

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**O EFEITO DA EPILEPSIA E DOS FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS NA
POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO HIPOCAMPAL**

Clauber Jänisch
Mestrando

Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa
Orientador

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Neurociências, pela
Universidade Federal do Rio grande do
Sul.

Porto Alegre
2003

Jänisch, Clauber José

O efeito da epilepsia e dos fármacos antiepilépticos na potenciação de longa duração hipocampal. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

XI, 80f

Dissertação: Mestre em Neurociências.

1. Potenciação de longa duração 2. Epilepsia 3. Fármacos antiepilépticos
4. Esclerose Mesial Temporal.

I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

II. Título.

Dedico esta tese à minha esposa Ana Paula.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. **Jaderson Costa da Costa**, cuja gratidão será difícil exprimir em palavras, não só pela orientação nesta tese, que foi crucial, mas também pela oportunidade de manter contato com sua mente brilhante, cujos atos e palavras levo para vida.
- À Prof. Dra. **Sidia M. Callegari-Jacques**, por sua preciosa e agradável ajuda nas análises estatísticas, as quais consegue transmitir com uma clareza excepcional.
- À colega de mestrado e amiga, a psicóloga **Thirzá B. Frison**, pela agradável parceria no aprendizado e desenvolvimento da técnica da LTP.
- Às colegas de laboratório e amigas, as biólogas **Simoni Salamoni e Andréa Tavares**, por me ensinarem a diversas técnicas de laboratório que foram inestimáveis para realizar os experimentos.
- Ao técnico em eletrônica e acadêmico de engenharia elétrica **Ricardo Vaz Breda**, que muito me ensinou sobre o funcionamento dos aparelhos de eletrofisiologia e auxiliou na sua manutenção.
- À acadêmica de medicina **Cristiane Baes**, pelas várias horas dispensadas ao meu auxílio na análise dos dados e gráficos.
- À Jornalista **Lúcia M. Barros da Silveira**, pela correção da escrita realizada tão prontamente, me auxiliando a encontrar as palavras corretas.

Sem eles esta tese não teria sido realizada.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	01
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
2.1. Epilepsia.....	05
2.2. Os fármacos antiepilépticos.....	08
2.3. Cognição, epilepsia e fármacos antiepilépticos.....	10
2.4. Potenciação de longa duração: o modelo sináptico de memória e aprendizado.....	14
2.5. Estrutura e circuitária hipocampal.....	17
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Amostra.....	25
4.2. Indução da epilepsia do lobo temporal pelo modelo da pilocarpina.....	27
4.3. Constituição do grupo controle.....	30
4.4. Delineamento experimental e subgrupos.....	31
4.5. A obtenção das fatias de hipocampo para o estudo <i>in vitro</i>	32
4.6. Os instrumentos para a realização dos registros eletrofisiológicos	36
4.7. Aquisição dos registros eletrofisiológicos e a indução da LTP	40
4.8. Análise dos registros eletrofisiológicos obtidos	42

4.9. Os fármacos em estudo: diluição e administração	45
4.10. Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. A probabilidade de obtenção e manutenção da LTP em ratos controle e epiléticos.....	50
5.2. Análise do efeito da perfusão das fatias com FAEs nos parâmetros da LTP em ratos controle	51
5.3. Análise do efeito da perfusão das fatias com FAEs nos parâmetros da LTP em ratos epiléticos.....	54
6. DISCUSSÃO.....	57
6.1. A probabilidade de obtenção e manutenção da LTP em ratos controle e epiléticos.....	58
6.2. O efeito dos FAEs na LTP de ratos controle.....	61
6.3. O efeito dos FAEs na LTP de ratos com epilepsia crônica	63
7. CONCLUSÕES.....	66
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
10. ANEXO – Gráficos dos registros eletrofisiológicos.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA= receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

