



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NEUROPSIQUIATRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

IGOR TCHAIKOVSKY MELLO DE OLIVEIRA

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA FREQUÊNCIA NO ESTRIADO E
SEU EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO E POTENCIAL
EVOCADO NA VIA ESTRIADO-NIGRAL**

RECIFE, 2017

IGOR TCHAIKOVSKY MELLO DE OLIVEIRA



**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA FREQUÊNCIA NO ESTRIADO E
SEU EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO E POTENCIAL
EVOCADO NA VIA ESTRIADO-NIGRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Profº Drº: Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues
Co-orientador: Profº Drº Pedro Valadão Carelli

RECIFE, 2017

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48e Oliveira, Igor Tchaikovsky Mello de.
Estimulação elétrica de alta frequência no estriado e seu efeito sobre o comportamento e potencial evocado na via estriado-nigral / Igor Tchaikovsky Mello de Oliveira. – 2017.
76 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Epilepsia. 2. Gânglios da base. 3. Plasticidade neuronal. 4. Potenciação de longa duração. I. Rodrigues, Marcelo Cairrão Araújo (Orientador). II. Título.

612.665 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2017-220)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Pró-Reitoria para assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria

PROPESQ
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS
DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



IGOR TCHAIKOVSKY MELLO DE OLIVEIRA

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA FREQUÊNCIA NO ESTRIADO E SEU
EFEITO SOBRE O COMPORTAMENTO E POTENCIAL EVOCADO NA VIA
ESTRIADO-NIGRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Neuropsiquiatria e
Ciências do Comportamento da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em
Neurociências.

Aprovada em: 31/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Profº DrºNivaldo Antonio Portela de Vasconcelos
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª Sandra Lopes de Souza
Universidade Federal de Pernambuco
Presidente da Banca

Profª. Draª Rosana Christine Cavalcanti Ximenes
Universidade Federal de Pernambuco



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemus Teles Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

Sandra Lopes de Souza

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

Everton Botelho Sougey

CORPO DOCENTE PERMENENTE

Amaury Cantilino

Ana Elisa Toscano

Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Claudia Jacques Lagranha

Daniella Araújo de Oliveira

Dayane Aparecida Gomes

Everton Botelho Sougey

Hilton Justino da Silva

João Henrique da Costa Silva

Luciana Patrízia A. de Andrade Valença

Lucio Vilar Rabelo Filho

Luiz Ataíde Junior

Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues

Marcelo Moraes Valença

Murilo Duarte Costa Lima

Ótávio Gomes Lins

Paula Rejane Beserra Diniz

Pedro Augusto Sampaio Rocha Filho

Raul Manhães de Castro

Rhowena Jane Barbosa de Matos

Sandra Lopes de Souza

Silvia Regina Arruda de Moraes

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Daniela Andrade da Cunha

Hildo Rocha Cirne Azevedo Filho

João Ricardo Mendes de Oliveira

Kátia Karina do Monte Silva

Maria Lúcia Gurgel da Costa

Rosana Christine C. Ximenes

A Deus,

*Que nos criou e foi criativo nesta tarefa.
Seu fôlego de vida em mim me foi
sustento e me deu coragem para
questionar realidades e propor sempre
um novo mundo de possibilidades*

*Dedico esta dissertação
às pessoas mais importantes de minha
vida, onde sem elas não conseguiria
alcançar meus objetivos.*

*Aos meus pais,
Erciliane Melo da Silva e Antonio Wellington de Oliveira Lima*

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e a elas devo dar o merecido crédito.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Antonio Wellington e Erciliane Melo e meus irmãos, Lidiane Maria, Ercilia Maria, Kildaire Pereira, Kaiser Pereira pelo apoio, interesse, preocupação e risadas até mesmo nos momentos de dificuldade. Vocês são os responsáveis pelos meus valores e princípios e foram determinantes para a minha caminhada até aqui.

A todos os meus amigos pessoais, que não tenho como citar o nome de todos, já que todos são importantes. Eles se fizeram presente garantindo todo apoio emocional e me incentivando principalmente a ser sempre o melhor que eu posso ser.

Este trabalho não seria possível sem o apoio de meus amigos do Laboratório de Neurofisiologia, Eraldo, Renata Cavalcanti, Thays Kallyne e Gabriel com os quais troquei conhecimentos e tenho certeza que, assim como aprendi um pouco sobre seus trabalhos, saíram desta experiência conhecendo mais sobre eletrofisiologia, epilepsia, sistemas anticonvulsivantes endógenos e plasticidade. Agradeço pelos melhores momentos de risadas, pelos melhores gestos de carinho, pela melhor compreensão e melhor paciência.

A todos os meus professores, desde o jardim de infância até a faculdade. Graças a vocês tive o conhecimento necessário para percorrer cada etapa da vida e chegar onde estou. Cada informação, cada brincadeira, cada sorriso, cada avaliação me ajudou a crescer e me desenvolver e hoje agradeço a vocês.

Aos meus orientadores Profº Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues e ao Profº Dr. Pedro Valadão Carelli por todo o conhecimento compartilhado, pelos puxões de orelha, pelas reuniões que tanto ajudaram, pela paciência, pela dedicação, pela ajuda, por todas as correções e anotações que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho. Sem eles nada disso teria acontecido.

"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, mas sim para sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto." (Tomas Huxley)

RESUMO

Os núcleos da base contêm circuitos neurais que, se manipulados corretamente, desencadeiam reconhecidos efeitos anticonvulsivantes. A desinibição do corpo estriado (ES) quanto a inibição da substância negra reticulada (SNPr), são anticonvulsivantes em modelos animais e compõem os denominados Sistemas anticonvulsivantes endógenos (SAES). Tanto o sistema nervoso central, quanto os SAEs podem ter suas respostas alteradas frente diferentes estímulos, pelo fenômeno de plasticidade. Apesar de ser bem conhecida a possibilidade de indução de plasticidade através de estimulação elétrica de alta frequência e detecção de um potencial evocado num circuito neural, ainda não foi testado o possível efeito da estimulação elétrica de alta frequência no ES sobre a SNPr e sobre o comportamento do animal. Ratos machos adultos Long evans foram randomicamente separados em dois grupos: controle (n=4) e experimental (n=4), e, submetidos a cirurgia para implante de uma matriz de multieletrodos (16 canais) no hipocampo, um tetrodo (4 canais) no ES e um conjunto de eletrodos (8 canais) na SNPr para aquisição do registro de potencial de campo local. Um eletrodo de estímulo foi também implantando na via estriado nigral. Antes de cada protocolo os animais foram filmados em uma arena de acrílico durante 5 min para avaliação de possíveis alterações comportamentais geradas pelo estímulo. Por fim, os dois grupos receberam microinjeção intrahipocampal de pilocarpina para indução de eventos paroxísticos. A eletrofisiologia mostra que, após a aplicação de estímulo no ES, detectamos uma resposta evocada na SNPr. Quantificamos a média de quadrados adentrados ($53,7 \pm 13,5$ e $5,5 \pm 1,8$), elevação ($23,5 \pm 7,6$ e $3,5 \pm 2,4$), sacudidas de corpo e cabeça ($10,6 \pm 3,0$ e zero) e autolimpeza ($4,3 \pm 2,1$ e zero) nos grupos experimental e controle, respectivamente. Os resultados até o presente momento sugerem que a aplicação do estímulo de alta frequência está causando mudanças plásticas no circuito estriado nigral, o que modifica o padrão comportamental de motricidade nos animais. É possível detectar uma resposta evocada no circuito estriado nigral após a aplicação do estímulo. Temos como perspectiva analisar os dados eletrofisiológicos relacionados à microinjeção intrahipocampal de pilocarpina.

Palavras-chave: Epilepsia. Gânglios da base. Plasticidade neuronal. Potenciação de longa duração.

ABSTRACT

The basal ganglia contain neural circuits that, if manipulated correctly, trigger recognized anticonvulsant effects. Inhibition of the striatum (CS) and inhibition of the substantia nigra pars reticulata (SNPr), are anticonvulsants in animal models and make up the so-called Endogenous anticonvulsant mechanisms (EAMs). Both the central nervous system and the EAMs may have their responses altered in front of different stimuli, by the phenomenon of plasticity. Although the possibility of induction of plasticity through high-frequency electrical stimulation and detection of an evoked potential in a neuronal circuit is well known, the possible effect of the high-frequency electrical stimulation in the CS on the SNPr and on the behavior has not yet been tested in the animal. Long Evans male adult rats were randomly divided into two groups: control ($n = 4$) and experimental ($n = 4$), and undergoing surgery to implant a microarray of electrodes (16 channels) in the hippocampus, a tetrode (4 channels) in CS and a set of electrodes (8 channels) in the SNPr for acquisition of the local field potential. A stimulus electrode was implanted in the striatum nigral pathway. Before each protocol, the animals were filmed in an open field for 5 min to evaluate possible behavioral changes generated by the stimulus. Finally, the two groups received intrahippocampal pilocarpine microinjection to induce paroxysmal events. Electrophysiology shows that, after stimulus application in CS, we detected an evoked potential in the SNPr. We quantified the mean of in-squares (53.7 ± 13.5 and 5.5 ± 1.8), elevation (23.5 ± 7.6 and 3.5 ± 2.4), body and head shaking (10.6 ± 3.0 and zero) and self-cleaning (4.3 ± 2.1 and zero) in the experimental and control groups, respectively. The results suggest that the application of the high frequency stimulus is causing plastic changes in the striatum nigral pathway, which modifies the motor behavioral pattern in animals. It is possible to detect an evoked potential in the circuit after the application of the stimulus. We aim to analyze the electrophysiological data related to the intrahippocampal microinjection of pilocarpine.

Keywords: Epilepsy. Basal ganglia. Neural plasticity. Long term potentiation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CA	Corno de Amon
ES	Corpo estriado
DZP	Diazepam
GD	Giro denteado
HIPO	Hipocampo
<i>iPSP</i>	<i>Inhibitory postsynaptic potential</i>
<i>LFP</i>	<i>Local field potential</i>
<i>LTP</i>	<i>Long term potentiation</i>
<i>LTD</i>	<i>Long term depression</i>
NB	Núcleos da base
SAEs	Sistemas anticonvulsivantes endógenos
SNPr	Substância negra, parte reticulada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
3	HIPÓTESE	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	OBJETIVO GERAL	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1	ANIMAIS	29
5.2	CONFEÇÃO DA MATRIZ DE MULTIELETRODOS E ELETRODO DE ESTIMULAÇÃO	29
5.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTE DA MATRIZ DE MULTIELETRODOS	34
5.4	AQUISIÇÃO DO REGISTRO ELÉTRICO DE POTENCIAL DE CAMPO LOCAL	37
5.5	PROTOCOLO PARA GERAÇÃO DE LTP NA VIA ESTRIADO NIGRAL	38
5.6	ALGORITMO PARA ANÁLISE DE POTENCIAL EVOCADO	39
5.7	ANÁLISE COMPORTAMENTAL	41
5.8	EUTANÁSIA E PERFUSÃO	41
5.9	AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS	42
5.10	ANÁLISE EXPERIMENTAIS	42
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6	RESULTADOS	43
6.1	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NO TESTE DE CAMPO ABERTO	43
6.2	QUANTIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DE RESPOSTA DO REGISTRO ELÉTRICO NOS ANIMAIS COM PROTOCOLO DE	45

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA FREQUÊNCIA

7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE A –ARTIGO ORIGINAL	56
		73
	APÊNDICE B – MODELO PARA GERAÇÃO DE CRISES CONVULSIVAS POR PILORCAPINA	
		74
	APÊNDICE C–REGISTRO UNITÁRIO NO HIPOCAMPO	75
	ANEXO A–PARECER COMITÊ DE ÉTICA – CEUA - UFPE	76
	ANEXO B–PATENTE DINE - UFPE	

1 INTRODUÇÃO

Um dos caminhos para compreender e bloquear crises convulsivas, consiste em estudar os mecanismos próprios do sistema nervoso que o protegem contra o hypersincronismo epiléptico.

O conjunto de adaptações metabólica, hemodinâmica, e sináptica com esta finalidade tem sido denominado de *Sistemas Anticonvulsivantes Endógenos* (SAEs). Neste contexto, os núcleos da base contêm circuitos neurais que, se manipulados corretamente, desencadeiam reconhecidos efeitos anticonvulsivantes.

Tanto a desinibição do corpo estriado (ES) quanto a inibição da substância negra reticulada (SNPr), são anticonvulsivantes em modelos animais. Como acontece com todo o sistema nervoso, os SAEs podem ter suas respostas alteradas frente a estímulos endógenos ou externos, pelo fenômeno de plasticidade.

Apesar de ser bem conhecida a possibilidade de indução de plasticidade através de estimulação elétrica de alta frequência por potenciação de longo prazo (*Long term potentiation*, LTP) e detecção de um potencial evocado num circuito neural, e que também a estimulação do circuito estriado nigral bloqueia crises convulsivas, ainda não foi testado o possível efeito da estimulação elétrica de alta frequência no estriado sobre esta via e sobre o comportamento do animal.

No presente trabalho avaliamos se indução de estimulação de alta frequência no circuito estriado nigral causará LTP alterando o comportamento exploratório do animal e se será possível detectar potencial evocado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os processos neurais que nos permitem realizar as tarefas corriqueiras como, por exemplo, lembrar, escrever ou caminhar ocorre graças à atividade elétrica de neurônios, que são conectados entre si e podem mudar sua frequência e sincronismo de disparos de impulsos elétricos em redes oscilantes locais ou distantes. Entretanto, perturbações na conectividade neuronal provocam diversas patologias, como por exemplo, a epilepsia, que é caracterizada por um distúrbio decorrente de sincronismo e oscilações errôneas dos neurônios (HRAMO et al. 2015), sendo uma das patologias neurológicas mais prevalente (SENDROWSKI AND SOBANIEC, 2013) e cerca de 20% de todos os acometidos não respondem corretamente aos tratamentos contemporâneos (KWAN AND BRODIE, 2013; THOMPSON et al, 2015) o que estimula a busca por novas abordagens terapêuticas.

Durante a epilepsia ocorrem alterações crônicas no funcionamento de populações neuronais, que se permanecem e resultam em disparos intensos, sincronizados e rítmicos (SHARMA et al. 2015; KAILA et al. 2014; KAPLAN et al. 2016). É possível que a perda da capacidade endógena de controle dos eventos espontâneos de hiperexcitabilidade e hipersincronismo neuronal (chamada de SAEs, sistemas Anticonvulsivantes Endógenos) (IADAROLA & GALE 1981; RODRIGUES et al. 2005; ROSSETTI et al. 2006; HIRSCH et al. 2006; ENGEL et al 2016; LYUDMILA et al 2017) esteja envolvida.

Estudos vêm apontando a forte influência dos núcleos da base (NB) nos processos epiléticos (ROSSETTI et al. 2006; HIRSCH et al. 2006; CHEN et al. 2014; LYUDMILA et al 2017). Os NBs são compostos pelo corpo estriado (ES), globo pálido (segmentos interno e externo), núcleo subtalâmico e substância negra reticulada (SNPr) e compacta (SNPc). Os NB são fundamentais para a motricidade, auxiliando as áreas corticais no planejamento e escolha do programa motor mais apropriado, através da ativação ou inibição de aferências talâmicas, o que resulta em excitação ou inibição cortical (REDGRAVE 1999; LENT 2001; KANDEL 2003), o que seria, por exemplo, fundamental na tarefa de inibição de crises convulsivas. Mas esta propriedade de “conectar” ou “barrar” certa atividade neural à saída motora pode também estar associado à capacidade atribuída aos NB de bloquear eventos

convulsivos, através dos SAEs (ROSSETTI et al. 2006 HENSHALL et al 2015; LYUDMILA et al 2017).

O sistema nervoso não é estático, mas guarda a capacidade de mudar conforme os estímulos que recebe. Tal capacidade é denominada plasticidade, e nos permite, dentre outros, lembrar de eventos passados graças ao fortalecimento sináptico entre vias neurais muito ativadas (THOENEN et al 1995; KORTE et al. 1996; THOENEN 2000). A técnica experimental para indução de potenciação de longo prazo (LTP) através de estimulação tetânica (por exemplo, 100 Hz) (BLISS E COLLINGRIDGE, 1993; NABAVI et al 2014; ZRENNER et al 2017) causa o fortalecimento de determinados circuitos neurais e geração de plasticidade.

