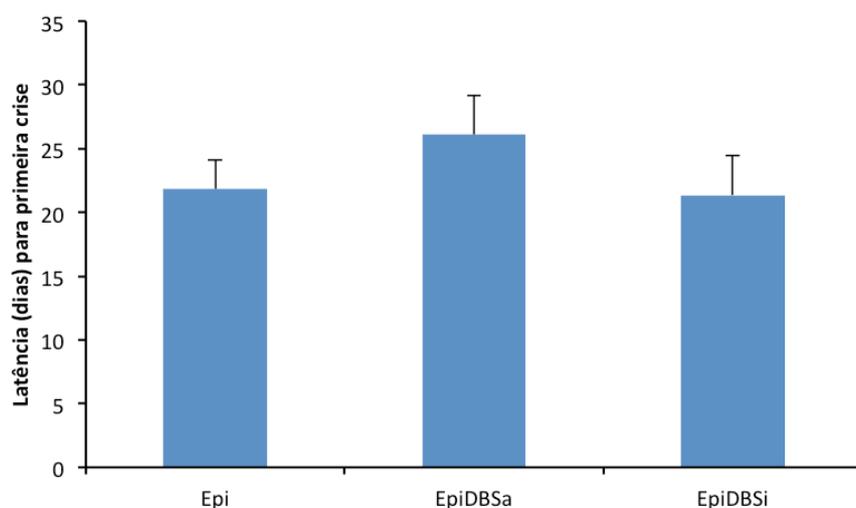


Figura 11: Latência para a primeira crise espontânea. Ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p=0,46$). Grupos Epi: epilético controle ($n=10$), EpiDBSa: epilético com ECP aguda de 6h ($n=11$), EpiDBSi: epilético com ECP intermitente de 6h/dia ($n=12$).

4.2.2 Número de crises espontâneas recorrentes

Na análise das crises comportamentais, também observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F_{[2,45]}=2,19$; $p=0,12$) em relação à frequência de CER, ou seja, o tratamento não promoveu a diminuição do número de CER no período de dois meses. Desta maneira, comparando cada grupo individualmente na análise semanal de CER, a média de crises epiléticas ao dia nos grupos EpiDBSa e EpiDBSi ($0,34 \pm 0,07$ CER/dia e $0,50 \pm 0,07$ CER/dia, respectivamente) se mostra semelhante ao grupo Epi ($0,29 \pm 0,06$ CER/dia, $p=0,12$). No entanto, na figura 12 observa-se que, no grupo Epi, ocorre um aumento progressivo seguido de uma diminuição no número de crises comportamentais, enquanto que nos grupos EpiDBSa e EpiDBSi o padrão de CER aumenta ao longo das semanas após o período de estimulação. Portanto, embora o tratamento não tenha promovido a diminuição no número de CER totais no período de dois meses, a ECP foi capaz de alterar o padrão das crises comportamentais.

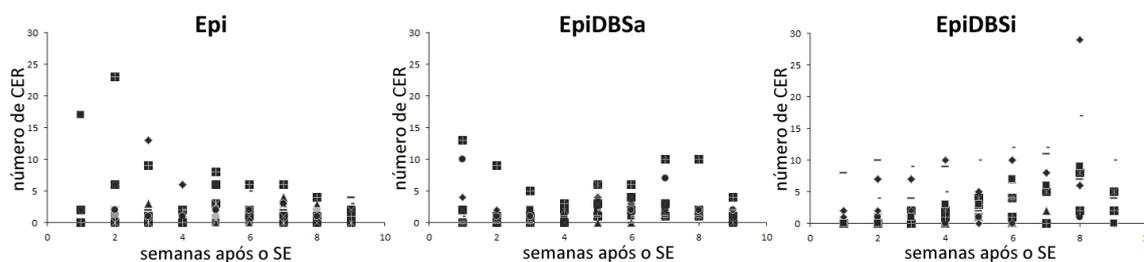


Figura 12: Frequência de crises espontâneas recorrentes. Representação gráfica da distribuição semanal das crises comportamentais entre os grupos estudados. Não há diferença estatisticamente significante entre os grupos Epi ($n=10$), EpiDBSa ($n=11$) e EpiDBSi ($n=12$; $p=0,10$). Observa-se uma alteração no padrão de distribuição das crises comportamentais, sendo que há uma tendência ao aumento das crises ao redor da sétima e oitava semanas nos grupos EpiDBSa e EpiDBSi. Cada símbolo representa um animal avaliado.

4.3 DESEMPENHO DE RATOS CONTROLES E/OU EPILÉPTICOS NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

No labirinto aquático de Morris, a ANOVA de medidas repetidas indica que todos os grupos experimentais aprenderam a tarefa espacial, ou seja, todos reduziram a latência para encontrar a plataforma submersa (Grupos: $F_{[3,178]}=14,77$; $p=0,00$) ao longo dos cinco dias da fase de aquisição ou aprendizagem (Dias: $F_{[4,712]}=41,87$; $p=0,00$). Foi também indicada a interação entre os fatores “grupos” e “dias” ($F_{[12,712]}=7,80$; $p=0,00$).

Comparando cada grupo individualmente, observa-se que a latência do quinto dia dos grupos Epi, EpiDBSa e EpiDBSi ($48,77 \pm 2,46$ segundos, $48,79 \pm 2,85$ segundos e $45,28 \pm 2,73$ segundos, respectivamente) é semelhante ao grupo Controle ($15,37 \pm 2,22$ segundos, $p=0,00$). Isso demonstra que todos, embora tenham aprendido, levaram mais tempo para concluir a tarefa (Figura13A).

Quando comparados ao Controle, os três grupos experimentais – Epi, EpiDBSa e EpiDBSi – percorreram uma distância maior para realizar a tarefa ($F_{[3,180]}=122,08$; $p=0,00$) ao longo dos cinco dias da fase de aquisição ($F_{[4,720]}=21,99$; $p=0,00$). A análise entre os fatores mencionados também demonstra diferença estatisticamente significante entre os grupos ($F_{[12,720]}=7,08$; $p=0,00$). Essa elevada distância nos grupos Epi ($1269,16 \pm 82,55$ centímetros), EpiDBSa ($1485,04 \pm 71,49$ centímetros) e EpiDBSi ($1555,27 \pm 78,32$ centímetros) persistiu mesmo no quinto dia do experimento (Controle: $369,00 \pm 63,94$ centímetros; $p=0,00$). No entanto, o grupo

EpiDBSa conseguiu reduzir a distância percorrida entre o primeiro e o quinto dia da fase de treinamento ($p=0,02$) (Figura 13B). Não há diferença estatisticamente significativa no quinto dia entre os grupos experimentais, tendo estes percorrido distâncias similares no último dia da fase de treinamento.