Um dos modos para se bloquear crises convulsivas consiste em alterar seletivamente circuitos neurais, deixando-os mais responsivos e eficazes (BOHME E LUDDENS, 2001; HAN et al 2014). Experimentos com animais de laboratório confirmam esta hipótese, sendo possível abolir crises convulsivas através da manipulação dos NB. Sabe-se que o CE envia projeções inibitórias para a SNPr (ROSSETTI et al. 2007), e essa também inibe o colículo superior e o tálamo anterior (USUI et al. 2005). Logo, a desinibição do CE causa inibição da SNPr, e consequentemente desinibição de suas eferências do tálamo e tectais. Muitos experimentos com resultados anticonvulsivantes foram obtidos com a desinibição do CE (TURSKI et al, 1986; ARAKAKI et al 2016; HU et al 2017), ou com a inibição da SNPr através de compostos agonistas gabaérgicos, barbitúricos e benzodiazepínicos (como o diazepam, DZP) (DALBY. 2000; CHEN et al 2014; HU et al 2015).

Na busca para entender este contexto de bloqueio de crises convulsivas através de plasticidade, os núcleos da base representam estruturas neurais interessantes e ainda pouco exploradas (DERANSART E DEPAULIS, 2002). Tanto a estimulação do corpo estriado (CARVALHEIRO E TURSKI, 1986; HU et al 2017) quanto a inibição da substância negra reticulada (GALE, 1985; HU 2015), são anticonvulsivantes. Isso ressalta a importância do circuito estriado-nigral no controle de crises.

Apesar de ser bem conhecida a possibilidade de induzir plasticidade através de estimulação elétrica de alta frequência e indução de LTP num circuito neural, e também que a estimulação do circuito estriado nigral bloqueia crises convulsivas, ainda não foi testado o possível efeito da estimulação elétrica de alta frequência no estriado sobre esta via e sobre o comportamento do animal.

Nossa hipótese é que a estimulação elétrica de alta frequência no estriado, como a utilizada para a indução de LTP, causará mudanças nos circuitos neurais dos núcleos da base, alterando tanto o comportamento do rato quanto o potencial evocado na via estriado-nigral.

Epilepsia e definição da doença

A epilepsia é considerada uma condição neurológica crônica e compreende um grupo de doenças, cujo ponto em comum são as crises epiléticas, que ocorrem na ausência de doenças tóxico-metabólicas ou febris (GAUSTAUT, 1973; ROGAWISKI e PORTER, 1990). A epilepsia não é uma doença individual, mas a expressão clínica de um grande número de distúrbios decorrentes de atividade elétrica cerebral anormal, excessiva e hiper sincrônica. Tende a se repetir e pode decorrer de múltiplos processos patológicos, em diferentes áreas encefálicas (KAILA et al. 2014; KAPLAN et al. 2016; PEACOCK et al 2017).

A chamada crise epilética é um paroxismo transitório de descarga neuronal cortical capaz de produzir uma manifestação que pode ser percebida pelo paciente ou por um observador. Estas manifestações variam muito de paciente a paciente, refletindo as funções corticais na qual a descarga se originou e para onde se propaga (SANDER E HART, 1999; PEACOCK et al 2017). Como geralmente este trajeto de origem e propagação é o mesmo, as manifestações motoras duram poucos minutos (período ictal) e cedem espontaneamente, seguindo-se de sonolência e confusão mental (período pós-ictal) (SANDER E HART, 1999; SHMUELY et al. 2017).

O distúrbio epilético é frequente e acomete em torno de 5% da população mundial (INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY, 2017). É uma condição crônica recorrente e pode ter importantes repercussões psicossociais. São comuns

os casos de distúrbios de aprendizado, estimando-se que aproximadamente 50% das crianças epiléticas têm alguma dificuldade na escola (SHMUELY et al. 2017).

Ao se pesquisar as causas do distúrbio cognitivo no paciente portador de epilepsia, todos os fatores envolvidos devem sempre ser levados em conta. A doença de base que causa a epilepsia, às crises epiléticas propriamente ditas, ao efeito adverso dos fármacos anti-epiléticos, aos transtornos de humor e de conduta que frequentemente acompanham estes pacientes, além das menores oportunidades de aprendizado muitas vezes oferecidas por professores e pais que criaram falsas expectativas negativas quanto ao desempenho destas crianças (CORNAGGIA E GOBBI, 2001).

Atualmente, estão disponíveis modelos adequados para analisar experimentalmente estas variáveis; um exemplo a ser considerado, é o modelo de epilepsia crônica induzida por pilocarpina em ratos (TURSKI et al, 1983). Este modelo é especialmente importante por reproduzir a epilepsia do lobo temporal, uma das formas mais comuns de síndrome epilética, que compreende cerca de 40% de todos os casos em indivíduos adultos e tende a ser a forma mais frequentemente refratária ao tratamento medicamentoso. Isto implica em tratamento poli medicamentoso ou mesmo cirúrgico, além de tratar-se de uma síndrome epilética onde a memória é a principal função prejudicada (LAW et al 2016, RZEKAK et al 2017).

Apesar de inúmeros estudos sobre os mecanismos fisiopatogênicos relacionados à epilepsia, alguns fatores ainda permanecem obscuros, dentre eles, as alterações cognitivas decorrentes da própria patologia ou influenciadas pelos tratamentos com terapia celular. Assim, justifica-se a necessidade de estudos que analisariam tanto manifestações comportamentais quanto os mecanismos celulares envolvidos nos circuitos epileptogênicos (DASS et al., 2006).

Os núcleos da base e os sistemas anticonvulsivantes endógenos (SAEs)

Núcleos da base (NB) é uma denominação genérica a um conjunto de massa cinzenta subcortical, incluindo o corpo estriado (ES), globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra parte reticulada (SNPr) e compacta. Os NBs são fundamentais para a motricidade, auxiliando as áreas corticais no planejamento e

escolha do programa motor mais apropriado, através da ativação ou inibição de aferências talâmicas, o que resulta em excitação ou inibição cortical (REDGRAVE 1999; LENT 2001; KANDEL 2003). Mas esta propriedade de “conectar” ou “barrar” certa atividade neural à saída motora pode também estar associado à capacidade atribuída a diversas áreas dentro dos NB capazes de bloquear eventos convulsivos, através dos SAEs (REDGRAVE, 1999; ROSSETTI et al. 2006; HENSHALL et al 2015; LYUDMILA et al 2017).

Durante as últimas 3 décadas foram acumulados indícios na literatura que revelam à existência de áreas encefálicas cuja correta manipulação aborta crises convulsivas. Com o objetivo de compreender e bloquear crises convulsivas, um dos caminhos consiste em estudar os mecanismos próprios do sistema nervoso que o protege contra o hypersincronismo epiléptico. O conjunto de adaptações metabólica, hemodinâmica, e sináptica com esta finalidade tem sido denominado de *Sistemas Anticonvulsivantes Endógenos*. Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1996 por Habu e colaboradores, para denominar o conjunto de alterações metabólicas com efeito anticonvulsivantes causadas pelo óxido nítrico no sistema nervoso central. No entanto, esse termo se aplica também à ativação de circuitos neurais e ao acoplamento funcional e sincronismo entre áreas que culmina na proteção ou redução de crises convulsivas (ROSSETTI et al. 2006, DAL-COL et al, 2006; GARCIA-CAIRASCO 2009; GARCIA-CAIRASCO 2017).

Há um corpo de evidências de que os núcleos da base (NB) estão envolvidos com os SAEs, principalmente a SNPr e o ES. No estudo pioneiro de Hayashi em 1952 e nos experimentos clássicos realizados pelos grupos liderados por Gale (1980) e Redgrave e Mosche, (MOSHE e AALBALA, 1984), a SNPr tem sido considerada como uma estrutura central no controle de crises convulsivas. A inibição da SNPr com muscimol, gama-vinil-gaba, diazepam ou estimulação elétrica é capaz de bloquear crises convulsivas em diversos modelos animais (GALE, 1986; GALE, 1989; DORETTO et al, 1994; GARCIA-CAIRASCO et al., 1997; PASINI 1996; RODRIGUES et al., 2004, RODRIGUES et al., 2006). A principal aferência da SNPr com efeito anticonvulsivante dirige-se para o colículo superior (REDGRAVE 1992 a e b). Mas, a principal aferência para a SNPr é o ES (GABAérgica), e a desinibição desse, causa inibição da SNPr, e conseqüentemente desinibição de suas aferências do tálamo e tectais. De fato, é possível também obter resultados anticonvulsivantes

através da desinibição do ES (TURSKI et al, 1986; ARAKAKI et al 2016; HU et al 2017), ou com a inibição da SNPr através de compostos agonistas gabaérgicos, barbitúricos e benzodiazepínicos (como o diazepam, DZP) (DALBY. 2000; CHEN et al 2014; HU et al 2015).

Nesta função destacam-se os NB devido ao seu caráter de alças inibitórias e interligação com o córtex via tálamo. Como os NBs formam alças de retroalimentação (MCHAFFIE et al., 2005) (Figura 1) teoricamente uma alteração em qualquer parte do circuito (como por exemplo, na via estriado nigral (ES mais SNPr) afetaria toda a rede neural, repercutindo no padrão de atividade da SNPr e assim gerar uma resposta anticonvulsivante. Tanto a estimulação do ES (CARVALHEIRO E TURSKI, 1986; ARAKAKI et al 2016; HU et al 2017) quanto a inibição da SNPr (GALE, 1985; CHEN et al 2014; HU et al 2015), são anticonvulsivantes. Isso ressalta a importância do circuito estriado nigral no controle de crises. Isto reforça a existência de circuitos neurais capazes de controlar crises convulsivas, que possivelmente monitoram núcleos mais propensos a atividades ictais, como o hipocampo.

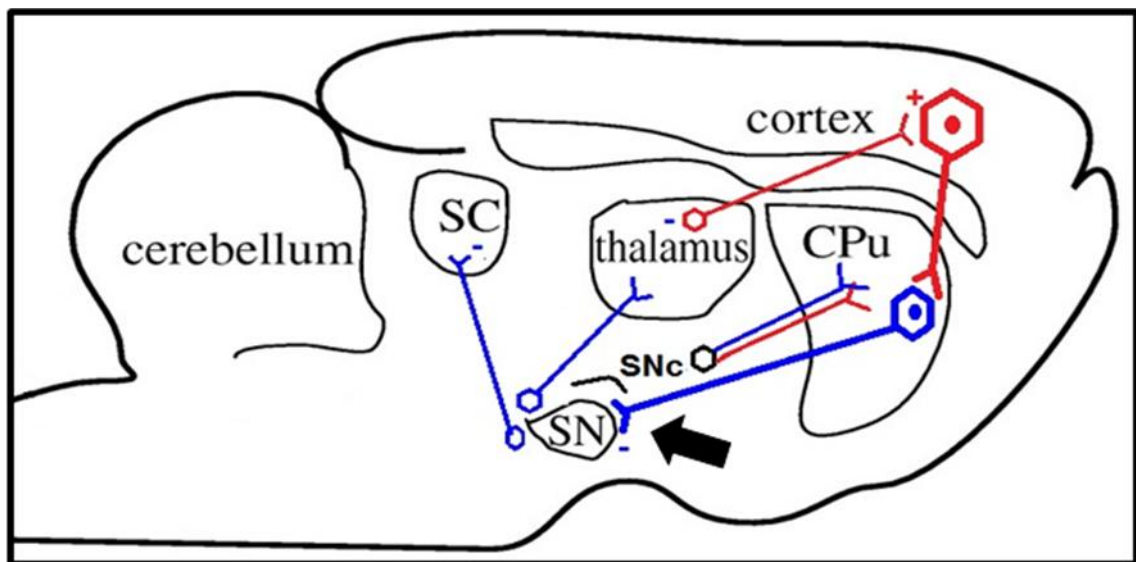


Figura 1: Esquema mostrando as projeções inibitórias e excitatórias do NB. Seta – destaque para a via estriado nigral com projeções inibitórias. (SC: colículo superior; CPu: corpo estriado; SN: substância negra). Figura modificada (MACHAFFIE, 2005).

Corpo estriado

A etiologia do nome do ES deriva de trabalhos anatômicos do século XVII (Vieussens apud SWANSON, 2014). Este nome é de origem latina: *striatum*, graças a sua aparência cheia de estrias, quando observado ao microscópio (Vieussens apud SWANSON, 2014). Essas estrias vêm dos axônios mielinizados que atravessam o estriado de forma a separar o caudado do putâmen (Figura 2A).

Cerca de 95% dos neurônios que constituem o ES são do tipo espinhosos médios (Figura 2A'). Esses neurônios são distribuídos de forma bastante homogênea, fazendo com que o ES não possua uma organização cito-arquitetônica. Tais neurônios GABAérgicos projetam-se para o globo pálido e para a substância negra. O restante são os interneurônios estriatais, que são do tipo não-espinhosos e fazem conexão com os espinhosos médios (MINK, 1999; PAXINOS 2003). Esses interneurônios diferem em seus tamanhos e em seus neurotransmissores. Os interneurônios magnocelulares são colinérgicos e possuem receptores para a substância P e fazem contato sináptico com botões de axônios que contêm substância P no estriado. Os interneurônios parvocelulares são medianamente espinhosos e GABAérgicos, e também co-expressam neuropeptídeos, como a somatostatina e o neuropeptídeo Y, além de proteínas que se ligam ao cálcio (parvalbumina e calretinina) (PAXINOS 2003).

Existe no estriado uma organização neuronal baseada nos mecanismos funcionais. Essa organização permite destacar da matriz do estriado, estriossomos (*patch*, em inglês), os neurônios do compartimento da matriz são chamados de matrix (*matrix*, em inglês) (Figura 2C) (MENESES; TEIVE, 1996; KANDEL, 2003). A diferença dos dois tipos de neurônios do ES é basicamente a sua via de ativação: direta ou indireta; o destino e os neurotransmissores envolvidos (Figura 2B).

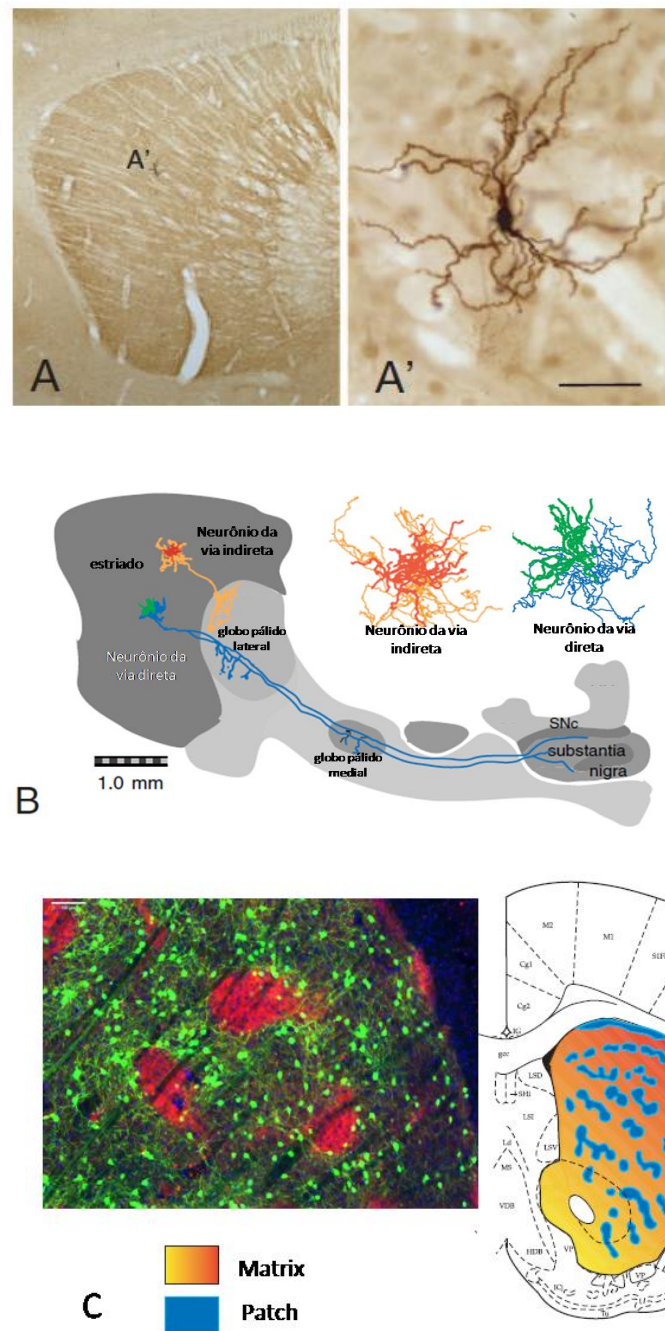


Figura 2: Esquema mostrando as projeções direta e indireta do ES. **A)** Fotomicrografia do corpo estriado marcado com Biocitina. **A')** Aumento de um único neurônio espinhoso médio estriatal. **B)** Traçado das projeções diretas e indiretas dos neurônios estriatais e seu local de destino.(Figura modificada. Paxinos 2004) **C)** Organização dos neurônios da Matrix (verde) que expressam o receptor opioide Mu e do Patch (vermelho) que expressam encefalina. (Figura modificada. Sabatinni 2016). *Matrix*:matriz; *Patch*: estriossomos.

Na via indireta temos: os neurônios estriatais fazem sinapse com os neurônios do globo pálido lateral e medial, e por fim com a substância negra parte reticulada. A transmissão do estriado para essas áreas é GABAérgica. Dessa forma, quando o estriado estimula o globo pálido e a SNPr, haverá inibição da via que se projeta para o tálamo, ou seja, há inibição da inibição, fazendo com que o tálamo seja estimulado para enviar impulsos excitatórios do tipo glutamatérgicos às regiões do córtex frontal. Esta via facilita a ativação motora cortical, bem como processos cognitivos e motivacionais (GERFEN, 2004, KANDEL 2003).

Por outro lado, ativando-se a via indireta, os neurônios que conectam o estriado ao globo pálido externo, que são GABAérgicos, inibem essa estrutura. Com a inibição do globo pálido externo, os núcleos subtalâmicos não serão inibidos, uma vez que os núcleos subtalâmicos recebem impulsos GABAérgicos do globo pálido. Na sequência, os núcleos subtalâmicos, que enviam projeções glutamatérgicas ao globo pálido interno e à SNPr, irão estimular essas estruturas, as quais promoverão a inibição GABAérgica do tálamo. Isso impede a ativação motora cortical e também têm consequências sobre processos cognitivos e motivacionais (MENESES, 1996; ALEXANDER DE LONG; STRICK, 1986).

Os subtipos de receptores dopaminérgicos D modulam principalmente os neurônios da via direta, juntamente com substância P e dinorfina (KANDEL, 2003) mais precisamente nos neurônios que se projetam para o globo pálido lateral, medial e SNPr. Os receptores D2, bem como a encefalina, são localizados em neurônios da via indireta. Então, a ativação de D1 ativa a via excitatória e a ativação de D2 inibe a via inibitória (GERFEN, 2003; SIEGEL, 2006).

Plasticidade neuronal e estímulo pós tetânico

Entende-se por plasticidade cerebral a capacidade de reorganização estrutural e funcional do tecido nervoso, ou em consequência de sua estimulação (ZILLES 1992; KOLB et al, 2003; MIYAMOTO 2006; HÜBENER et al 2014). A plasticidade pode se manifestar de três maneiras: a) Morfológica, ou seja, mediante alterações estruturais nos neurônios, nos axônios, nos dendritos, nas sinapses e nos circuitos neuronais (Rosenzweig & Bennet 1996); b) Funcional, mediante as alterações em funções fisiológicas (CHUGANI 1998); c) Comportamental e cognitiva,

por exemplo, relacionadas com os fenômenos de aprendizagem e de memória (COTMAN & BERCHTOLD 2002).

A plasticidade sináptica também pode ter diferentes janelas temporais. A plasticidade sináptica de curta duração (de milissegundos a vários minutos) foram observadas nas sinapses de vários organismos (ZUCKER E REGEHR, 2002). Este tipo de plasticidade tem um importante papel em adaptações de curta duração, devido a inputs sensoriais, mudanças transitórias de estados de comportamento e formas de memória de curta duração. A plasticidade sináptica de curta duração é desencadeada por pequenos estímulos que causam uma acumulação transitória de cálcio nos terminais nervosos pré-sinápticos, o que desencadeia alterações na liberação dos neurotransmissores (CITRI E MALENKA, 2007).

Duas formas de plasticidade sináptica são mais estudadas no sistema nervoso central, são as de plasticidade de longa duração: potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD). Ambos estes fenômenos foram observados no hipocampo (BLISS E COLLINGRIDGE, 1973, SQUIRE, 1992) e são desencadeados pela ativação dos receptores NMDA e subsequente aumento da concentração do cálcio pós-sináptico, que são elementos moleculares primordiais na aprendizagem (COTMAN et al, 2002).

O LTP foi primeiramente observado *in vivo* por Bliss & Lømo em 1966 em no giro denteado do hipocampo, através de uma estimulação elétrica de alta frequência na via perfurante durante alguns segundos produziu um aumento dos potenciais pós-sinápticos excitatórios. A estimulação elétrica de alta frequência de pulsos rápidos e repetidos (por exemplo, 100 Hz) permite a indução de plasticidade para fortalecimento de determinados circuitos neurais através de estimulação tetânica (OLDS, 1972; BLISS & LØMO 1973) envolvendo modificações comportamentais e podendo modificar a atividade motora (FISHER et al, 1997). Tal fenômeno ocorre graças a uma despolarização permitindo a ativação de receptores NMDA e uma dependência pelo cálcio (COLLINGRIDGE et al 1983). A indução de LTD *in vitro* utiliza estímulos de baixa frequência (0.5- 3Hz) e requer uma menor concentração de cálcio intracelular pós-sináptico quando comparado ao LTP. (CITRI E MALENKA, 2007).

Do ponto de vista funcional, além de ser a base celular no processo de aprendizado e memória (SQUIRE, 1992), a plasticidade também pode ter um importante papel no desenvolvimento das crises epiléticas, sugerindo-se que exista uma continuidade entre plasticidade e patologia. Visto que a repetida excitação dos grupos de neurônios na epilepsia, resulta em mecanismos semelhantes ao de LTP, tais como a necessidade de uma estimulação de alta frequência, hiperexcitabilidade glutamatérgica, liberação do íon cálcio no meio intracelular, entre outros (DINGLE & MC BAIN, 1999).

3 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a estimulação elétrica de alta frequência no corpo estriado causará indução de plasticidade neuronal aumentando a motricidade do rato pela desinibição talâmica e alterando o potencial evocado da via estriado nigral com indução de LTP.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar estimulação elétrica da alta frequência no ES para modificação de circuitos neurais e comportamento.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar um protocolo de estimulação elétrica com pulsos na via estriado-nigral para detecção do potencial evocado;
- Aprimorar um sistema de análise de sinal elétrico e criação de algoritmos matemáticos para a captação e processamento do potencial evocado;
- Aplicar protocolo clássico de indução de LTP por estimulação elétrica de alta frequência no ES na via estriado-nigral;
- Avaliar as alterações comportamentais de animais que foram submetidos ao protocolo de estímulos de alta frequência;
- Avaliar se a estimulação elétrica de alta frequência no ES causou mudanças no potencial evocado da via estriado-nigral, como LTP por exemplo;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Para este trabalho foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Long Evans (60 a 90 dias) provenientes do biotério de criação do laboratório de Neurofísica do Departamento de Física (DF, UFPE). Foram mantidos em estante ventilada (Alesco) com temperatura (22 ± 2 °C) sob dieta comercial padrão (Labina®) e luminosidade controlada (12h claro, início 6:00h) com água e comida *ad libitum*, criados com supervisão da veterinária Dr^a Cláudia Oliveira. Os animais (n=8) foram randomicamente divididos entre o grupo controle (n=4) e experimental (n=4). O grupo experimental recebeu estimulação elétrica verdadeira enquanto que o grupo controle recebeu idêntica manipulação e implantes cerebrais, mas não recebeu estimulação elétrica. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela CEUA –UFPE (Processo: 23076.016697/2016-28).

5.2 CONFEÇÃO DAS MATRIZES DE MULTIELETRODOS E ELETRODO DE ESTIMULAÇÃO

No presente estudo utilizamos uma matriz de multieletrodos de 16 canais para aquisição do registro eletrográfico do hipocampo (HIPO), um tetrodo contendo 4 canais posicionado no ES e um conjunto de eletrodos contendo 8 canais na SPNr, e por fim um eletrodo de estímulo posicionado no ES contralateral a matriz. Todos os eletrodos são produzidos pelo próprio aluno na oficina de eletrônica do Laboratório de Neurofísica. A Figura 3 mostra a matriz de multieletrodos. O registro no hipocampo será fundamental para experimentos futuros envolvendo o convulsivante pilocarpina.

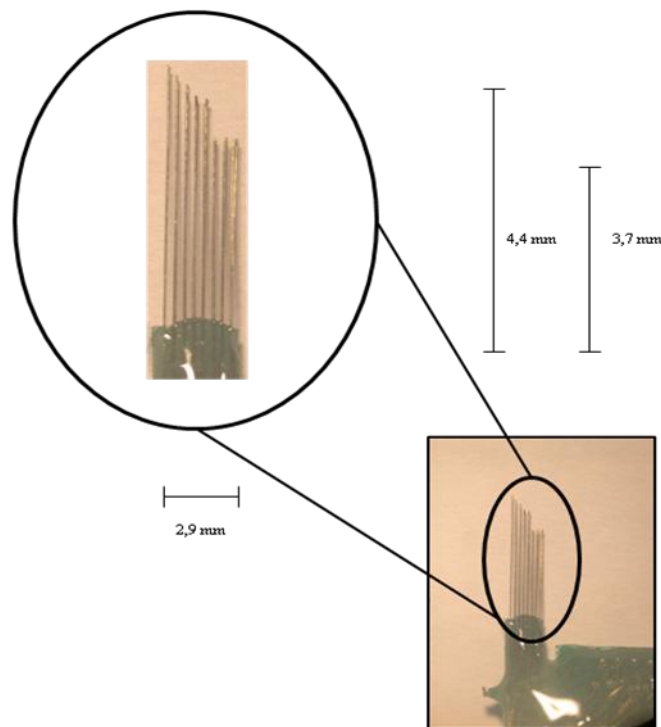


Figura 3. Matriz de multieletrodos escalonada em diferentes alturas (8/2) utilizada para conseguir um registro do potencial de campo local do hipocampo.

A figura 4 exemplifica o tetrodo de implante no ES.

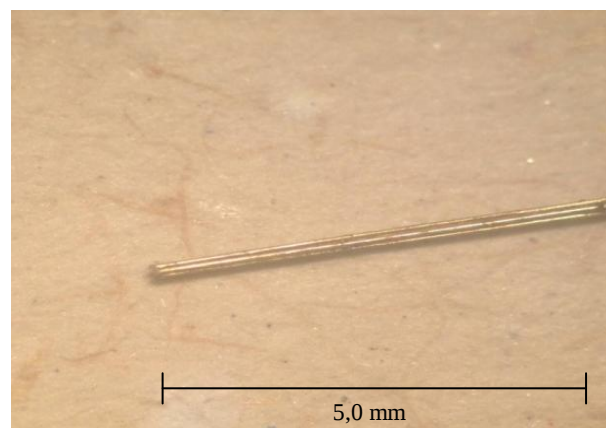


Figura 4: Tetrodo (4 canais).

A figura 5 mostra o conjunto de 8 eletrodos implantados na SNPr.

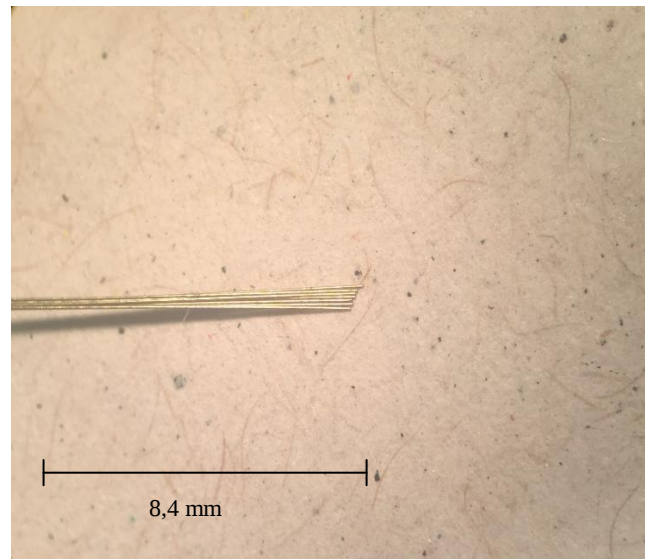


Figura 5: Conjunto de eletrodos (8 canais).

A figura 6 mostra o eletrodo de estímulo usado no protocolo de LTP.

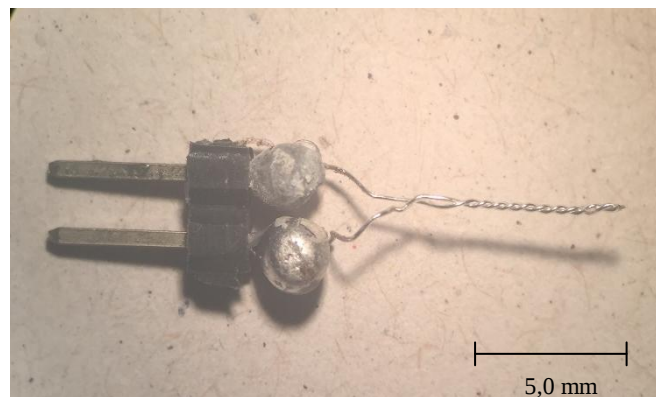


Figura 6: Eletrodo usado para o protocolo de LTP.

Os componentes básicos para a montagem da matriz de multi eletrodos se encontram na figura 7.

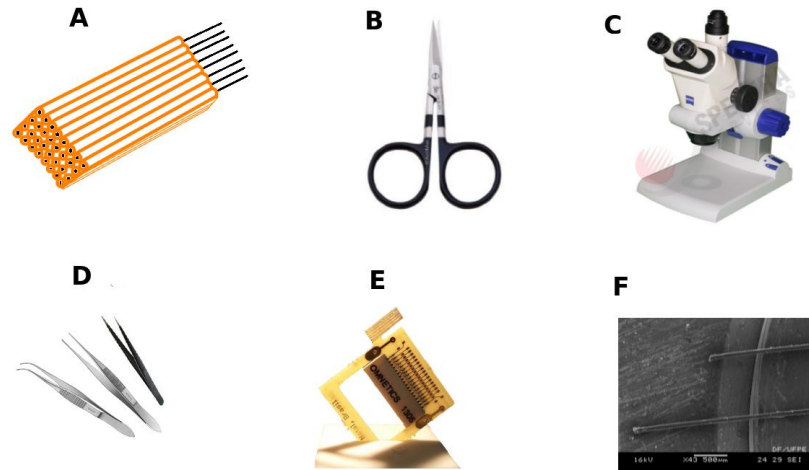


Figura 7. Componentes básicos para a confecção de uma matriz. A - Gabarito utilizado na formatação da matriz. B - Tesoura com lâmina de carboneto de tungstênio. C - Microscópio simples 10X. D - Pinças. E - Placa de circuito impresso 36 canais, com trilhas frente e verso em ouro. F - Fios de tungstênio revestidos com material isolante

O processo pelo qual se obtém uma matriz de 16 multieletródos pode ser descrito pelos seguintes pontos:

- Construção de um gabarito (Figura 7A) a partir de tubos de sílica, com a intenção de conferir uma geometria uniforme ao conjunto de 16 multieletródos. O espaçamento entre multieletródos é função do diâmetro dos tubos do gabarito. Foram utilizados tubos com diâmetro de 250, 350 ou 380 μm .
- Os multieletródos consistem de fios de tungstênio (diâmetro 30 μm) revestidos com material poliamida (material isolante). O uso do tungstênio é importante, pois devido à sua dureza, permite a penetração de fios finos no cérebro sem que sejam torcidos ou quebrados. Esses fios, obtidos de fábrica no comprimento de 30cm, são cortados em tamanho apropriado (5cm) por uma tesoura de precisão DR. SLICK .CO, que possui uma lâmina reforçada por uma liga de carboneto de tungstênio (Figura 7B).

- Com auxílio de um microscópio e pinças (Figuras 7C e D), os fios são depositados no gabarito.
- Uma placa de circuito impresso (PCI) 36 canais, com trilhas de ouro frente e verso, é utilizada como base para os multieletródos (Figura 7E). A PCI é soldada a um conector Omnetics, onde será conectado o equipamento de aquisição.
- Os fios são ajustados (arranjados pelo gabarito) sobre uma haste lateral da PCI. Após adequada acomodação, os fios são fixados permanentemente por cola epóxi Araldite à haste. O desacoplamento do gabarito do sistema, agora composto por fios, PCI e Omnetics, deve ser realizado em um tempo hábil à solidificação da cola (12h).
- O contato elétrico entre a PCI e os fios é dado pela soldagem desses nos orifícios com paredes metalizadas da placa (com solda em pasta).
- A Matriz é concluída com o isolamento, por epóxi, da região de contato entre a PCI e os eletrodos. O epóxi também proporciona uma maior estabilidade mecânica ao corpo da matriz.