A ANOVA de medidas repetidas também demonstra que a velocidade, medida em centímetros por segundo, foi maior entre os epiléticos (Grupos: $F_{[3,180]}=78,00$; $p=0,00$) na fase de aquisição (Dias: $F_{[4,720]}=12,01$; $p=0,00$), dada a interação entre “grupos” e “dias” ($F_{[12,720]}=4,06$; $p=0,00$) (Figura 13C). O grupo Controle manteve uma velocidade média quase que constante entre o primeiro ($23,44 \pm 0,58$ cm/s) e o quinto dia ($21,64 \pm 0,77$ cm/s), enquanto os grupos Epi, EpiDBSa e EpiDBSi apresentaram um aumento progressivo da velocidade entre o primeiro ($24,58 \pm 0,76$ cm/s, $26,46 \pm 0,65$ cm/s e $24,85 \pm 0,72$ cm/s, respectivamente) e o quinto dia ($28,37 \pm 1,00$ cm/s, $31,10 \pm 0,86$ cm/s e $27,80 \pm 0,95$ cm/s, respectivamente; $p=0,00$).

Na figura 13D, o teste de Newmann-Keuls revela que, na fase de retenção do sexto dia, o tempo de permanência no quadrante alvo é estatisticamente significativo apenas entre os grupos Controle e Epi ($26,51 \pm 2,29$ segundos e $14,47 \pm 3,13$ segundos, respectivamente; $p=0,02$), tendo estes grupos permanecido cerca de 42% e 24% dos 60 segundos disponíveis no quadrante alvo, respectivamente. Já os grupos EpiDBSa ($18,34 \pm 2,95$ segundos) e EpiDBSi ($17,39 \pm 2,95$ segundos) permaneceram cerca de 30% e 29%, respectivamente.

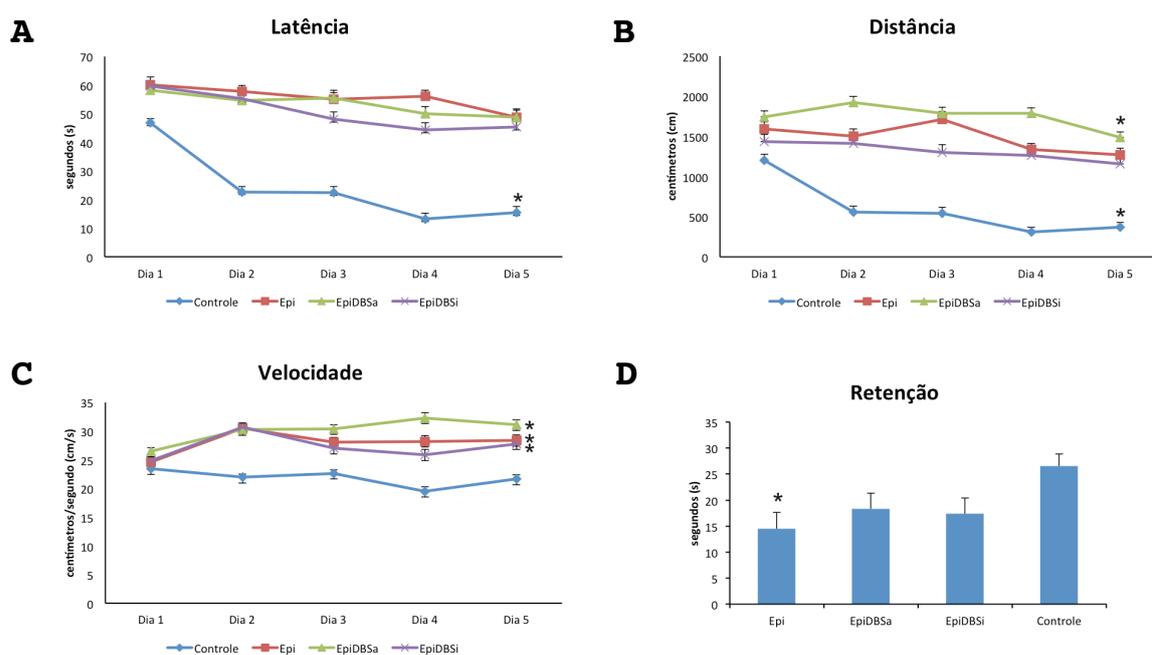


Figura 13: Desempenho na fase de aquisição e retenção. As representações gráficas em A (latência), B (distância) e C (velocidade) indicam o desempenho dos animais durante os cinco dias de aquisição; a representação em D, o desempenho de retenção. Em A, o diagrama demonstra que todos os animais aprenderam a tarefa, apesar do grupo Controle ter apresentado uma latência menor que os grupos experimentais. Em B, observa-se a que os grupos Epi, EpiDBSa e EpiDBSi percorrem uma distância maior para cumprir a tarefa, embora o grupo EpiDBSa tenha conseguido reduzir a distância entre o primeiro e o quinto dia da fase de treinamento. Em C, o diagrama demonstra que a velocidade média estabelecida até encontrar a plataforma submersa aumentou progressivamente entre o primeiro e o quinto dia nos grupos experimentais enquanto esta se manteve constante no grupo Controle. Em D, todos os animais permaneceram tempos semelhantes no quadrante alvo (pelo menos, 29 %), com exceção do grupo Epi que permaneceu apenas 24% do tempo no quadrante alvo. Grupos Epi (vermelho; n=8); EpiDBSa (verde; n=9); EpiDBSi (roxo; n=10) e Controle (azul; n=7) (* $p < 0,05$).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA CONTAGEM CELULAR E DA REORGANIZAÇÃO SINÁPTICA

4.4.1 Nissl

A contagem celular dos setores CA1 e CA3 do hipocampo, do hilo e da camada granular foi realizada após protocolo de coloração de Nissl em cortes de ratos Epi, EpiDBSa, EpiDBSi e Controle. A análise detalhada revelou que, após a estimulação, o número de células do setor CA1 do hipocampo é menor no grupo Epi