5.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTE DE MATRIZ DE MULTIELETRODO

Para realização do procedimento, os ratos foram pré-anestesiados com anestésico volátil (isoflurano) e em seguida anestesiados profundamente com uma combinação de cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p, Dopalen) e xilazina (20 mg/kg, ip, Anasedan). Antes de qualquer procedimento cirúrgico invasivo, verificou-se a completa ausência dos reflexos oculares e de pata e cauda após pinçamento. Após tricotomia do escalpo, fixação em aparelho estereotáxico (NarishigeScientificInstrument/Model SR-5R) e assepsia com iodo em álcool etílico, aplicamos injeção subcutânea de anestésico local (lidocaína 2%) e expusemos o crânio por meio de incisão com bisturi. Utilizou-se o bregma como referência ântero-posterior (AP) e médio-lateral (ML) para a perfuração do crânio, e a superfície da dura-máter como referência dorso-ventral (DV) para o implante dos eletrodos. Realizou-se a craniotomia para exposição do encéfalo na coordenada do hipocampo. Esta trepanação consiste num orifício de 5 mm de diâmetro, que permitiu a introdução da matriz de multieletrodos. A penetração da matriz que foi realizada lentamente (200 μ m a cada 2 minutos) até atingir a profundidade desejada.

Desenho esquemático demonstrando o implante da matriz para registro do hipocampo esquerdo, com as coordenadas, em mm: +5,04AP, -2,2ML, +3,7 DV (Paxinos& Watson 2002). A Figura 8 mostra este local de posicionamento.

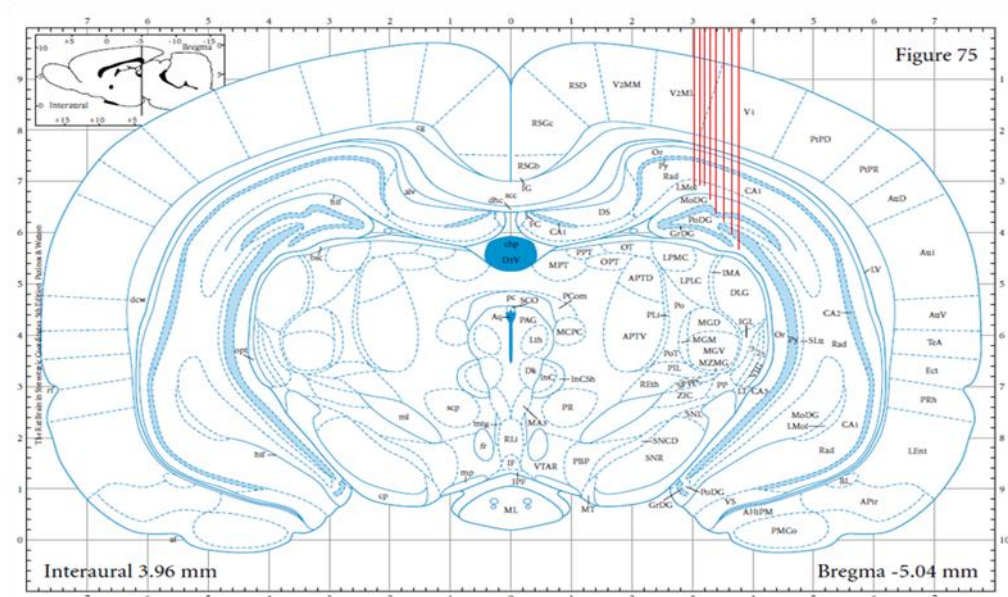


Figura 8: Local de posicionamento da matriz no hipocampo.

5.4 AQUISIÇÃO DO REGISTRO ELÉTRICO DE POTENCIAL DE CAMPO LOCAL

O registro eletrofisiológico consistiu de:

(1) potenciais de campo locais (ou LFPs, '*Local field potentials*'), o que representa a atividade oscilatória do HIPO, ES e SNPr;

(2) potenciais pós-sinápticos inibitórios de campo (ou iPSPs, '*inhibitory postsynaptic potentials*'), representando as respostas desses locais aos pulsos elétricos aplicados na via estriado nigral.

A aquisição do registro está sendo realizada pelo equipamento *TDT biocamp processor RZ2S3 series*. A Figura 12 exemplifica o LFP da matriz de multieletrodos.



Figura 12: LFP hipocampal registrado pelo amplificador TDT biocamp.

Para a evocação dos iPSPs durante o experimento utilizou-se pulsos bipolares (FIG 13 – A) criados em nosso laboratório com intensidade de 30 V, duração de 130 μ s e frequência de 0,05 Hz (1 pulso a cada 20 s). O estímulo para protocolo de geração de LTP usa o mesmo pulso com uma frequência de 100Hz (100 pulsos por 1 s) durante 3x pelo tempo de 5 segundos (FIG 13 – B). Os pulsos elétricos foram gerados por um estimulador confeccionado e cedido pelo Laboratório Interdisciplinar de Neuroengenharia e Neurociências (LINNce) coordenado pelo Prof. Dr. Vinícius Rosa Cota da Universidade Federal de São João Del Rey (FIG 13 – C).

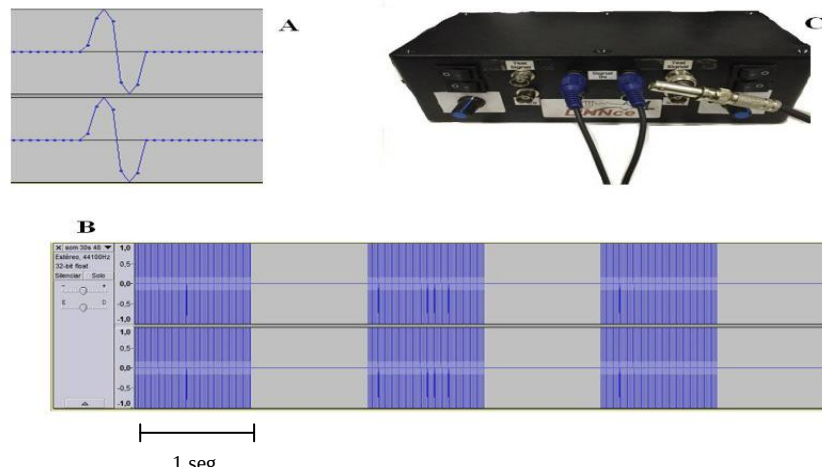


Figura 13: A) Pulso bipolar criado para potencial evocado. B) Pulso de 100 Hz para geração de LTP. C) Amplificador adaptado para geração do estímulo.

5.5 PROTOCOLO PARA GERAÇÃO DE LTP NA VIA ESTRIADO NIGRAL

Uma vez recuperados da cirurgia, os animais foram submetidos aos experimentos que se dividem em 16 dias para ambos os grupos. Os animais recebem manipulação verdadeira (estimulador elétrico ligado) ou falsa (estimulador elétrico desligado) nos dias 7-9 e 14-16 após a cirurgia. Em cada sessão do experimento são coletados quatro blocos de aquisição com 4 minutos de duração: *Block 1*, registro apenas com potencial evocado; *Block 2*, é ligado o pulso de 100Hz para geração do LTP, após isso é ligado o potencial evocado e é feita a aquisição deste bloco. *Block 3* e *Block 4* consiste no mesmo procedimento do *block 2*. Os animais do grupo controle receberam a manipulação falsa de todos os métodos descritos. Veja a figura 14 para melhor entendimento do delineamento do protocolo.

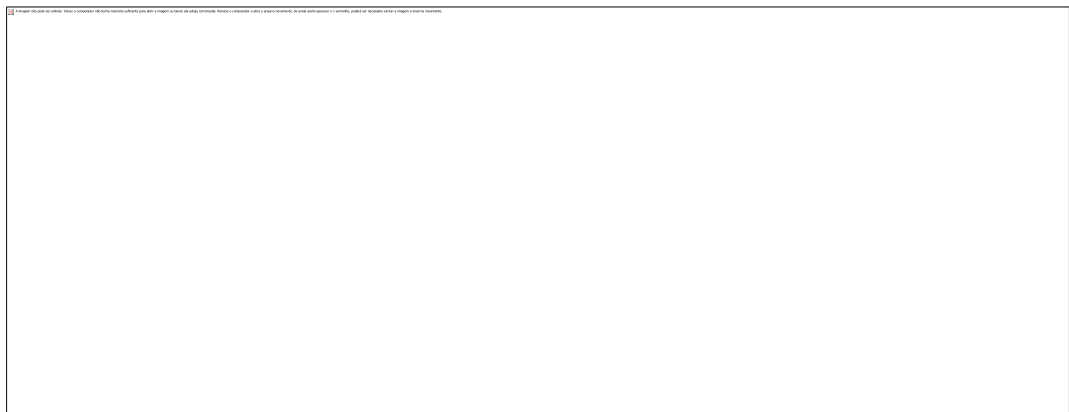
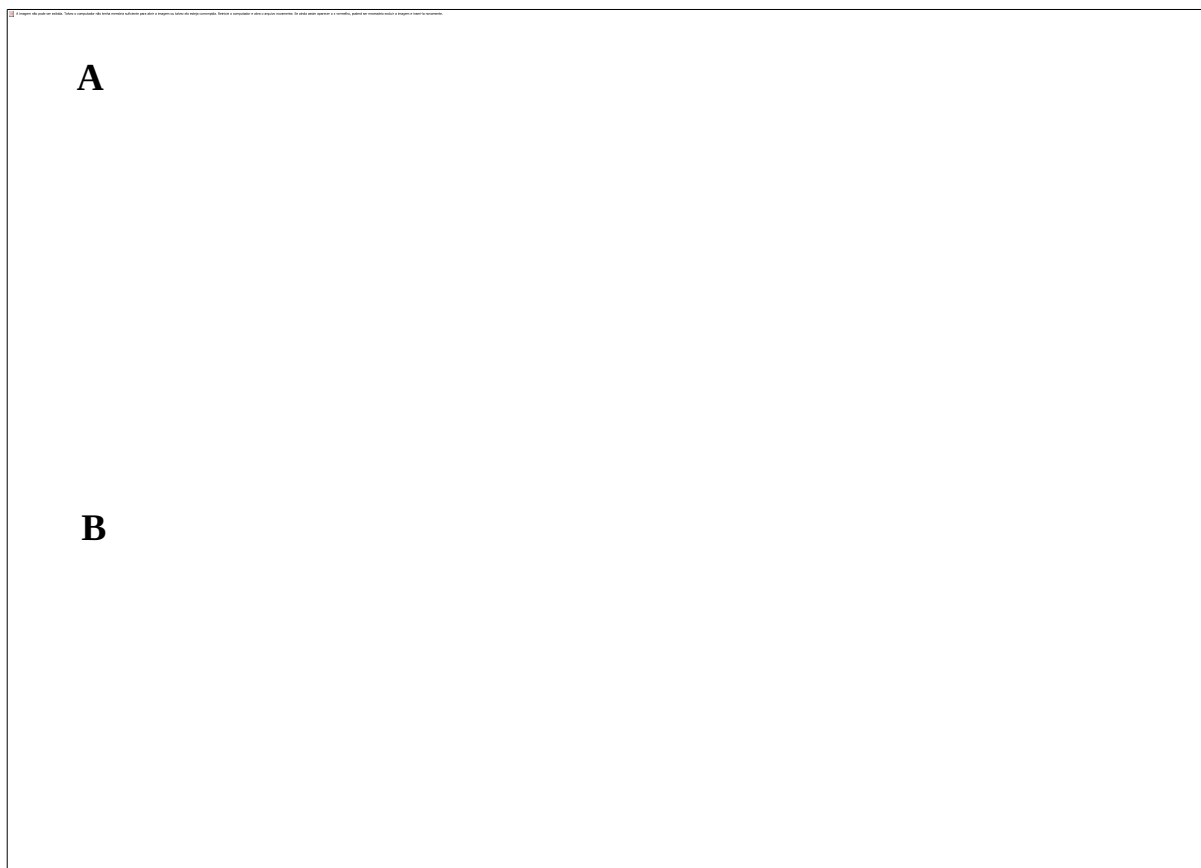


Figura 14: Delineamento experimental do protocolo de LTP.

5.7 ALGORITMO PARA ANÁLISE DO POTENCIAL EVOCADO

Fez-se essencial a criação de um algoritmo, denominado “promediação”, para podermos avaliar o potencial evocado. Este algoritmo encontra-se em processo de pedido de patente no Brasil. Inicialmente ocorre a aplicação dos pulsos da estimulação elétrica (1 pulso a cada 20 s, 0,05 Hz) no potencial de campo local da SNPr. O local estimulado é o ES mas o potencial evocado é registrado na SNPr. O sinal do estimulador é convertido em um sinal luminoso e depois convertido novamente em sinal elétrico, com apenas uma polaridade e com duração de cerca 1 ms, para facilitar a detecção. Assim, sendo enviado para o sistema TDT, onde é digitalizado a uma taxa de 12kHz, em paralelo com o sinal eletrofisiológico, e é armazenado como um vetor chamado “SYNC” (pulsos). A partir do vetor sync (FIG 16A) extraímos os tempos dos pulsos de estimulação que servem de referência para



a promediação do sinal LFP (FIG16 B).

Figura 16: A) vetor sync com os pulsos para detecção do potencial evocado. B) LFP com os pulsos com referência para a promediação feita pelo algoritmo.

O sinal do LFP então conterá três componentes:

- (1) um componente de atividade espontânea do cérebro;
- (2) um componente que corresponde ao potencial evocado pelo estímulo;
- (3) um terceiro componente que é um artefato induzido pelo estimulador.

O sinal que nos interessa é o componente 2. Assim, procedemos para eliminar os demais componentes e extrair somente o que nos interessa.

O componente 3 tem uma duração de cerca de 130 μ s, portanto não prejudica a detecção do potencial evocado. Para reduzir algum artefato residual de maior duração, alternamos a ordem da polaridade dos pulsos de estimulação da seguinte forma: um pulso tem primeiro fase positiva por 70us e depois fase negativa por 70us e o pulso seguinte (após 20s de intervalo) terá primeiro fase negativa e em seguida fase positiva.

O componente 1 flutua ao redor do zero. Ao fazermos uma média do sinal após cada pulso de estimulação, o LFP devido à atividade espontânea deverá ser ora positivo, ora negativo, assim se cancelando. Para um número infinito de repetições o LFP seria completamente cancelado e ficaríamos somente com o sinal evocado. Para saber se o potencial evocado que estimamos é significativo precisamos estimar o quanto este sinal resultante difere de uma flutuação do sinal

$$z = \frac{\bar{x}}{\sigma_m}$$

do LFP espontâneo. Para isso usamos o “Z-score” do resultado, dado por:

Onde ‘x’ representa a média das “n” épocas tendo como referência o estímulo. E σ_m é o desvio padrão do valor médio. Com este cálculo, teremos quantos desvio padrão nosso dado está distante da média. Note que X, σ e Z são estimados para cada ponto de -200ms a +200ms após o pulso (FIG17)

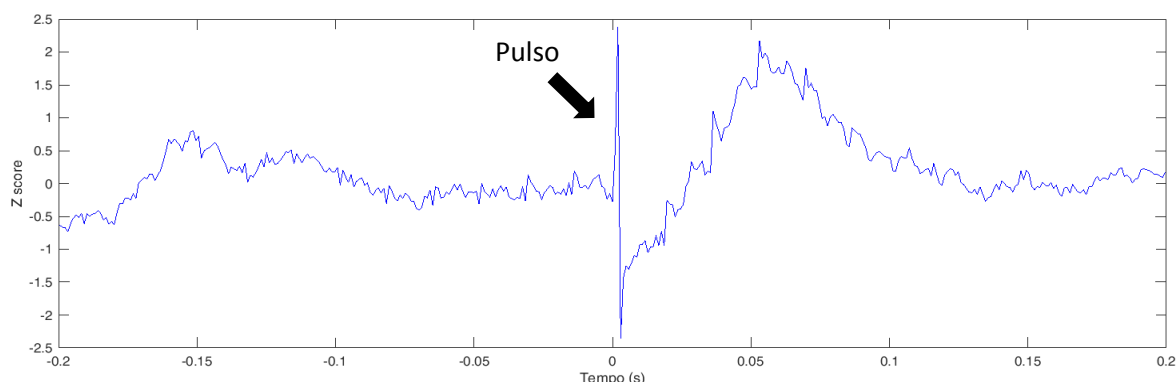


Figura 17: Figura com os valores de z-score para avaliação da promediação do LFP após aplicação do estímulo.

5.8 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Antes de cada dia de experimento, os ratos tiveram sua atividade comportamental registrada antes de cada experimento, para monitoramento de atividade livre e espontânea. O teste da atividade comportamental dos animais foi realizado em uma arena de acrílico (46 cm de diâmetro e 48 cm de altura). A arena foi filmada continuamente por 10 minutos para que fosse possível gerar a adaptação do animal e assim analisar seu comportamento, permitindo mensurar a quantidade de linhas cruzadas (quadrados adentrados, deambulação), elevação (*rearing*), autolimpeza, sacudidelas (*wet dog shakes*, WDS) e tempo de imobilidade. Os primeiros cinco minutos de gravação foram desprezados e toda a quantificação foi realizada apenas nos 5 minutos finais, para diminuir a interferência do efeito de novidade, quando o rato é posicionado em local diferente da caixa em que se encontrava. Este teste foi realizado para avaliar a atividade exploratória e por consequência detectar ocorrência de episódios de hiperatividade dos animais.

5.9 EUTANÁSIA E PERFUSÃO

Após o último experimento os ratos foram eutanasiados por perfusão transcardíaca sob anestesia (Enflurano), inicialmente com NaCl a 0,9%, seguida de paraformaldeído 4% (PA) em tampão fosfato (TF) 0,1M e pH 7,4. A perfusão foi realizada com auxílio de uma bomba de infusão contínua (MiniPulsEvolution). Após a perfusão os encéfalos foram pesados, colocados em solução crescente de sacarose (10%, 20% e 30%) para desidratação e crioproteção, seccionados e armazenados em freezer -20°C em solução anticongelante para posterior avaliação histológica.

5.10 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS

Tais cérebros serão cortados em fatias coronais de 50µm em criostato e será realizado o ensaio imunohistoquímica para marcação da microglia reativa através do IBA1 para avaliar o posicionamento estereotáxico da matriz de multieletródos. Será feita também a determinação através de histoquímica por uma bateria de hematoxilina e eosina (HE).

5.11 ANÁLISES EXPERIMENTAIS

Para a dissertação, as análises concluídas se basearam na quantificação da atividade exploratória comportamental dos animais. Na quantificação da intensidade de reposta e detecção do potencial evocado em mV e na confecção de todo protocolo metodológico incluindo as matrizes e criação de dois algoritmos essenciais para o presente estudo.

5.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram tratados no software Matlab® versão R2012B. A análise estatística foi realizada através do Graphpad Prisma 5.0. Para todos os dados paramétricos o teste t-student pareado foi utilizado e para dados não paramétricos o teste Mann-Whitney foi utilizado. Diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NO TESTE DE CAMPO ABERTO

Na figura abaixo observamos a quantidade de quadrados andados, atividade de *rearing*, quantidade de WDS e a atividade de auto limpeza dos animais do grupo controle e experimental (n=4, cada grupo) representados em média e desvio padrão. Em todas, houve uma maior atividade no grupo experimental (Quantidade de quadrados: controle $5,5 \pm 1,8$; experimental $53,7 \pm 13,5$ e rearing: controle $3,5 \pm 2,4$; experimental $23,5 \pm 7,6$. WDS: controle 0; experimental $10,6 \pm 3,0$ e autolimpeza: controle 0; experimental $4,3 \pm 2,1$).



Figura 18.A- Comparação do número de quadrados andados entre os animais controle e experimental. B- Comparação do número de vezes do rearing entre os animais controle e experimental. C- WDS dos animais do grupo controle e experimental. D- Autolimpeza nos animais controle e experimental. Teste t-student; $p < 0,001$

Na figura 19, observamos o tempo de imobilidade em segundos dos animais do grupo controle (média de $236 \pm 36,9$ segundos) comparado com o grupo experimental (média de $25 \pm 12,1$ segundos) ($n=4$, para ambos os grupos).

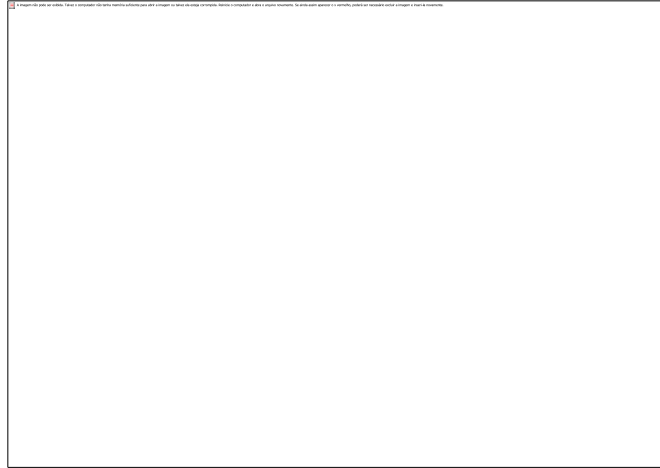


Figura 19. Tempo imóvel dos animais controle e experimental. Teste t-student; $p < 0,001$

6.2 QUANTIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DE RESPOSTA DO REGISTRO ELÉTRICO NOS ANIMAIS COM PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA FREQUÊNCIA

Na figura 20, mostramos a detecção do potencial evocado medido em um experimento em diferentes janelas de tempo. Em primeiro lugar a detecção do potencial evocado no tempo basal (linha preta, antes da aplicação do estímulo de alta frequência) e em seguida mostramos os potenciais evocados 5 min, 20 min, 35 min (linha vermelha, verde e azul, respectivamente) após a aplicação do estímulo de alta frequência (100 Hz). Os dados foram plotados em amplitude (mV) em função do tempo (s). Foi colocada uma figura *inset* da literatura para demonstrar o potencial evocado hipocampal (*in vivo*) no protocolo clássico de LTP para comparação.

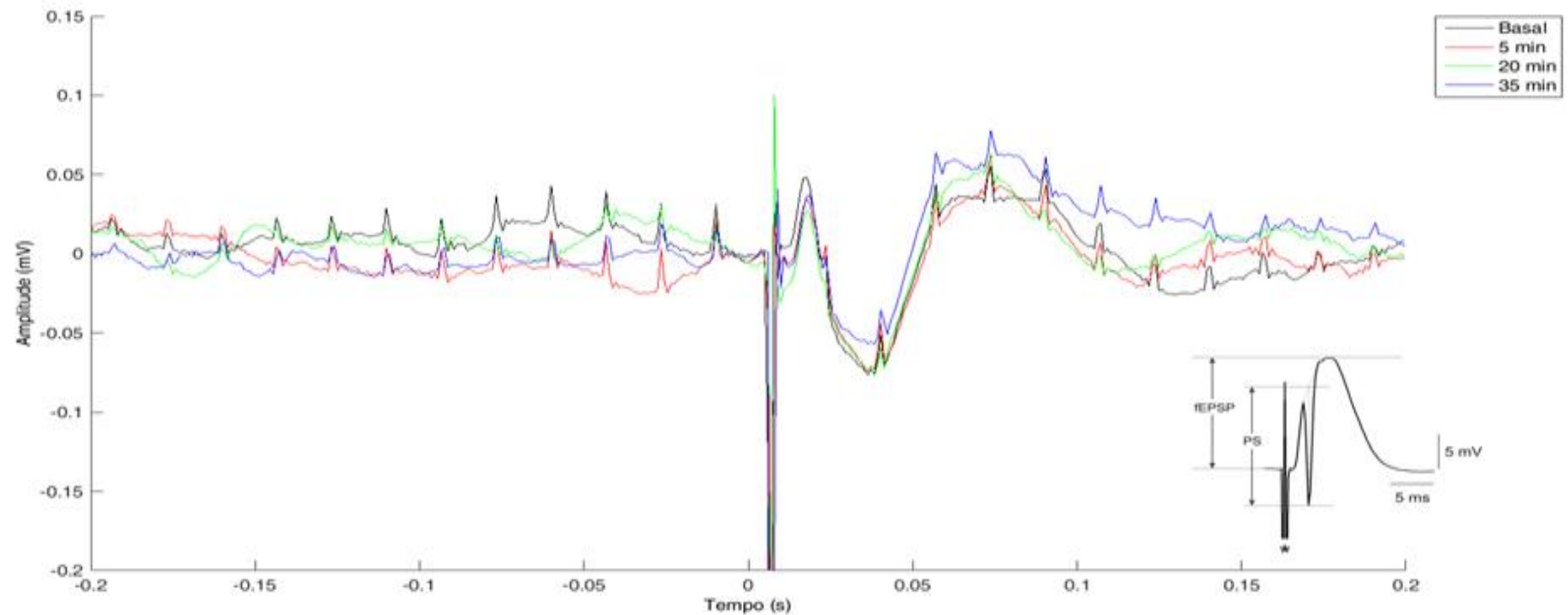


Figura 20. Potencial evocado na via estriado nigral no momento de estímulo de alta frequência (linha preta), potencial evocado 5 min, 20 min e 35 min (linha vermelha, verde e azul, respectivamente) após a aplicação do estímulo. Colocamos os -200 ms antes da detecção do pulso para demonstrar que o potencial evocado é significativamente diferente. Figura *inset* demonstra o potencial evocado hipocampal (*in vitro*) no protocolo clássico de LTP para comparação com o potencial evocado obtido pelo nosso experimento (fEPSP – potencial pós-sináptico extracelular; PS – *population spike*; QUEIROZ et al 2009)

7 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: o aumento dos índices de motricidade, mas sem estereotipia, 24h após a aplicação do estímulo de alta frequência na via estriado nigral; e a detecção do potencial evocado na via estriado nigral, comprovando a monitoração da via.

Alterações comportamentais

É possível que a estimulação elétrica de alta frequência aplicada no estriado esteja causando um processo de plasticidade que culmina com a desinibição dos neurônios medianamente espinhosos com receptores D1. Este tipo de neurônio controla prioritariamente a via direta, que tende a facilitar o movimento, aumentando assim a atividade motora dos nossos animais. Por outro lado, pode também ter havido uma plasticidade no sentido de reduzir a eficiência ou ativação da via indireta. Esta via, que inicia nos neurônios medianamente espinhosos do estriado que contém o receptor D2, possui efeito de reduzir a motricidade. A aplicação do estímulo elétrico de alta frequência pode ter, sob certos aspectos, simulado um grande aporte de aferências córtico-estriatais, já que o córtex é a principal origem de excitabilidade do estriado. É sabido que a plasticidade obtida no estriado depende da presença de dopamina e sua ativação de receptores D1 e D2, e também do tipo de interneurônio estriatais (CALABRESI, 2000).

Os subtipos de receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2 presentes no ES modulam a ativação da motricidade pela via direta e indireta (GERFEN, 2003), no sentido estriado-nigral. Existem evidências consideráveis que o sistema dopaminérgico do mesoaccumbens controla a locomoção horizontal (atividade ambulatoria) em resposta a um estímulo de baixas doses de anfetamina, enquanto o sistema dopaminérgico nigrostriatal medeia comportamentos estereotipados provocados por doses mais elevadas (SHARP et al. 1987) sugerindo o envolvimento desses sistemas na alteração do comportamento animal. Então é possível que o nosso estímulo de alta frequência tenha alterando, além da via nigro-estriatal, também, mas não apenas, o circuito neoestriado-acumbente, já que os ratos apresentaram aumento do comportamento de elevação. Possivelmente foi induzida também algum tipo de plasticidade tanto na via estudada (via nigro-estriatal, direta)

quanto na via indireta (estriado-palidal externa, palidal-subtalâmica, e subtalâmica-nigral). Não registramos potencial evocado na via indireta nem no núcleo accumbens, mas a análise histológica refinada poderá revelar se existe a presença de marcadores de plasticidade nesses núcleos (como por exemplo, conexinas).

Nossos dados sugerem que os eletrodos implantados na substancia nigra reticulada tiveram baixo efeito lesivo. Caso tive havido uma degeneração nitro-estriatal, nossa estimulação elétrica possivelmente teria evocado rotações e movimentos estereotipados. Sabe-se que estimulação farmacológica do estriado através de agonistas dopaminérgicos como apomorfina, produz um comportamento estereotipado sem rotação, desde que não exista lesão da via nigro-estrial. Se houver lesão unilateral dessa via, como acontece no modelo de 6-hidroxidopamina, a aplicação de apomorfina induz agora rotação contralateral ao hemisfério lesado, o que é mediado pelo sistema dopaminérgico (SACAN et al 1991, SMITH E BENINGER, 1996).

No entanto, nossos dados não são totalmente conclusivos sobre como o protocolo para indução de LTP na via estriado nigral altera morfologicamente os neurônios que contêm receptores D1 e D2 no estriado.

Potencial evocado na via estriado nigral

Nossos dados indicam que foi possível mensurar o potencial evocado na via estriado-nigral. Tal fato é inédito na literatura, e aponta um avanço metodológico para nosso grupo. Conseguimos detectar com clareza tal potencial pós-sináptico antes e depois da aplicação do estímulo de alta frequência de 100 Hz na via estriado nigral. Sendo assim, o potencial evocado na via estriado-nigral compartilha as mesmas características e propriedades das detecções clássicas de potencial evocado para indução de LTP (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993), bem como as mesmas características de reposta do potencial evocado pós-sináptico cortico-estriatal (OOSWALD et al. 2009, ELLENDER et al. 2013).

Era nosso intuito inicial induzir LTP na via estriado-nigral, sendo esta a razão da escolha de um protocolo de estimulação de alta frequência que classicamente mostra-se capaz de induzir LTP no hipocampo. Entretanto, com os dados atuais, não foi possível comprovar este fenômeno na via estudada no mesmo dia da

estimulação. Não houve significância estatística na amplitude da resposta do LFP após o estímulo de 100 Hz quando comparado com o período anterior, o que é usual para caracterizar a presença de LTP em outras áreas do cérebro como o hipocampo (GODDARD, 1978). No entanto, a ausência da detecção do LTP após estimulação aguda não exclui a possibilidade de que tenha havido plasticidade nessa via 24h depois, quando justamente foi observado o aumento da resposta comportamental de motricidade. Tal hipótese ainda necessita ser investigada com os dados já coletados.

Outra situação a ser considerada é que a indução de LTP nos núcleos da base possui características próprias. Sabe-se que o LTP é um fenômeno dependente de glutamato e da ativação de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (COLLINGRIDGE 1976). O estriado, apesar de ser uma grande estrutura, é praticamente depletado de glutamato, e utiliza a dopamina como principal neurotransmissor excitatório. Entretanto, é possível obter LTP estriatal através de manipulação farmacológica, tal como o meio livre de magnésio (CALABRESI et al 1992). Vale ressaltar que o LTP estriatal compartilha as mesmas propriedades excitatórias do LTP descrito em outras regiões do cérebro (BLISS E COLLINGRIDGE, 1993), como o envolvimento de cálcio pós-sináptico no LTP cortico estriatal (CHARPIER et al, 1997).

A estimulação elétrica de alta frequência (100 Hz) é capaz de induzir LTP nas células medianamente espinhosas do estriado, através da estimulação da via cortico estriatal (CALABRESI et al 1992). Os receptores do tipo D2 estão associados com a geração de LTD na via cortico estriatal (SUNG et al 2001) enquanto que os receptores D1 estão associados com o LTP (CALABRESI, 2000).

A demonstração de um possível papel da plasticidade sináptica através de LTP na via estriado nigral na geração de atividade motora fisiológica requer mais trabalho experimental, visto que, não há nenhuma evidência na literatura.

8 CONCLUSÕES

1. A estimulação de alta frequência no estriado dorsal resultou em aumento sustentado na motricidade. Este aumento persistiu por duas semanas após o estímulo e possivelmente reflete plasticidade no estriado em si, ou em suas eferências.

2. Foi possível detectar potenciais evocados na via estriado-nigral, demonstrando que tal via foi corretamente estimulada. No entanto, não se observou a presença de LTP após um estímulo agudo de alta frequência no estriado dorsal.

Temos como perspectiva deste trabalho analisar os registros eletrofisiológicos seguidos da aplicação de pilocarpina no intrahipocampal e comparar o grau de severidade, latência e espículas de crises nos animais controle sem estimulação de alta frequência e nos animais experimentais com protocolo de estimulação de alta frequência.