($2086 \pm 49,57$ células/mm²) quando comparado ao grupo EpiDBSa ($2653 \pm 89,14$ células/mm²; $p=0,01$). Já os grupos EpiDBSi e Controle apresentaram, em média, $2308 \pm 240,25$ células/mm² e $2511 \pm 123,86$ células/mm², respectivamente. Quatro meses após o SE, o número de células da sub-região CA3 do hipocampo também foi similar entre os grupos experimentais ($1439 \pm 67,70$ células/mm², $1661 \pm 91,24$ células/mm², $1667 \pm 120,52$ células/mm² para os grupos Epi, EpiDBSa e EpiDBSi, respectivamente) quando comparados ao grupo Controle ($1476 \pm 88,50$ células/mm²). No giro denteado, o grupo EpiDBSi ($6655 \pm 421,76$ células/mm²) apresentou mais células quando comparado aos grupos Controle ($5490 \pm 296,45$ células/mm²; $p=0,02$) e Epi ($5397 \pm 189,95$ células/mm²; $p=0,01$), mas o mesmo número de células em relação aos ratos EpiDBSa ($6358 \pm 331,40$ células/mm²). No hilo, houve uma morte estatisticamente significativa de interneurônios no grupo Epi ($949,074 \pm 32,00$ células/mm²) comparado ao grupo Controle ($1840 \pm 135,78$ células/mm²; $p=0,00$). No entanto, a perda celular no hilo do grupo EpiDBSi ($1939 \pm 275,77$ células/mm²) foi menos intensa quando comparada ao grupo Epi ($p=0,00$) e EpiDBSa ($1339 \pm 143,17$ células/mm²; $p=0,02$).

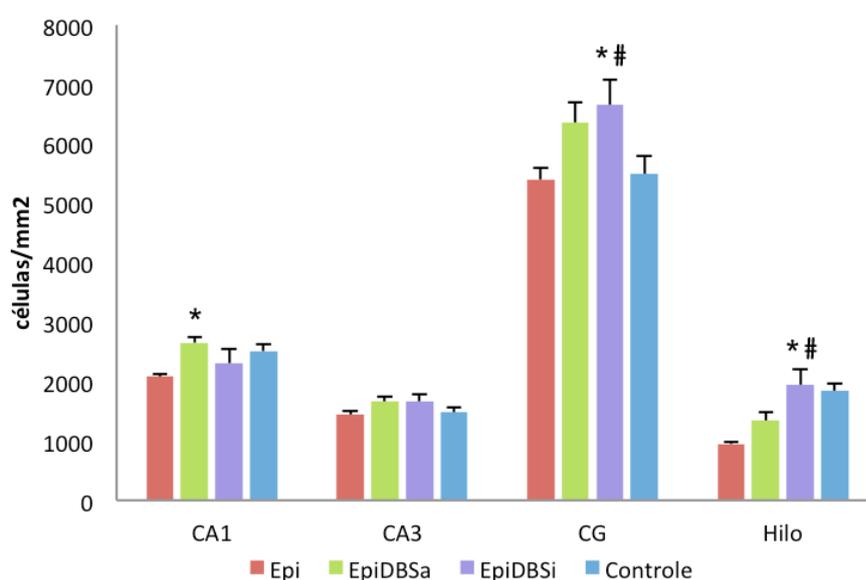


Figura 14: Número de células por mm² nos setores CA1 e CA3 e no giro denteado. No CA1, os ratos EpiDBSa apresentaram maior número de células quando comparados aos ratos Epi (* $p<0,05$). O número de células do setor CA3 foi semelhante entre todos os grupos. O grupo EpiDBSi apresentou mais células granulares no giro denteado quando comparado ao grupo Epi (* $p<0,05$) e ao grupo Controle (# $p<0,05$). O grupo EpiDBSi apresentou um número maior de células no hilo quando comparado aos grupos Epi (* $p<0,05$) e ao grupo EpiDBSa (# $p<0,05$). Houve perda celular no hilo no grupo Epi comparado ao Controle (* $p<0,05$). N=5 para todos os grupos.

4.4.2 neo-Timm

O brotamento de fibras musgosas não mostrou diferença estatística entre os grupos EPI, EpiDBSa e EpiDBSi onde o padrão e a intensidade da marcação se mostraram muito semelhantes e claramente observáveis ($70,03 \pm 14,94$; $73,35 \pm 6,39$; $58,14 \pm 12,76$, respectivamente), mas diferente do grupo Controle ($11,56 \pm 2,22$; $p < 0,05$).

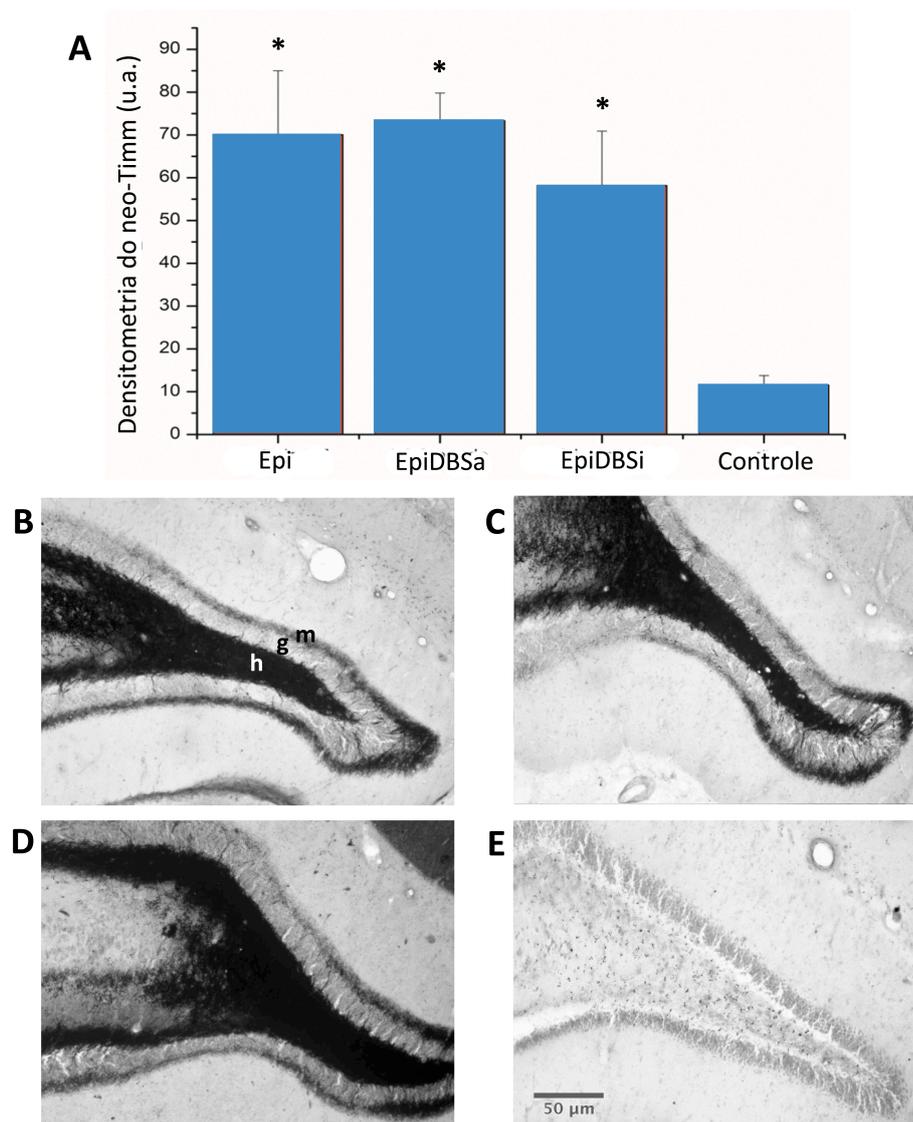


Figura 15: Representação gráfica em unidades arbitrárias da análise do brotamento de fibras musgosas por densitometria e imagens histológicas representativas do giro dentado corado com a técnica de neo-Timm. Em A, o gráfico demonstrando que o brotamento aberrante na camada molecular do giro dentado é similar entre os grupos Epi (B; n=5), EpiDBSa (C; n=5) e EpiDBSi (D; n=5), mas difere do grupo Controle (E; n=5) ($*p < 0,05$). m: camada molecular interna; g: camada granular; h: hilo.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou analisar o papel da ECP em ratos epiléticos sobre os aspectos comportamentais e cognitivos. Nossos principais achados incluem o aumento da latência para o SE bem como a mudança no padrão de distribuição de frequência de CER que é dependente do momento de estimulação. No labirinto aquático foi demonstrado que todos os animais aprenderam a tarefa, embora os animais epiléticos, com ou sem estimulação, tenham demorado mais tempo para realizá-la. Já os achados histológicos incluem maior número de células granulares e a maior sobrevida de células hilares nos ratos submetidos ao tratamento intermitente (EpiDBSi) bem como das células piramidais do setor CA1 do hipocampo no grupo EpiDBSa. Os dados aqui apresentados reforçam a ideia de que a ECP no NAT possui um papel neuroprotetor sobre as células hipocámpais quando administrada aguda e intermitentemente durante a fase silente e que a ECP é capaz de modular as crises comportamentais.

Uma das observações realizadas ao longo do experimento foi o tempo de indução do SE, utilizando o protocolo de administração sistêmica de pilocarpina, uma semana após a cirurgia de implante de eletrodos no NAT. Na maioria dos casos, os ratos operados não entraram em SE na primeira indução; sendo necessária, portanto, a utilização de doses suplementares de pilocarpina a cada hora, o que, em alguns casos, chegou a 100% da dose inicial para se obter sucesso. Não acreditamos que haja maiores problemas em tentativas de indução posteriores, uma vez que não foram encontrados déficits significativos em um outro estudo com animais tratados com pilocarpina e que não entraram em SE (Pearson *et al.*, 2014), o que sugere um papel do SE como evento precipitante essencial para as características fisiopatológicas nesse modelo de TLE. Ademais, os animais com implante de eletrodos bilateralmente no NAT (EpiDBSa e EpiDBSi) demoraram três vezes mais para desenvolverem o SE que os sem implante (Epi). A ketamina, utilizada no presente estudo para a anestesia do animal, possui um efeito neuroprotetor sobre as células hipocámpais quando administrada após o SE (Cunha *et al.*, 2009). Desta forma, pode ter sido essa a razão pela qual os animais que passaram pela cirurgia para implante dos eletrodos tenham apresentado uma maior latência para início do SE. No entanto, não houve menção de qualquer semelhante natureza em modelo de indução intra-hipocámpal (Shi *et al.*, 2015).

Estudos clínicos (Hodaie *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2007; Osorio *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Salanova *et al.*, 2015) e com modelos experimentais (Covolan *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2016) de ELT demonstraram que a ECP do NAT promove a redução do número de CER à médio e à longo prazo. Como mencionado anteriormente, um dos objetivos do estudo foi averiguar se a ECP do NAT poderia aumentar a latência para primeira crise espontânea e reduzir a susceptibilidade para o desenvolvimento de novos eventos ictais após o surgimento da primeira crise, ou seja, se haveria uma redução da taxa de CER após estimulação durante e/ou após o SE. No presente estudo, nem o tratamento agudo nem o tratamento intermitente (EpiDBSa e EpiDBSi, respectivamente) foram capazes de modular o processo de epileptogênese visto que todos os grupos apresentaram latência para a primeira crise espontânea similares. Além disso, ambos os tratamentos também não reduziram a frequência de crises como já observado em modelos de ácido caínico com macacos *rhesus* (Shi *et al.*, 2015) e com ratos (Meng *et al.*, 2016), embora estes dois estudos tenham avaliado os efeitos da ECP em animais submetidos à estimulação pós-SE, mas não durante. Apesar disso, a ECP do NAT promoveu, no entanto, uma alteração no padrão de crises comportamentais tanto nos ratos EpiDBSa quanto nos ratos EpiDBSi, retardando o pico de crises da quinta para a sétima semana em um período de dois meses de videomonitoramento.

O hipocampo é o componente central do circuito de Papez e está intimamente ligado à formação de novas memórias, mas não com o seu armazenamento. A formação de novas memórias, em especial as declarativas, depende de estruturas relacionadas ao LTM. Sendo assim, trabalhos recentes têm demonstrado que a direta ECP dessas estruturas são capazes de influenciar o aprendizado e a formação de novas memórias, sendo utilizada, portanto, para o aumento da função cognitiva (Clark *et al.*, 1999; Hamani *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2012; Fell *et al.*, 2013; Koubeissi *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013). Considerando os distúrbios neurológicos que afetam o LTM como a epilepsia, tais efeitos positivos têm sido evidenciados após a estimulação do córtex entorrinal durante a fase de aquisição em tarefas espaciais tanto em humanos (Suthana *et al.*, 2012) quanto em camundongos (Stone *et al.*, 2011). Desta maneira, com base em evidências da melhora da memória espacial em roedores tratados com costicosterona submetidos à ECP do NAT quatro semanas antes da execução da tarefa (Hamani *et al.*, 2011) e na evidência de que

não há declínio significativo da cognição em pacientes epiléticos continuamente estimulados no NAT (Oh *et al.*, 2012), um outro objetivo deste trabalho consistiu em investigar se a ECP, quando administrada de forma aguda ou intermitente até 16 semanas anteriores à tarefa, seria capaz de reverter os déficits de memória espacial bastante conhecidos no modelo da pilocarpina (Cavarsan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Pearson *et al.*, 2014)