REFERÊNCIAS

- ALBALA, Bruce J.; MOSHÉ, Solomon L.; OKADA, Reiko. Kainic-acid-induced seizures: a developmental study. **Developmental Brain Research**, v. 13, n. 1, p. 139-148, 1984.
- ARAKAKI, Takafumi et al. The role of striatal feedforward inhibition in the maintenance of absence seizures. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 37, p. 9618-9632, 2016..
- BEDARD, P.; PYCOCK, C. J. 'Wet-dog'shake behaviour in the rat: a possible quantitative model of central 5-hydroxytryptamine activity. **Neuropharmacology**, v. 16, n. 10, p. 663-670, 1977.
- BLISS, Tim V.; COLLINGRIDGE, Graham L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31, 1993.,
- BRODIE, Martin J. et al. Effect of dosage failed of first antiepileptic drug on subsequent outcome. **Epilepsia**, v. 54, n. 1, p. 194-198, 2013..
- BUZSÁKI, György; WANG, Xiao-Jing. Mechanisms of gamma oscillations. **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 203-225, 2012..
- CALABRESI, PAOLO et al. Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. I. An in vivo analysis. **Journal of neurophysiology**, v. 63, n. 4, p. 651-662, 1990.
- CAVALHEIRO, ESPER A. et al. The pilocarpine model of seizures. **Models of seizures and epilepsy**, p. 433-448, 2006..
- CHEN, Christopher H. et al. Short latency cerebellar modulation of the basal ganglia. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 1767-1775, 2014..
- COLGIN, Laura Lee. Oscillations and hippocampal–prefrontal synchrony. **Current opinion in neurobiology**, v. 21, n. 3, p. 467-474, 2011..
- COTMAN, Carl W.; BERCHTOLD, Nicole C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002.
- DALBY, Nils Ole. GABA-level increasing and anticonvulsant effects of three different GABA uptake inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 12, p. 2399-2407, 2000..
- DAL-CÓL, Maria Luiza Cleto et al. Is dystonic posturing during temporal lobe epileptic seizures the expression of an endogenous anticonvulsant system?. **Epilepsy & Behavior**, v. 12, n. 1, p. 39-48, 2008.

DEL-BEL, E. A. et al. Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 8, p. 971-979, 1997..

DERANSART, C. et al. The role of basal ganglia in the control of generalized absence seizures. **Epilepsy research**, v. 32, n. 1, p. 213-223, 1998. Deransart, Colin, and Antoine

DERANSART, Colin; DEPAULIS, Antoine. The control of seizures by the basal ganglia? A review of experimental data. **Epileptic disorders**, v. 4, n. 3, p. 61-72, 2002. Doretto, M. C., and N. DORETTO, M. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Differential audiogenic seizure sensitization by selective unilateral substantia nigra lesions in resistant Wistar rats. **Physiology & behavior**, v. 58, n. 2, p. 273-282, 1995.

GALE, Karen. Subcortical structures and pathways involved in convulsive seizure generation. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 9, n. 2, p. 264-277, 1992.

GARCIA-CAIRASCO, Norberto. Puzzling challenges in contemporary neuroscience: insights from complexity and emergence in epileptogenic circuits. **Epilepsy & Behavior**, v. 14, n. 1, p. 54-63, 2009..

GAUSTAUT, H. Dictionary of Epilepsy. I. Definitions. **World Health Organisation, Geneva**, p. 75, 1973.

GELINAS, Jennifer N. et al. Interictal epileptiform discharges induce hippocampal-cortical coupling in temporal lobe epilepsy. **Nature medicine**, v. 22, n. 6, p. 641-648, 2016.

GIRARDEAU, Gabrielle et al. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 1222-1223, 2009..

HABU, Hitoshi et al. Seizures induced by α -guanidinoglutaric acid, a nitric oxide synthase inhibitor, are controlled by l-arginine. **IUBMB Life**, v. 39, n. 1, p. 87-95, 1996.

HAN, Chun-Lei et al. Electrical stimulation of hippocampus for the treatment of refractory temporal lobe epilepsy. **Brain research bulletin**, v. 109, p. 13-21, 2014.

HAYASHI, TAKASHI. The efferent pathway of epileptic seizures for the face following cortical stimulation differs from that for limbs. **The Japanese journal of physiology**, v. 3, p. 306-321, 1952.

HRAMOV, Alexander E. et al. **Wavelets in neuroscience**. Berlin, Germany:: Springer, 2015..

HU, Bing et al. Controlling absence seizures by tuning activation level of the thalamus and striatum. **Chaos, Solitons & Fractals**, v. 95, p. 65-76, 2017.

JOHNSON, Lise A. et al. Stored-trace reactivation in rat prefrontal cortex is correlated with down-to-up state fluctuation density. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 7, p. 2650-2661, 2010..

KAILA, Kai et al. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 637, 2014..

KAPLAN, David I.; ISOM, Lori; PETROU, Steven. 17. Role of Sodium Channels in Epilepsy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 6, 2016.).

KOLB, Bryan; WHISHAW, Ian Q. Plasticity in the neocortex: mechanisms underlying recovery from early brain damage. **Progress in neurobiology**, v. 32, n. 4, p. 235-276, 1989..

KORTE, Martin et al. Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 22, p. 12547-12552, 1996.

LADO, Fred A.; LAURETA, E. C.; MOSHÉ, Solomon L. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. **Epileptic disorders: international epilepsy journal with videotape**, v. 4, n. 2, p. 83-97, 2002..

LEIN, Ed S.; ZHAO, Xinyu; GAGE, Fred H. Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 15, p. 3879-3889, 2004.

LÖSCHER, Wolfgang; SCHMIDT, Dieter. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy research**, v. 2, n. 3, p. 145-181, 1988..

LÖSCHER, Wolfgang. Animal models of intractable epilepsy. **Progress in neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 239-258, 1997.

MARTIN, Stephen J.; GRIMWOOD, Paul D.; MORRIS, Richard GM. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 649-711, 2000.

MCHAFFIE, John G. et al. Subcortical loops through the basal ganglia. **Trends in neurosciences**, v. 28, n. 8, p. 401-407, 2005..

MCINTYRE, Dan C.; POULTER, Michael O.; GILBY, Krista. Kindling: some old and some new. **Epilepsy research**, v. 50, n. 1, p. 79-92, 2002.

NABAVI, Sadeh et al. Engineering a memory with LTD and LTP. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 348, 2014..

NOVY, J. et al. Epilepsy as a systemic condition: Link with somatic comorbidities. **Acta Neurologica Scandinavica**, 2017.

PASINI, Augusto; TORTORELLA, Alfonso; GALE, Karen. The anticonvulsant action of fluoxetine in substantia nigra is dependent upon endogenous serotonin. **Brain research**, v. 724, n. 1, p. 84-88, 1996..

REDGRAVE, P. et al. Anticonvulsant role of nigrotectal projection in the maximal electroshock model of epilepsy—I. Mapping of dorsal midbrain with bicuculline. **Neuroscience**, v. 46, n. 2, p. 379-390, 1992.

REDGRAVE, Peter; PRESCOTT, Tony J.; GURNEY, Kevin. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem?. **Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 1009-1023, 1999.

RODRIGUES, Marcelo Cairrão Araujo et al. Behavioral effects of bicuculline microinjection in the dorsal versus ventral hippocampal formation of rats, and control of seizures by nigral muscimol. **Epilepsy research**, v. 58, n. 2, p. 155-165, 2004. RODRIGUES, Marcelo Cairrão Araújo et al. Correlation between shaking behaviors and seizure severity in five animal models of convulsive seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 6, n. 3, p. 328-336, 2005..

ROGAWSKI, Michael A.; PORTER, Roger J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacological reviews**, v. 42, n. 3, p. 223-286, 1990.

ROSSETTI, Franco et al. EEG wavelet analyses of the striatum–substantia nigra pars reticulata–superior colliculus circuitry: Audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). **Epilepsy research**, v. 72, n. 2, p. 192-208, 2006..

RZEZAK, Patricia et al. The impact of intelligence on memory and executive functions of children with temporal lobe epilepsy: Methodological concerns with clinical relevance. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 21, n. 3, p. 500-506, 2017.

SENDROWSKI, Krzysztof; SOBANIEC, Wojciech. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 3, p. 555-565, 2013.

SHARMA, Rajeev; PACHORI, Ram Bilas. Classification of epileptic seizures in EEG signals based on phase space representation of intrinsic mode functions. **Expert Systems with Applications**, v. 42, n. 3, p. 1106-1117, 2015..

SHMUELY, S. et al. The heart of epilepsy: current views and future concepts. **Seizure**, v. 44, p. 176-183, 2017.

KANDEL, Eric R.; SQUIRE, Larry R. Memória: da mente às moléculas. **Porto Alegre: ArtesMédicas**, 2003.

STRANGE, Bryan A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655-669, 2014.

SWANSON, Larry W. Neuroanatomical Terminology: a lexicon of classical origins and historical foundations. Oxford University Press, USA, 2014

THOENEN, Hans. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. **Progress in brain research**, v. 128, p. 183-191, 2000..

THOMPSON, P. J. et al. Cognitive outcomes of temporal lobe epilepsy surgery in older patients. **Seizure**, v. 29, p. 41-45, 2015..

ENGEL, Tobias et al. ATPergic signalling during seizures and epilepsy. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 140-153, 2016.

TURSKI, L. et al. Excitatory neurotransmission within substantia nigra pars reticulata regulates threshold for seizures produced by pilocarpine in rats: effects of intranigral 2-amino-7-phosphonoheptanoate and N-methyl-D-aspartate. **Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 61-77, 1986.

USUI, Naotaka et al. Suppression of secondary generalization of limbic seizures by stimulation of subthalamic nucleus in rats. **Journal of neurosurgery**, v. 102, n. 6, p. 1122-1129, 2005.

VAN LENT, Michael; LAIRD, John E. Learning procedural knowledge through observation. In: **Proceedings of the 1st international conference on Knowledge capture**. ACM, 2001. p. 179-186.

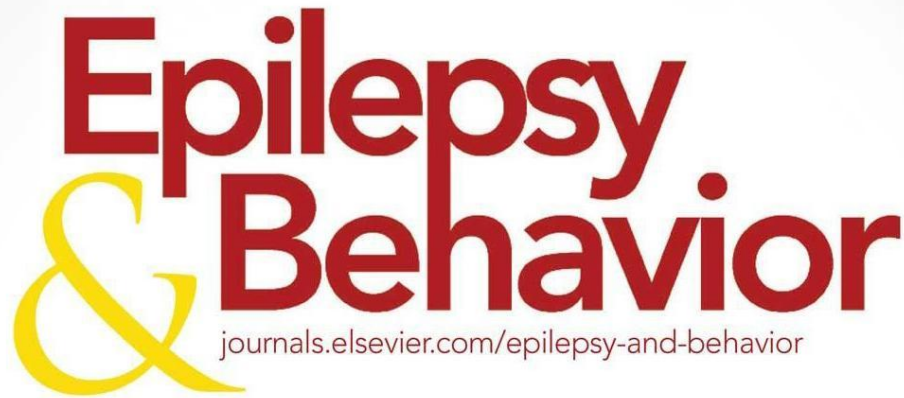
VELÍŠEK, Libor; VELÍŠKOVÁ, Jana; MOSHÉ, Solomon L. Electrical stimulation of substantia nigra pars reticulata is anticonvulsant in adult and young male rats. **Experimental neurology**, v. 173, n. 1, p. 145-152, 2002..

VINOGRADOVA, Lyudmila V. Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. **Epilepsy & Behavior**, 2015.

ZILLES, Karl. Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 174, n. 5, p. 383-391, 1992.-391.

ZRENNER, C. et al. Phase of brain oscillations determines the direction of induced plasticity in real-time EEG-triggered TMS. **Brain Stimulation**, v. 2, n. 10, p. 429, 2017.

APÊNDICE A - ARTIGO ORIGINAL – Endogenous anticonvulsant systems: the nigral caudal crusade and the forgotten striatum



Endogenous anticonvulsant systems: the nigral caudal crusade and the forgotten striatum

- **ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO:** *Epilepsy & Behavior*
- **FATOR DE IMPACTO:** 2.631
- **CAPES:** B1

Endogenous anticonvulsant systems: the nigral caudal crusade and the forgotten striatum

Igor Tchaikovsky Mello de Oliveira^{1,2}; Gabriel Henrique Lins¹; Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa^{1,2}; Norberto Garcia-Cairasco³; Pedro V. Carelli^{4,5}; Marcelo Cairrão Araujo Rodrigues^{1,2,4 *};

1. Group of Neurodynamics, Physiology and Pharmacology Department, Federal University of Pernambuco, Brazil;

2. Neuropsychiatry and Behavioral Sciences Postgraduation Program, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

3. Neurophysiology and Neuroethology Laboratory, Physiology Department, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo; Brazil;

4. Biomedical Engineering Postgraduation Program, Exact and Nature Sciences Center, Federal University of Pernambuco

5. Physics Department, Federal University of Pernambuco, Brazil;

Running title: Inhibition of substantia nigra increases neuronal firing rate in striatum

*Corresponding Author:

marcelo.carodrigues@ufpe.br;

Center of Biosciences (CB, UFPE)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 (Cidade Universitária)

Recife, Pernambuco

Brazil

CEP: 50670-901

Abstract

The endogenous anticonvulsant system is a group of functional connected neuronal networks capable of preventing seizures in animal models of epilepsy and epileptic patients. Basal ganglia and brainstem nuclei are involved in this control system. Inhibition of substantia nigra can prevent the occurrence of seizures, what has been attributed to disinhibition of nigral efferents such as superior colliculus (SC) and pedunculo pontine nucleus (PPN). Notwithstanding, disinhibition of striatum is also anticonvulsant, putatively by nigral silencing, but internal feedback loops from nigra to striatum, have being neglected in the context. Even though the dopaminergic subcortical loops from nigra to striatum its was well described, until now there is no direct evidence of electrophysiological effects in striatum associated with nigral inhibition. We tested the hypothesis that nigral inhibition would increase the neuronal firing rate in striatum, recorded with a multielectrode array. Bilateral microinjection of diazepam in the substantia nigra pars reticulata resulted in statistically significant increase in the firing rate of striatum neurons compared to saline treated and sham controls. Whether the activation of striatum is part of the endogenous protection against seizure or an epiphenomenon remains unclear. However, present results firmly indicate that striatum is recruited within the classic nigral inhibition and can be an active part of the endogenous anticonvulsant system.

1. Introduction

The endogenous anticonvulsant system (EAS) is a group of functional connected neuronal networks capable of preventing seizures in animal models of epilepsy (Hayashi, 1952; Gale and Iadarola, 1980; Garcia-Cairasco & Sabbatini, 1983; Moshe et al. 1994, Depaulis et al 1994) and human epileptic patients (Dal-cól et al. 2008). There are evidences suggesting that the basal ganglia subcortical loops system can avoid the occurrence of seizures and could participate in epilepsy control (Hayashi, 1952; Gale and Iadarola, 1980; McNamara et al, 1984; Garant & Gale, 1986; Gale. 1989; Deransart and Depaulis, 2002, Rodrigues et al. 2004, McHaffie et al 2005; Rossetti et al 2006). The Inhibition of substantia nigra pars reticulata (SNPr) has been described as an important antiepileptic procedure in different animal models (Gale et al 1980; Iadarola & Gale, 1982; Garant & Gale, 1983; Okada et al 1989; Velíšek et al. 2002; Velíšková et al. 2006). GABAergic manipulations in the SNPr of adult rats, such as inhibition of GABA degradation enzyme (Gale & Iadarola, 1980) or GABAergic agonist microinjections have a sustained anticonvulsant effect in different animal models such as flurothyl gas (Moshe et al 1994), pilocarpine (Turski et al. 1986a, Turski et al. 1986b), kindling (McNamara 1984), electroshock (Iadarola et al. 1982) convulsant microinjections in area tempestas (Maggio et al. 1989) and hippocampus (Rodrigues et al. 2004). Due to this fact, the functionality of the EAS has sometimes been reduced to “nigral control of epilepsy” (Depaulis et al, 1994), a denomination that clearly excludes other brain nuclei in this homeostatic fight for avoiding the abnormal synchronicity of epileptic seizures.