A análise dos dados demonstra que, independentemente do grupo, todos os animais aprenderam a tarefa no labirinto aquático de Morris. No entanto, a curva de aprendizagem dos ratos epiléticos apresenta-se menor que a do grupo Controle, confirmando dados prévios do nosso grupo (Cavarsan *et al.*, 2013). Assim, a ECP tanto no grupo EpiDBSa quanto no EpiDBSi não foi capaz de reverter os déficits observados nos animais epiléticos crônicos não tratados (grupo Epi). Essa interpretação dos dados difere da linha de pensamento da maioria dos autores, os quais acreditam que os animais são virtualmente incapazes aprender a tarefa (Zhou *et al.*, 2007; Inostroza *et al.*, 2011). Quando comparados ao desempenho do modelo do ácido caínico (Pearson *et al.*, 2014), os nossos dados indicam o desempenho igualmente baixo, porém similar. No estudo de Pearson e colaboradores, os animais dispuseram de 150 segundos para realizar a tarefa, enquanto o nosso utilizou apenas 60 segundos. Assim, talvez, se o tempo para a realização da tarefa fosse maior, poderia haver diferenças mais significativas, uma vez que os animais sabidamente apresentam déficits no desempenho do labirinto. Com base nos resultados positivos obtidos na análise histopatológica pelo método de Nissl, no entanto, a ECP não conseguiu reverter o declínio cognitivo.

A escolha do tempo de estimulação de 20 dias se deve aos resultados prévios obtidos pelo nosso grupo, que demonstram que 20 dias é o tempo médio que um animal epilético normal demora para apresentar sua primeira crise espontânea. Já a escolha da corrente mista foi utilizada com base em duas evidências: 1) Em 2010, demonstramos que a administração de ECP utilizando uma corrente relativamente alta (500 μ A) prejudica a memória em ratos através da inibição da atividade espontânea de populações de neurônios locais e da diminuição da taxa de disparo de células do giro denteado (Hamani *et al.*, 2010); 2) Em 2015, demonstramos que a estimulação com uma corrente de 500 μ A tem um efeito antiapoptótico quando administrado durante o SE (Amorim *et al.*, 2015). Com base nisso, quisemos investigar que impacto o tratamento teria sobre a memória caso

utilizássemos uma corrente mais alta durante o SE (afim de minimizar a morte celular) seguida de um período de corrente mais baixa durante o período silente do animal, visto que altas correntes (500 μ A) causam um efeito pró-convulsivante enquanto correntes mais baixas (100 μ A) tem um efeito oposto em ratos epiléticos crônicos (Covolan *et al.*, 2014). No entanto, tal efeito pró-convulsivante não foi observado em um outro estudo que, uma semana após a indução com ácido caínico, administrou a ECP do NAT durante dois meses sob os parâmetros 500 μ A, 130 Hz e 60 μ s (Meng *et al.*, 2016).

A apoptose contribui para a perda neuronal em pacientes com ELT (Xu *et al.*, 2007), assim como no modelo da pilocarpina (Covolan, L., Smith, R. L., *et al.*, 2000). No modelo da pilocarpina (Covolan e Mello, 2000; Covolan, L., Ribeiro, L. T., *et al.*, 2000; Covolan, L. e Mello, L. E., 2006) bem como outros modelos experimentais de roedores (Benzon *et al.*, 1997; Meng *et al.*, 2016) e primatas não-humanos ((Perez-Mendes *et al.*, 2011)) a perda celular maciça se dá na fase aguda do modelo, ou seja, está diretamente relacionada ao SE. Em um estudo recente do nosso grupo fomos capazes de demonstrar que a ECP do NAT, nos mesmos parâmetros aqui utilizados no grupo EpiDBSa, resultou em uma redução da atividade da enzima caspase-3, efetora da apoptose, no hipocampo. (Amorim *et al.*, 2015). Baseado nesse resultado prévio, hipotetizamos que o uso da ECP tanto na fase aguda (Grupo EpiDBSa) e sua continuidade ao longo da fase silente (Grupo EpiDBSi) resultaria em redução da lesão celular no hipocampo. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram, ECP do NAT diminuiu a perda celular no hilo (Grupo EpiDBSi) e na sub-região CA1 do hipocampo (Grupo EpiDBSa). Além disso, nossos resultados indicam um maior número de células na camada granular do giro denteado destes animais. Assim, os dados aqui apresentados confirmam e reforçam o efeito neuroprotetor da ECP no NAT sobre populações de células hipocâmpais na fase aguda e silenciosa do modelo da pilocarpina. Nossos dados são também consistentes com achados da fase crônica em modelo de ácido caínico, onde os efeitos neuroprotetores relacionadas à ECP crônica do NAT se devem, provavelmente, à diminuição dos processos apoptóticos (Meng *et al.*, 2016).

Além da redução dos processos apoptóticos, o maior número de células granulares também pode ser explicado pela neurogênese associada à ECP de estruturas límbicas. Em roedores adultos experimentalmente tratados com corticosterona, a ECP de alta frequência do NAT promoveu a reversão da redução

da proliferação na camada granular do giro denteado (Toda *et al.*, 2008) e a melhora em tarefas que testam a memória (Hamani *et al.*, 2011). Em um outro estudo também com roedores a ECP do córtex entorrinal promoveu a proliferação, sobrevivência e maturação das células granulares do giro denteado (Stone *et al.*, 2011).

Nos modelos epilépticos, tal neuroproteção na fase aguda poderia indicar uma melhor resolução da fase silente, ou seja, que resultaria em redução das reorganizações sinápticas características desse período (isto é, o brotamento das fibras musgosas) e aumento da latência para a primeira crise espontânea. No entanto, isso não foi encontrado. Os resultados aqui apresentados indicam que o brotamento das fibras musgosas é similar entre todos os grupos de animais epilépticos. Portanto, nem a ECP aguda nem a intermitente foram capazes de modular os mecanismos subjacentes à formação de um circuito excitatório aberrante quando administradas a partir da caracterização do SE.

5.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Além do grande espaço de tempo entre a administração de pilocarpina e a caracterização do início do SE discutida acima, o tempo de estimulação dos animais componentes do grupo intermitente foi um outro fator limitante. Não obtivemos aprovação do comitê de ética para estimular os animais durante 24h, embora este seja um tratamento inócuo. Sendo assim, os animais apenas puderam ser submetidos à, no máximo, seis horas de estimulação diárias. Dentre os 13 animais, apenas 4 conseguiram permanecer com o capacete durante 20 dias propostos no desenho experimental inicial (17 dias (n=1); 15 dias (n=1); 14 dias (n=1); 13 dias (n=1); 11 dias (n=1); 10 dias (n=1); 9 dias (n=2) e 6 dias (n=1)), de maneira que a média de estimulação se deu por 14,1 dias. Nosso atual sistema de estimulação se dá por cabos conectados, durante todo o processo, à estimuladores portáteis cujo cabeamento se demonstra problemático, uma vez que acabam por limitar a mobilidade dos animais quando se enrolam. Esse processo gera grande estresse e, como consequência, os eletrodos acabam por cair devido à um tracionamento prolongado que pode estar associado ou não à um processo inflamatório local. Por outro lado, desconectar e reconectar os cabos diariamente também pode ser um

fator igualmente estressante para estes animais. No entanto, mesmo com o tratamento intermitente, obtivemos resultados positivos.

6 CONCLUSÕES

Em resumo, o presente estudo utilizou a ECP em ratos epiléticos induzidos pela administração sistêmica de pilocarpina para avaliar seus possíveis efeitos sobre a taxa de CER, a memória espacial e as alterações celulares. As principais conclusões são: (1) os animais com eletrodos apresentam uma latência maior para o início do SE; (2) a ECP aguda e a intermitente do NAT não promoveram a diminuição das CER e nem aumento da latência para a primeira crise espontânea; (3) a ECP promoveu a alteração do padrão de distribuição das CER, prolongando o pico de CER da quinta para a sétima semana; (4) a ECP, quando administrada agudamente e durante o período silente, possui um papel neuroprotetor sobre as células hipocâmpais; (4) a ECP do NAT não diminuiu o brotamento de fibras musgosas no giro denteado desses animais; (5) a ECP do NAT não impediu o declínio cognitivo nos animais epiléticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACADEMIC. Disponível em <<http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/11766853>> Acesso em: 16 de junho de 2016

AMORIM, B. O.; COVOLAN, L.; FERREIRA, E. *et al.* Deep brain stimulation induces antiapoptotic and anti-inflammatory effects in epileptic rats. **J Neuroinflammation**, v. 12, p. 162, 2015.

ARIDA, R. M.; SCORZA, F. A.; PERES, C. A. *et al.* The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 34, n. 2-3, p. 99-107, Apr 1999.

BENGZON, J.; KOKAIA, Z.; ELMER, E. *et al.* Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 19, p. 10432-7, Sep 16 1997.

BERG, A. T.; BERKOVIC, S. F.; BRODIE, M. J. *et al.* Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010.

BERG, A. T.; SCHEFFER, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1058-62, Jun 2011.

BERNARD, C. Alterations in synaptic function in epilepsy. In: NOEBELS, J. L.; AVOLI, M., *et al* (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. Bethesda (MD), 2012.

BITTENCOURT, S.; DUBIELA, F. P.; QUEIROZ, C. *et al.* Microinjection of GABAergic agents into the anterior nucleus of the thalamus modulates pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. **Seizure**, v. 19, n. 4, p. 242-6, May 2010.

BUCKMASTER, P. S. Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus. In: NOEBELS, J. L.; AVOLI, M., *et al* (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. Bethesda (MD), 2012.

CAVARSAN, C. F.; QUEIROZ, C. M.; DOS SANTOS, J. G., JR. *et al.* Reduced hippocampal dentate cell proliferation and impaired spatial memory performance in aged-epileptic rats. **Front Neurol**, v. 4, p. 106, 2013.

CENDES, F. Mesial Temporal Lobe Epilepsy Syndrome: An Updated Overview. **J. epilepsy clin. neurophysiol**, v. 11, n. 3, 2005.

CHAUVIÈRE, L.; RAFRAFI, N.; THINUS-BLANC, C. *et al.* Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**, v. 29, n. 17, p. 5402-10, Apr 29 2009.

CHEN, L. L.; FENG, H. F.; MAO, X. X. *et al.* One hour of pilocarpine-induced status epilepticus is sufficient to develop chronic epilepsy in mice, and is associated with mossy fiber sprouting but not neuronal death. **Neurosci Bull**, v. 29, n. 3, p. 295-302, Jun 2013.

CHILD, N. D.; BENARROCH, E. E. Anterior nucleus of the thalamus: functional organization and clinical implications. **Neurology**, v. 81, n. 21, p. 1869-76, Nov 19 2013.

CLARK, K. B.; NARITOKU, D. K.; SMITH, D. C. *et al.* Enhanced recognition memory following vagus nerve stimulation in human subjects. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 1, p. 94-8, Jan 1999.

COVOLAN, L.; DE ALMEIDA, A. C.; AMORIM, B. *et al.* Effects of anterior thalamic nucleus deep brain stimulation in chronic epileptic rats. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e97618, 2014.

COVOLAN, L.; MELLO, L. Assessment of the progressive nature of cell damage in the pilocarpine model of epilepsy. **Braz J Med Biol Res.**, v. 39, p. 915-924, 2006.

COVOLAN, L.; MELLO, L. E. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. **Epilepsy Res**, v. 39, n. 2, p. 133-52, Apr 2000.

_____. Assessment of the progressive nature of cell damage in the pilocarpine model of epilepsy. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 7, p. 915-24, Jul 2006.

COVOLAN, L.; RIBEIRO, L.; LONGO, B. *et al.* Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. **Hippocampus**, v. 10, p. 169-180, 2000.

COVOLAN, L.; RIBEIRO, L. T.; LONGO, B. M. *et al.* Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. **Hippocampus**, v. 10, n. 2, p. 169-80, 2000.

COVOLAN, L.; SMITH, R. L.; MELLO, L. E. Ultrastructural identification of dentate granule cell death from pilocarpine-induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 41, n. 1, p. 9-21, Aug 2000.

CUNHA, A. O.; MORTARI, M. R.; LIBERATO, J. L. *et al.* Neuroprotective effects of diazepam, carbamazepine, phenytoin and ketamine after pilocarpine-induced status epilepticus. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, n. 6, p. 470-7, Jun 2009.

CURIA, G.; LONGO, D.; BIAGINI, G. *et al.* The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods**, v. 172, n. 2, p. 143-57, Jul 30 2008.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 5, p. 339-50, May 2010.

EPLEPSY DIAGNOSIS. Disponível em: <<https://www.epilepsydiagnosis.org/index.html>> Acesso em: 3 de março de 2016

EPLEPSY FOUNDATION. Disponível em: <<http://www.epilepsy.com/learn/types-epilepsy-syndromes/temporal-lobe-epilepsy>> Acesso em: 25 de março de 2016

FELL, J.; STARESINA, B. P.; DO LAM, A. T. *et al.* Memory modulation by weak synchronous deep brain stimulation: a pilot study. **Brain Stimul**, v. 6, n. 3, p. 270-3, May 2013.

FISHER, R.; SALANOVA, V.; WITT, T. *et al.* Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 899-908, May 2010.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A. *et al.* ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014.

FISHER, R. S.; VAN EMDE BOAS, W.; BLUME, W. *et al.* Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005.

FISHER, R. S.; VELASCO, A. L. Electrical brain stimulation for epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 10, n. 5, p. 261-70, May 2014.