When considering the candidate circuits for the anticonvulsant activity involving nigral inhibition, it has been attributed crucial role to its efferents to superior coliculus (nigrotectal) and to pedunclopontine nucleus (nigrosegmental). The disinhibition of superior coliculus by silenced nigro-tectal projections (Garant & Gale, 1987; Dean & Gale, 1989) or tectal bicuculline microinjections has proved effective in seizure control (Redgrave et al. 1992a; Redgrave et al. 1992b; Shehab et al. 1995a; Shehab et al. 1995b; Shehab et al. 1995c). Similarly, infusion of GABA antagonist in pedunclopontine nucleus reduced pentilenetetrazole induced seizures (Shehab et al, 1997). These articles demonstrate the aims pursued by many groups since Gale's pioneer studies: the search for the most important rostro-caudal nigral efferent responsible for seizure control (that has being informally referred to as the “caudal

crusade”). In spite of its importance, another rationale returns for rostral structures related to seizure detection and active seizure suppression. Central questions from the endogenous anticonvulsant systems (EAS) are still unanswered: how is it possible for the EAS to normally detect the presence of dangerous epileptic activity? What mechanisms trigger nigral inhibition, and what is the role of other brain nuclei in seizure control? In this context, striatum reemerges as a key structure that has being set aside during the “caudal crusade”. It is the entrance of basal ganglia, receiving excitatory input from cerebral cortex, and generating two pathways (the direct and the indirect) (Bolam et al, 2000), with multiple sequenced inhibitory synapses (Chevalier et al 1985; Deniau & Chevalier, 1985), both aimed to the exit nuclei of basal ganglia, SNPr. There are many descriptions of anticonvulsant properties deriving from striatum, generally disinhibitions, what has been putatively attributed to ulterior nigral inhibition: amygdala kindling (Cavalheiro and Turski, 1986), local bicuculline in deep prepiriform cortex, systemic pilocarpine, bicuculline and kainic acid (Turski et al 1989). Nevertheless, since Garant and Gale (1987) aimed to establish the most important nigral output pathways, the role of striatum in seizure control has vanished compared to the nigra-tectal fibers to superior colliculus. Notwithstanding, as striatum disinhibition has proved to be anticonvulsant, this nucleus should also be seen as an important regulatory site for EAS. Even though the anticonvulsant effect per se is generated in superior colliculus and pedunculopontine nucleus, striatum reverbering internal loops within the basal ganglia or external loops through thalamus could serve for seizure detection porpoises or/and sustained nigral tonic inhibition. Despite the importance of striatum for seizure control and its anatomical and physiological integration with SNPr, there is no descriptions of its neuron’s firing rate profile after nigral inhibition. It could be hypothesized that nigral inhibition would increase striatum firing rate, but this needs confirmation, as a proof of concept.

Differently from the 1980’s decade, there is now technological availability of thin (50 microns or less) multielectrode arrays for firing rate detection and spike sorting analysis, witch as suitable for pursuing the still unanswered questions within the EAS. The aim of this work was to measure striatum’s neurons firing rate after nigral bilateral inhibition with diazepam.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Eleven male adult wistar rats (60-90 days; 250-300g) were used from Physiology and Pharmacology department, Federal University of Pernambuco. The animals were randomly assigned into 2 groups: 1) control (n = 5) that received sham manipulation; 2) experimental group (n = 6) which receive real injection of saline and, 20 min later, diazepam. Animals were kept on standard rack for rats (Alesco, Monte Mor, Brazil) with water and food ad libitum, with control of temperature (23-25°C) and 12h light/dark cycle. All animal were performed following the recommendations requirements of the National Council for Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by ethics committee from Federal University de Pernambuco (CEUA: protocol no. 23076.018110/2013-72). All efforts were made in order to avoid any unnecessary animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2 Acquisition and analysis of local field potential (LFP) and firing rate activity

Animals received preanesthetic enflurane gas and then deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After craniotomy and duramater resection, a local made tungsten multielectrode array (32 electrodes, outer diameter 50 mm, California Fine Wire Company, CA, USA), was implanted on the left striatum, with the coordinates in reference to bregma in anterior–posterior (AP)=1.56 mm; lateral (L)=-3.0 mm; ventral (V)=3.7 mm (Paxinos & Watson 2002). Rats were kept anesthetized during experimental procedure. Multielectrode contact with the cortical surface was used to set a zero level. The electrode impedances ranged from 50 to 150 k Ω . Two cannulae were positioned for microinjection of bilateral DZP (0,2 μ l of solution of 2.5 mg/ml in saline) in SNPr (AP=-5.0mm; L=-2.6mm and +2.6mm respectively; V=-8.5 mm) (Paxinos & Watson 2007).

2.3 Experimental protocol for microinjections

After positioning the multielectrod array in striatum, recordings were acquired using a RZ2 Tucker-Davis-Technology (FL, USA) amplifier. Multiunit signal was acquired 3KHz sample rate, pre-amplified, filtered (bandpass: 0.5–5 kHz), amplified 20.000x and both local field potential (LFP) and firing rate activity were recorded for offline analysis. Microinjections were performed with 30G cannulae and a PE10 polyethylene tubing connected to a 10 microlitter Hamilton syringe, with the aid of a

semiautomatic pump (Insight, Ribeirao Preto, Brazil). One minute after the end of microinjections, LFP started being recorded for 10 min. For the experimental group, data was organized as follows. Block 1 (basal period). Striatum recording starts from the beginning of experiment and before any microinjection. Block 2 (saline, recorded 20 to 30 min after basal recording). Striatum firing rate is recorded after bilateral microinjection of 0.9% saline in the substantia nigra pars reticulata (SPNr, 0.2 μ l / 2 min). Block 3 (diazepam, recorded 40 to 50 min after basal recording). Striatum recording after bilateral nigral microinjection of diazepam (same volume and velocity). The whole experimental procedure lasted about 1h. Sham controls were anesthetized the same way, had equal brain implant of electrodes for striatum recording, and the injection cannulae was positioned in SNPR, but nothing was injected. Recordings were done at equivalent time.

2.4 Wavelet Analysis for Sustained Oscillations

Wavelet transform (WT) analysis, as a nonstationary method for analyzing signals that manifest dynamic components and a variety of frequencies, provides good information in time domain [15-17]. In order to quantify the oscillatory pattern of local field potential of striatum after nigral saline or diazepam, recordings were submitted to a wavelet analysis for sustained oscillations, as described previously (ROMCY-PEREIRA et al 2008). This analysis unveils if a certain frequency range is sustained, that is, if it exists for a prolonged time. Briefly, the sustained oscillations of sham group and the experimental group were performed in the electroencephalographic record of local field potential using the channel 18 of the multi electrode array. Sustained oscillations were analyzed in 5 frequency ranges (FR): FR1 (4 to 6 Hz), FR2 (6 to 10 Hz), FR3 (10 to 15 Hz), FR4 (15 to 20 Hz) and FR5 (20 to 40 Hz). In all these FR, it was used a mother wavelet of Morlet type, with a step of 0.1 Hz. The result image was binarized, and scanned by boxes of 200 ms length, and height of FR (eg. for FR1, the height was from 4 to 6 Hz, respectively). The method works as described if a box finds binarized signal, it calculates its duration. If an interruption appears, and lasts for more than 200 ms, it is considered as another epoch. If the interruption lasts less than 200 ms, the interruption is not considered, it is assumed that the oscillation is sustained for as long as the signal takes.

2.5 Histological analysis

After all experiments the rats received anti-inflammatory and antibiotic (Cantrimol 0,1 mL/100 g) and remained in ventilated shelf (Alesco) for five days until euthanasia, as to permit brain own organization and microglial aggregation around electrode tips. Animals were euthanized by transcardiac perfusion under excess anesthesia (Enflurane), and perfusion with 50 ml of PBS (50mM, pH 7.4) and 300 ml of paraformaldehyde in PBS (PFA 4%, pH 7.4). The period between the experiment and the euthanasia allowed the tissue respond to mechanical stimuli positioning of the array with microglial reactivity. After perfusion the brains were placed in ascending sucrose solution (10%, 20% and 30%) for dehydration, sectioned and stored in a freezer at -4°F in cryoprotectant solution for histological analysis

Brain tissue was cut in coronal slices of 50µm using a cryostat (Leica CM1860) to evaluate the stereotactic placement of thee multi electrode array in CS. The tissue was revealed through tissues treatment with anti-IBA1 antibody (Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1), that is reactive to microglia. Also, a more affordable and inexpensive method of histochemical determination by a battery of hematoxylin and eosin (HE) was tested and validated as reproducible (shown in SI).

2.6 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 5.0. For all analyzes the unpaired Student t test was used for comparison between the control and experimental groups for parametric data and the Mann-Whitney test for nonparametric data. Differences between groups were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Firing Rate

We have calculated the global firing rate for all experimental conditions. Figure 1 shows the normalized firing rate results. In the experimental group, bilateral microinjection of DZP in the SNPr caused a significant increase (47%) in the firing rate recorded in the striatum. The sham group showed a progressive decrease in the firing rate firing rate of 14% recorded 20' and 34% recorded 40' after sham injection procedure (Figure1, inset).

3.2 LFP sustained oscillations

The LFP signal was obtained by band pass filtering (1 Hz to 1kHz) the original signal and recorded at 3 kHz sampling rate. Figure 2 shows duration of oscillations in the frequency ranges studied. There was no difference in sustained oscillations in sham controls (Figure 2A), between 20 and 40 min after basal. In the experimental group we observed a statistically significant decrease of sustained oscillations in the slower frequencies (6-10 and 10-15 Hz, FR 2 and 3, respectively) after nigral diazepam, compared to nigral saline microinjection (Figure 2B).

4. DISCUSSION

The main find of present work is the proof of concept that nigral inhibition increases the firing rate in striatum. This effect could seem logical by the inhibitory effects of basal ganglia over thalamus, and its excitatory influence over cerebral cortex, and finally, its stimulation over striatum. Notwithstanding, this phenomenon needed demonstration, especially if one is trying to understand how does the endogenous anticonvulsant systems work.

In addition, the LFP recorded from striatum after nigral diazepam showed a shortening of oscillations, especially the slower frequency ranges (6 to 15Hz). There was a tendency of decrease (not confirmed statistically) in oscillation sustaining of frequency range 1 (4 to 6 Hz). This not seen in faster ranges (FR 4 and 5). This correlates well with the increase in neuronal firing rate seen in striatum after nigral inhibition. One possible explanation is that neurons from striatum had an increase in neuronal firing, decreasing LFP oscillation of slower frequencies. However, it could

be expected an increase in faster oscillations, what did not happen. Our results cannot explain this fact.

5. Figure legends

Figure 1. Firing rate in the striatum under SNPr inhibition. Bilateral microinjection of diazepam in SNPr increased striatum-firing rate. In sham controls with no real microinjection, it could be seen a decrease in the firing rate of striatum (inset). * $p < 0,05$, Wilcoxon paired test.

Figure 2. Sustained oscillations of LFP recorded in the striatum after sham manipulation (A) or nigral microinjections (B). A. Sham controls only had the introduction of injection cannula in SNPr, but no microinjection, at 20' (striped bars) and 40' (grey bars) after basal. B. Experimental group with real microinjections. Compared to nigral saline (black blocs), bilateral diazepam (white blocs) induced a decrease in sustained oscillations in the FR 2 and 3 (6-10 and 10-15 Hz, respectively). There was a tendency (not confirmed statistically) of decrease also in FR 1 (4-6 Hz). Frequency ranges (FR): 1 (4-6 Hz); 2 (6-10 Hz); 3 (10-15 Hz); 4 (15-20 Hz); 5 (20-40 Hz). * $p < 0.05$, Wilcoxon paired test.

6. Figures

Figure 1

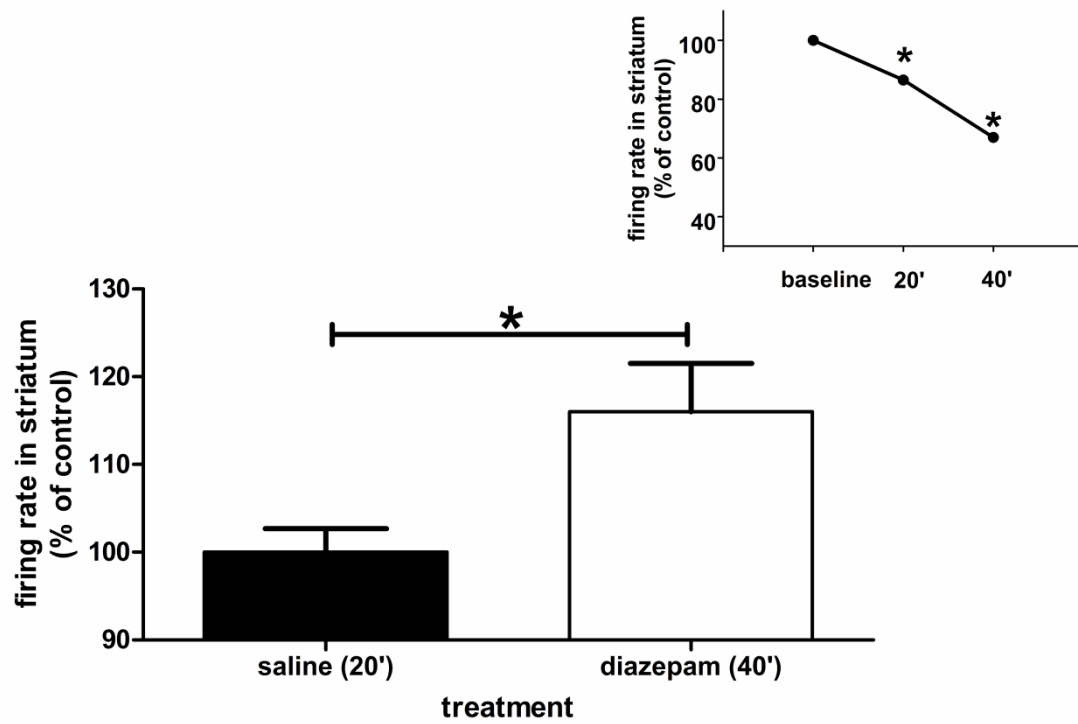
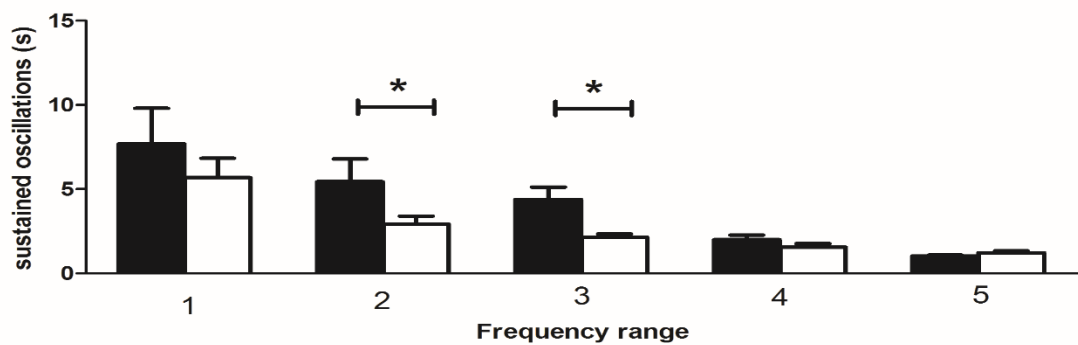
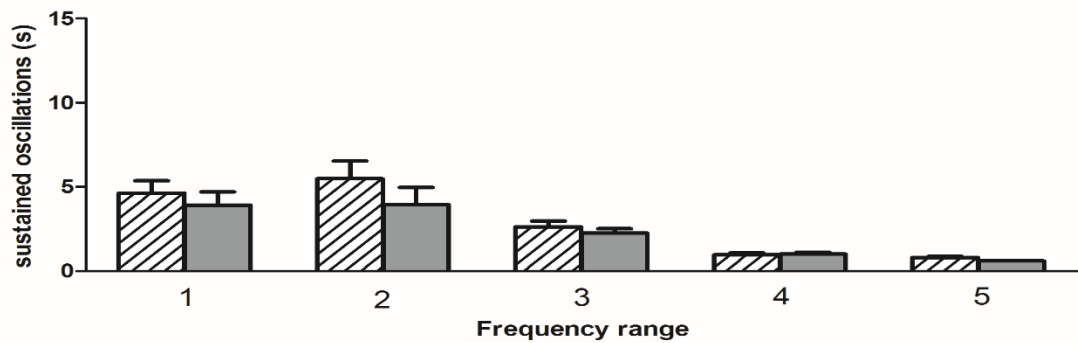


Figure 2

REFERENCES

- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A. C., & Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of anatomy*, 196(04), 527-542.
- Cavalheiro, E. A., & Turski, L. (1986). Intrastriatal N-methyl-D-aspartate prevents amygdala kindled seizures in rats. *Brain research*, 377(1), 173-176
- Chevalier, G., Vacher, S., Deniau, J. M., & Desban, M. (1985). Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. I. The striato-nigral influence on tecto-spinal/tecto-diencephalic neurons. *Brain research*, 334(2), 215-226.
- Dal-Cól, M. L. C., Bertti, P., Terra-Bustamante, V. C., Velasco, T. R., Rodrigues, M. C. A., Wichert-Ana, L., ... & Garcia-Cairasco, N. (2008). Is dystonic posturing during temporal lobe epileptic seizures the expression of an endogenous anticonvulsant system?. *Epilepsy & Behavior*, 12(1), 39-48.