FUJIKAWA, D. G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res**, v. 725, n. 1, p. 11-22, Jun 24 1996.

GRAVES, N. M.; FISHER, R. S. Neurostimulation for epilepsy, including a pilot study of anterior nucleus stimulation. **Clin Neurosurg**, v. 52, p. 127-34, 2005.

HAMANI, C.; DUBIELA, F. P.; SOARES, J. C. *et al.* Anterior thalamus deep brain stimulation at high current impairs memory in rats. **Exp Neurol**, v. 225, n. 1, p. 154-62, Sep 2010.

HAMANI, C.; EWERTON, F. I.; BONILHA, S. M. *et al.* Bilateral anterior thalamic nucleus lesions and high-frequency stimulation are protective against pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. **Neurosurgery**, v. 54, n. 1, p. 191-5; discussion 195-7, Jan 2004.

HAMANI, C.; MCANDREWS, M. P.; COHN, M. *et al.* Memory enhancement induced by hypothalamic/fornix deep brain stimulation. **Ann Neurol**, v. 63, n. 1, p. 119-23, Jan 2008.

HAMANI, C.; STONE, S. S.; GARTEN, A. *et al.* Memory rescue and enhanced neurogenesis following electrical stimulation of the anterior thalamus in rats treated with corticosterone. **Exp Neurol**, v. 232, n. 1, p. 100-4, Nov 2011.

HODAIE, M.; WENBERG, R. A.; DOSTROVSKY, J. O. *et al.* Chronic anterior thalamus stimulation for intractable epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, n. 6, p. 603-8, Jun 2002.

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Disponível em: <<http://www.ilae.org>> Acesso em: 8 de março de 2016

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Disponível em: <<http://www.ilae.org/Visitors/Centre/Organization.cfm>> Acesso em: 8 de março de 2016

INOSTROZA, M.; CID, E.; BROTONS-MAS, J. *et al.* Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22372, 2011.

JEFFERYS, J. G. Advances in understanding basic mechanisms of epilepsy and seizures. **Seizure**, v. 19, n. 10, p. 638-46, Dec 2010.

JOU, S. B.; KAO, I. F.; YI, P. L. *et al.* Electrical stimulation of left anterior thalamic nucleus with high-frequency and low-intensity currents reduces the rate of pilocarpine-induced epilepsy in rats. **Seizure**, v. 22, n. 3, p. 221-9, Apr 2013.

KAHANE, P.; DEPAULIS, A. Deep brain stimulation in epilepsy: what is next? **Curr Opin Neurol**, v. 23, n. 2, p. 177-82, Apr 2010.

KERRIGAN, J. F.; LITT, B.; FISHER, R. S. *et al.* Electrical stimulation of the anterior nucleus of the thalamus for the treatment of intractable epilepsy. **Epilepsia**, v. 45, n. 4, p. 346-54, Apr 2004.

KOUBEISSI, M. Z.; KAHRIMAN, E.; SYED, T. U. *et al.* Low-frequency electrical stimulation of a fiber tract in temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**, v. 74, n. 2, p. 223-31, Aug 2013.

KRINGELBACH, M. L.; JENKINSON, N.; OWEN, S. L. *et al.* Translational principles of deep brain stimulation. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 8, p. 623-35, Aug 2007.

KWAN, P.; BRODIE, M. J. Early identification of refractory epilepsy. **N Engl J Med**, v. 342, n. 5, p. 314-9, Feb 3 2000.

KWAN, P.; SANDER, J. W. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 75, n. 10, p. 1376-81, Oct 2004.

LEE, D. J.; GURKOFF, G. G.; IZADI, A. *et al.* Medial septal nucleus theta frequency deep brain stimulation improves spatial working memory after traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 30, n. 2, p. 131-9, Jan 15 2013.

LEE, K. J.; SHON, Y. M.; CHO, C. B. Long-term outcome of anterior thalamic nucleus stimulation for intractable epilepsy. **Stereotact Funct Neurosurg**, v. 90, n. 6, p. 379-85, 2012.

LEGA, B. C.; HALPERN, C. H.; JAGGI, J. L. *et al.* Deep brain stimulation in the treatment of refractory epilepsy: update on current data and future directions. **Neurobiol Dis**, v. 38, n. 3, p. 354-60, Jun 2010.

LIM, S. N.; LEE, S. T.; TSAI, Y. T. *et al.* Electrical stimulation of the anterior nucleus of the thalamus for intractable epilepsy: a long-term follow-up study. **Epilepsia**, v. 48, n. 2, p. 342-7, Feb 2007.

_____. Long-term anterior thalamus stimulation for intractable epilepsy. **Chang Gung Med J**, v. 31, n. 3, p. 287-96, May-Jun 2008.

LIU, H. G.; YANG, A. C.; MENG, D. W. *et al.* Stimulation of the anterior nucleus of the thalamus induces changes in amino acids in the hippocampi of epileptic rats. **Brain Res**, v. 1477, p. 37-44, Oct 5 2012.

LOTHMAN, E. W.; BERTRAM, E. H., 3RD. Epileptogenic effects of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 34 Suppl 1, p. S59-70, 1993.

LOZANO, A. M.; KOPELL, B. H. Nonpharmacological therapies for neurologic devices. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 3, p. 463-4, Jul 2014.

MAGUIRE, J. Epileptogenesis: More Than Just the Latent Period. **Epilepsy Curr**, v. 16, n. 1, p. 31-3, Jan-Feb 2016.

MELLO, L. E.; CAVALHEIRO, E. A.; TAN, A. M. *et al.* Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, n. 6, p. 985-95, Nov-Dec 1993.

MELLO, L. E.; CAVALHEIRO, E. A.; TAN, A. M. *et al.* Granule cell dispersion in relation to mossy fiber sprouting, hippocampal cell loss, silent period and seizure frequency in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res Suppl**, v. 9, p. 51-9; discussion 59-60, 1992.

MELLO, L. E.; COVOLAN, L. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. **Epilepsy Res**, v. 26, n. 1, p. 123-9, Dec 1996.

MENG, D. W.; LIU, H. G.; YANG, A. C. *et al.* Stimulation of Anterior Thalamic Nuclei Protects Against Seizures and Neuronal Apoptosis in Hippocampal CA3 Region of Kainic Acid-induced Epileptic Rats. **Chin Med J (Engl)**, v. 129, n. 8, p. 960-966, 20th Apr 2016.

MIRSKI, M. A.; FERRENDELLI, J. A. Selective metabolic activation of the mammillary bodies and their connections during ethosuximide-induced suppression of pentylenetetrazol seizures. **Epilepsia**, v. 27, n. 3, p. 194-203, May-Jun 1986.