- Dean, P., & Gale, K. (1989). Anticonvulsant action of GABA receptor blockade in the nigroreticular target region. *Brain research*, 477(1-2), 391-395.
- Deniau, J. M., & Chevalier, G. (1985). Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigral influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus. *Brain research*, 334(2), 227-233.
- Depaulis, Antoine, Marguerite Vergnes, and Christian Marescaux. "Endogenous control of epilepsy: the nigral inhibitory system." *Progress in neurobiology* 42.1 (1994): 33-52.
- Deransart, C., & Depaulis, A. (2002). The control of seizures by the basal ganglia? A review of experimental data. *Epileptic disorders*, 4(3), 61-72.
- Gale, Karen, and Michael J. Iadarola. "Seizure protection and increased nerve-terminal GABA: delayed effects of GABA transaminase inhibition." *Science* 208.4441 (1980): 288-291.
- Gale, Karen. "GABA in epilepsy: the pharmacologic basis." *Epilepsia* 30.s3 (1989): S1-S11.
- Garant, D. S., & Gale, K. (1987). Substantia nigra-mediated anticonvulsant actions: role of nigral output pathways. *Experimental neurology*, 97(1), 143-159.
- Garant, Douglas S., and Karen Gale. "Lesions of substantia nigra protect against experimentally induced seizures." *Brain research* 273.1 (1983): 156-161.
- Garant, Douglas S., and Karen Gale. "Substantia nigra-mediated anticonvulsant actions: role of nigral output pathways." *Experimental neurology* 97.1 (1987): 143-159.
- Garant, Douglas, and Karen Gale. "Intranigral muscimol attenuates electrographic signs of seizure activity induced by intravenous bicuculline in rats." *European journal of pharmacology* 124.3 (1986): 365-369.
- Garcia-Cairasco, N., & Sabbatini, R. M. (1983). Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...*[et al.], 16(2), 171-183.
- Hayashi, T. (1952). The efferent pathway of epileptic seizures for the face following cortical stimulation differs from that for limbs. *The Japanese journal of physiology*, 3, 306-321.

- Iadarola, Michael J., and Karen Gale. "Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid." *Science* 218.4578 (1982): 1237-1240.
- Maggio, R., & Gale, K. (1989). Seizures evoked from area tempestas are subject to control by GABA and glutamate receptors in substantia nigra. *Experimental neurology*, 105(2), 184-188.
- McHaffie, J. G., Stanford, T. R., Stein, B. E., Coizet, V., & Redgrave, P. (2005). Subcortical loops through the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, 28(8), 401-407.
- McNamara, J. O., Galloway, M. T., Rigsbee, L. C., & Shin, C. H. E. O. L. S. U. (1984). Evidence implicating substantia nigra in regulation of kindled seizure threshold. *The Journal of neuroscience*, 4(9), 2410-2417.
- Moshé, S. L., Brown, L. L., Kubová, H., Velíšková, J., Zukin, R. S., & Sperber, E. F. (1994). Maturation and segregation of brain networks that modify seizures. *Brain research*, 665(1), 141-146.
- Okada, R Natsumi Negishi and Hiroshi Nagaya. The role of the nigrosegmental GABAergic pathway in the propagation of pentylenetetrazol induced seizures. *Brain Research*, 480 (1989) 383- 387
- Redgrave, P., Marrow, L. P., & Dean, P. (1992b). Anticonvulsant role of nigrotectal projection in the maximal electroshock model of epilepsy—II. Pathways from substantia nigra pars lateralis and adjacent peripeduncular area to the dorsal midbrain. *Neuroscience*, 46(2), 391-406.
- Redgrave, P., Simkins, M., Overton, P., & Dean, P. (1992a). Anticonvulsant role of nigrotectal projection in the maximal electroshock model of epilepsy—I. Mapping of dorsal midbrain with bicuculline. *Neuroscience*, 46(2), 379-390.
- Rodrigues, M. C. A., de Oliveira Beleboni, R., Coutinho-Netto, J., dos Santos, W. F., & Garcia-Cairasco, N. (2004). Behavioral effects of bicuculline microinjection in the dorsal versus ventral hippocampal formation of rats, and control of seizures by nigral muscimol. *Epilepsy research*, 58(2), 155-165.
- Rossetti, F., Rodrigues, M. C. A., de Oliveira, J. A. C., & Garcia-Cairasco, N. (2006). EEG wavelet analyses of the striatum–substantia nigra pars reticulata–superior colliculus circuitry:

Audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy research*, 72(2), 192-208.

Romcy-Pereira, R. N., de Araujo, D. B., Leite, J. P., & Garcia-Cairasco, N. (2008). A semi-automated algorithm for studying neuronal oscillatory patterns: a wavelet-based time frequency and coherence analysis. *Journal of neuroscience methods*, 167(2), 384-392.

Shehab, S., et al. "The dorsal midbrain anticonvulsant zone—I. Effects of locally administered excitatory amino acids or bicuculline on maximal electroshock seizures." *Neuroscience* 65.3 (1995a): 671-679.

Shehab, S., et al. "The dorsal midbrain anticonvulsant zone—III. Effects of efferent pathway transections on suppression of electroshock seizures and defence-like reactions produced by local injections of bicuculline." *Neuroscience* 65.3 (1995b): 697-708.

Shehab, S., P. Dean, and P. Redgrave. "The dorsal midbrain anticonvulsant zone—II. Efferent connections revealed by the anterograde transport of wheatgerm agglutinin-horseradish peroxidase from injections centred on the intercollicular area in the rat." *Neuroscience* 65.3 (1995c): 681-695.

Shehab, Safa, et al. "Regional distribution of the anticonvulsant and behavioural effects of bicuculline injected into the pontine reticular formation of rats." *European Journal of Neuroscience* 9.9 (1997): 1875-1884.

Turski, L., Cavalheiro, E. A., Calderazzo-Filho, L. S., Bortolotto, Z. A., Klockgether, T., Ikonomidou, C., & Turski, W. A. (1989). The basal ganglia, the deep prepyriform cortex, and seizure spread: bicuculline is anticonvulsant in the rat striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(5), 1694-1697.

Turski, L., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Turski, W. A., de Moraes Mello, L. E., Bortolotto, Z. A., ... & Sontag, K. H. (1986a). Susceptibility to seizures produced by pilocarpine in rats after microinjection of isonazid or γ -vinyl-GABA into the substantia nigra. *Brain research*, 370(2), 294-309.

Turski, L., Cavalheiro, E. A., Turski, W. A., & Meldrum, B. S. (1986b). Excitatory neurotransmission within substantia nigra pars reticulata regulates threshold for seizures produced by pilocarpine in rats: effects of intranigral 2-amino-7-phosphonoheptanoate and N-methyl-D-aspartate. *Neuroscience*, 18(1), 61-77.

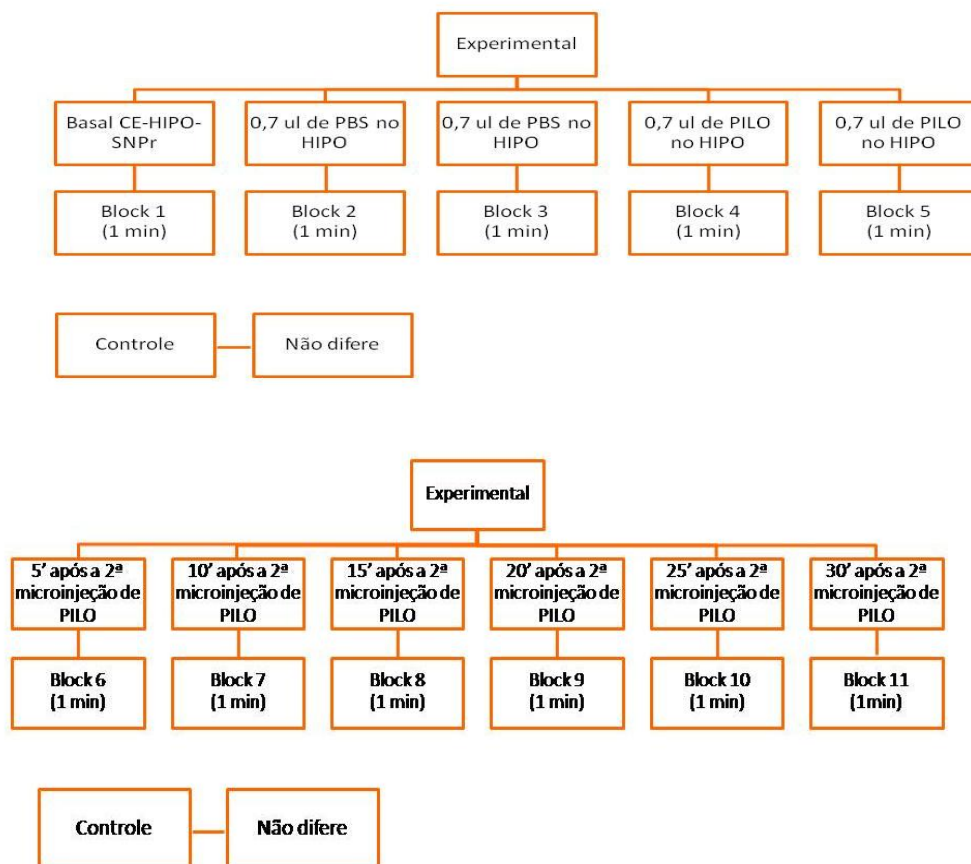
Velíšek, Libor, Jana Velíšková, and Solomon L. Moshé. "Electrical stimulation of substantia nigra pars reticulata is anticonvulsant in adult and young male rats." *Experimental neurology* 173.1 (2002): 145-152.

Velíšková, Jana, and Solomon L. Moshé. "Update on the role of substantia nigra pars reticulata in the regulation of seizures." *Epilepsy Currents* 6.3 (2006): 83-87.

APÊNDICE B

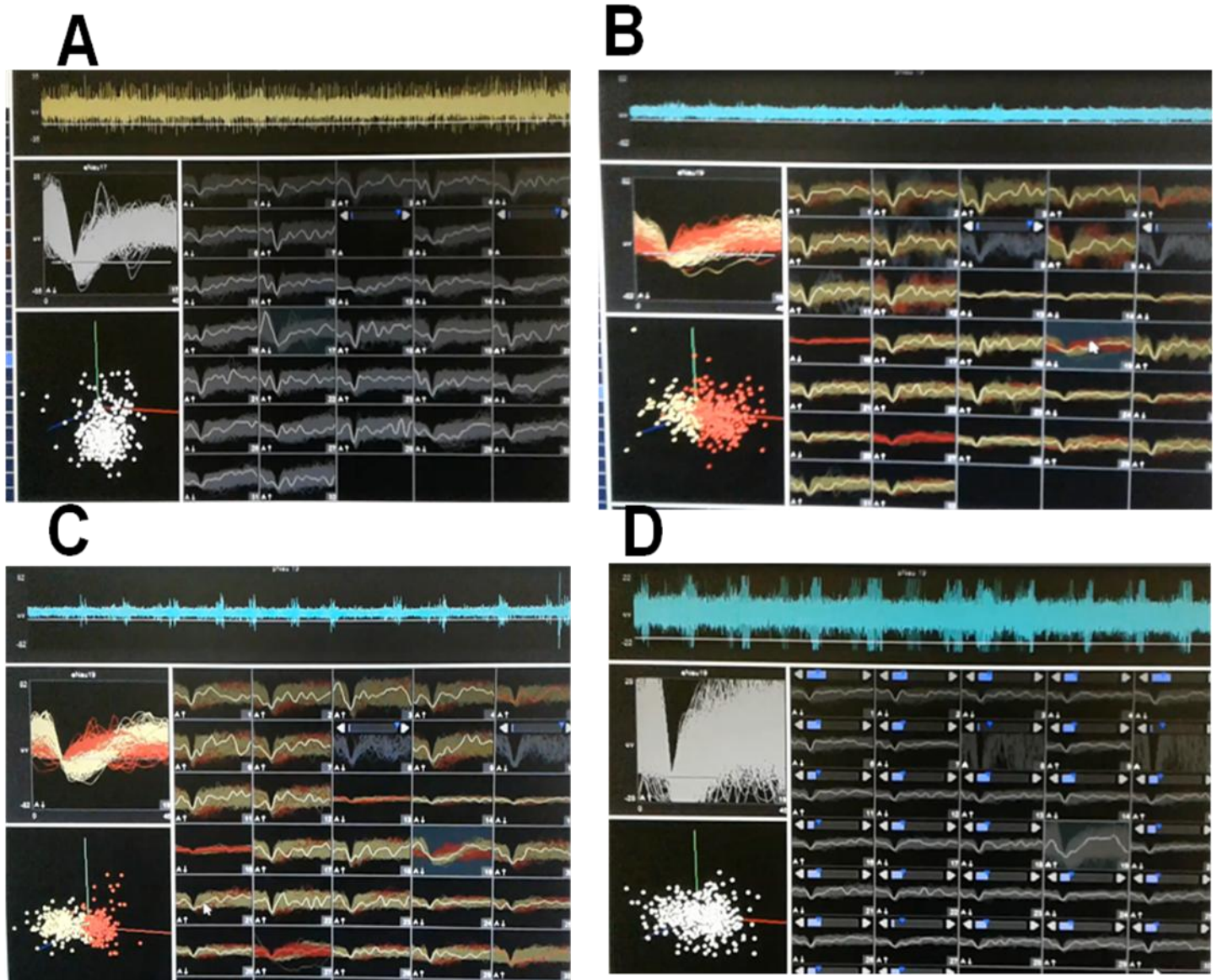
- **Modelo de geração de crises convulsivas por pilocarpina**

O experimento para geração de crises é somente feito nos dias 9 e 16. O experimento se divide em 12 blocos de aquisição. *Block 1*, registro basal. *Block 2*, registro basal. *Block 3*, é feito a microinjeção de 0,7µL de PBS (phosphate buffered saline, pH 7,4) e logo após feita a aquisição registro. *Block 4*, consiste na repetição do procedimento anterior. *Block 5*, é feita a microinjeção de 0,7µL de PILO e logo após feita a aquisição do registro. *Block 6*, consiste na repetição do procedimento anterior. *Block 7*, cinco minutos após a segunda microinjeção de PILO é então feita aquisição do registro. *Block 8*, dez minutos após a segunda microinjeção de PILO é feita aquisição do registro. *Block 9*, quinze minutos após a segunda microinjeção de PILO é feita aquisição do registro. *Block 10*, vinte minutos após a segunda microinjeção de PILO é feita aquisição do registro. *Block 11*, vinte e cinco minutos após a segunda microinjeção de PILO é feita aquisição do registro. *Block 12*, trinta minutos após a segunda microinjeção de PILO é feita aquisição do registro. Os animais do grupo controle para o experimento de pilorcapina recebem o mesmo procedimento experimental sem diferir nada. Veja a figura abaixo para melhor entendimento.



Delineamento experimental para geração de crises convulsivas no modelo de pilorcapina intrahipocampal.

APÊNDICE C



Imagens de registro unitário do momento da cirurgia esterotáxica de introdução da matriz de multieletrodos. Podemos acompanhar pelo registro o melhor local de implante no hipocampo e assim acompanhar a diversas áreas do cérebro

A- Registro unitário do córtex. **B-** Registro unitário do corpo caloso. **C-** Registro unitário do hipocampo. **D-** Registro unitário do hipocampo e local de escolha para fixação da matriz.

ANEXO A

- **Parecer CEUA - UFPE**



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 27 de dezembro de 2016.

Ofício nº 132/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.016697/2016-28**

Certificamos que a proposta intitulada “**Circuitos neurais envolvidos no controle endógeno de crises convulsas**”, registrada com o nº **23076.016697/2016-28**, sob a responsabilidade de Prof. Dr. **Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/12/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 11/2017
Espécie/linhagem/raça	Ratos Long-Evans
Nº de animais	30
Peso/Idade	250-300g/60-90 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Física da UFPE

Atenciosamente,

Pedro V. Lorelli

ANEXOB

- **Declaração depósito de patente DINE - UFPE**