MIRSKI, M. A.; ROSSELL, L. A.; TERRY, J. B. *et al.* Anticonvulsant effect of anterior thalamic high frequency electrical stimulation in the rat. **Epilepsy Res**, v. 28, n. 2, p. 89-100, Sep 1997.

MOSER, E. I.; ROUDI, Y.; WITTER, M. P. *et al.* Grid cells and cortical representation. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 7, p. 466-81, Jul 2014.

MOTA GOMES, MARLEIDE DA. História da Epilepsia: Um Ponto de Vista Epistemológico. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 12, n. 3 p. 161-167, 2006

NATIONAL PARKINSON FOUNDATION. Disponível em: <http://www.parkinson.org/sites/default/files/Guide_to_DBS_Stimulation_Therapy.pdf> Acesso em: 10 de maio de 2016

OH, Y. S.; KIM, H. J.; LEE, K. J. *et al.* Cognitive improvement after long-term electrical stimulation of bilateral anterior thalamic nucleus in refractory epilepsy patients. **Seizure**, v. 21, n. 3, p. 183-7, Apr 2012.

OSORIO, I.; OVERMAN, J.; GIFTAKIS, J. *et al.* High frequency thalamic stimulation for inoperable mesial temporal epilepsy. **Epilepsia**, v. 48, n. 8, p. 1561-71, Aug 2007.

PARENT, J. M.; YU, T. W.; LEIBOWITZ, R. T. *et al.* Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 17, n. 10, p. 3727-38, May 15 1997.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998.

PEARSON, J. N.; SCHULZ, K. M.; PATEL, M. Specific alterations in the performance of learning and memory tasks in models of chemoconvulsant-induced status epilepticus. **Epilepsy Res**, v. 108, n. 6, p. 1032-40, Aug 2014.

PEREZ-MENDES, P.; BLANCO, M. M.; CALCAGNOTTO, M. E. *et al.* Modeling epileptogenesis and temporal lobe epilepsy in a non-human primate. **Epilepsy Res**, v. 96, n. 1-2, p. 45-57, Sep 2011.

PILITSIS, J. G.; CHU, Y.; KORDOWER, J. *et al.* Postmortem study of deep brain stimulation of the anterior thalamus: case report. **Neurosurgery**, v. 62, n. 2, p. E530-2; discussion E532, Feb 2008.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v. 32, p. 281-294, 1972.

SAILLET, S.; LANGLOIS, M.; FEDDERSEN, B. *et al.* Manipulating the epileptic brain using stimulation: a review of experimental and clinical studies. **Epileptic Disord**, v. 11, n. 2, p. 100-12, Jun 2009.

SALANOVA, V.; WITT, T.; WORTH, R. *et al.* Long-term efficacy and safety of thalamic stimulation for drug-resistant partial epilepsy. **Neurology**, v. 84, n. 10, p. 1017-25, Mar 10 2015.

SANKAR, T.; LIPSMAN, N.; LOZANO, A. M. Deep brain stimulation for disorders of memory and cognition. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 3, p. 527-34, Jul 2014.

SCHEFFER, I. E. B., S. F.; CAPOVILLA, G.; CONNOLLY, M. B.; GUILHOTO, L.; HIRSCH, E.; MOSHE, S. L.; NORDLI, D.; ZHANG, Y.; ZUBERI, S. M. The Organization of the Epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology. 2016.

SCHMIDT, D. Epilepsy: redefining the boundaries. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 1, p. 8-9, Jan 2015.

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the hippocampal formation. **Front Neurol Neurosci**, v. 34, p. 6-17, 2014.

SHI, L.; YANG, A. C.; LI, J. J. *et al.* Favorable modulation in neurotransmitters: effects of chronic anterior thalamic nuclei stimulation observed in epileptic monkeys. **Exp Neurol**, v. 265, p. 94-101, Mar 2015.

STONE, S. S.; TEIXEIRA, C. M.; DEVITO, L. M. *et al.* Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. **J Neurosci**, v. 31, n. 38, p. 13469-84, Sep 21 2011.

SUTHANA, N.; FRIED, I. Deep brain stimulation for enhancement of learning and memory. **Neuroimage**, v. 85 Pt 3, p. 996-1002, Jan 15 2014.

SUTHANA, N.; HANEEF, Z.; STERN, J. *et al.* Memory enhancement and deep-brain stimulation of the entorhinal area. **N Engl J Med**, v. 366, n. 6, p. 502-10, Feb 9 2012.

TAKEBAYASHI, S.; HASHIZUME, K.; TANAKA, T. *et al.* The effect of electrical stimulation and lesioning of the anterior thalamic nucleus on kainic acid-induced focal cortical seizure status in rats. **Epilepsia**, v. 48, n. 2, p. 348-58, Feb 2007.

TATUM, W. O. T. Mesial temporal lobe epilepsy. **J Clin Neurophysiol**, v. 29, n. 5, p. 356-65, Oct 2012.

THOM, M.; MARTINIAN, L.; CATARINO, C. *et al.* Bilateral reorganization of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis: a postmortem study. **Neurology**, v. 73, n. 13, p. 1033-40, Sep 29 2009.

TODA, H.; HAMANI, C.; FAWCETT, A. P. *et al.* The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. **J Neurosurg**, v. 108, n. 1, p. 132-8, Jan 2008.

TRINKA, E.; COCK, H.; HESDORFFER, D. *et al.* A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515-23, Oct 2015.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 315-35, Sep 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>> Acesso em: 25 de fevereiro de 2016

WYCKHUYS, T.; GEERTS, P. J.; RAEDT, R. *et al.* Deep brain stimulation for epilepsy: knowledge gained from experimental animal models. **Acta Neurol Belg**, v. 109, n. 2, p. 63-80, Jun 2009.

XU, S.; PANG, Q.; LIU, Y. *et al.* Neuronal apoptosis in the resected sclerotic hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy. **J Clin Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 835-40, Sep 2007.

YORK, G. K., 3RD; STEINBERG, D. A. Hughlings Jackson's neurological ideas. **Brain**, v. 134, n. Pt 10, p. 3106-13, Oct 2011.

ZHONG, X. L.; LV, K. R.; ZHANG, Q. *et al.* Low-frequency stimulation of bilateral anterior nucleus of thalamus inhibits amygdale-kindled seizures in rats. **Brain Res Bull**, v. 86, n. 5-6, p. 422-7, Nov 25 2011.

ZHOU, J. L.; ZHAO, Q.; HOLMES, G. L. Effect of levetiracetam on visual-spatial memory following status epilepticus. **Epilepsy Res**, v. 73, n. 1, p. 65-74, Jan 2007.