ANOVA= análise de variância

APV= 2-amino-5-fosfonovalerato

CA= *Cornu Ammonis*

CBZ= carbamazepina

CNQX= 6-ciano-7-nitro-quinoxalina-2,3-diona

DMSO= dimetil-sulfóxido

DPH= difenil-hidantoína

ELT= epilepsia do lobo temporal

ESM= etossuximida

ETM= esclerose temporal mesial

FAE= fármaco antiepiléptico

FB= fenobarbital

GD= giro denteado

LTP= do inglês “*long-term potentiation*”, potenciação de longa duração
ou potenciação de longo prazo

PEPS= potencial excitatório pós-sináptico

PKC= proteína cinase C

PRM= primidona

SE= *status epilepticus*

VPA= valproato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico típico de LTP.....	15
Figura 2: Esquema da formação hipocampal e estruturas associadas.....	18
Figura 3: Secção transversal da formação hipocampal.....	19
Figura 4: Diagrama esquemático do circuito trissináptico hipocampal.....	20
Figura 5: Resultados da infusão de pilocarpina durante a formação do grupo epiléptico.....	26
Figura 6: Delineamento experimental do grupo epiléptico.....	27
Figura 7: Delineamento experimental do grupo controle.....	30
Figura 8: Realização da craniotomia.....	33
Figura 9: Retirada do encéfalo da caixa craniana.....	33
Figura 10: Encéfalo colado juntamente com o ágar sobre a lamínula para ser fatiado.....	34
Figura 11: Vibrátomo.....	35
Figura 12: Fatias encefálicas em Ringer normal sob constante oxigenação.....	35
Figura 13: Imagem sob lupa cirúrgica de uma fatia cerebral durante a dissecação	36
Figura 14: Montagem dos equipamentos de eletrofisiologia.....	37
Figura 15: Fatia hipocampal mostrando o posicionamento dos eletrodos.....	39
Figura 16: Ilustração dos equipamentos para realizar os registros eletrofisiológicos.....	40
Figura 17: Delineamento do estudo eletrofisiológico para registro da LTP.....	41
Figura 18: Medição da amplitude do PEPS.....	42
Figura 19: Medição da inclinação do PEPS.....	43
Figura 20: Gráfico típico de LTP.....	44
Figura 21: Delineamento experimental básico utilizadas para análise estatística.....	45
Figura 22: Gráfico do efeito dos fármacos no grupo controle.....	52
Figura 23: Gráfico do efeito dos fármacos no grupo epiléptico.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação internacional das crises epiléticas (ILAE).....	06
Tabela 2. Medicções anti-epiléticas por tipos de crise.....	09
Tabela 3: Distribuição dos ratos na estruturação dos grupos	26
Tabela 4: Escala de Racine.....	28
Tabela 5: Delineamento Experimental e subgrupos.....	31
Tabela 6: A concentração dos FAEs utilizados.....	46
Tabela 7: Validação dos registos.....	49
Tabela 8: Obtenção da LTP dos ratos controles e epiléticos.....	50
Tabela 9: Média de aumento da amplitude nos grupos controle e epilético.....	51
Tabela 10: Média de aumento da inclinação nos grupos controle e epilético...	51
Tabela 11: Efeito dos FAEs na obtenção da LTP em ratos controle.....	52
Tabela 12: Efeito dos FAEs na média da amplitude dos que obtiveram LTP nos ratos controle.....	53
Tabela 13: Efeito dos FAEs no aumento da inclinação dos ratos controle que obtiveram LTP.....	53
Tabela 14: Potenciação da inclinação em estudos que obtiveram e não obtiveram LTP conforme o FAE em ratos controle.....	53
Tabela 15: Efeito dos FAEs na obtenção da LTP em ratos epiléticos.....	55
Tabela 16: Efeito dos FAEs na média da amplitude dos que obtiveram LTP nos ratos epiléticos.....	55
Tabela 17: Efeito dos FAEs no aumento da inclinação dos ratos epiléticos que obtiveram LTP.....	56
Tabela 18: Potenciação da inclinação em estudos que obtiveram e não obtiveram LTP conforme o FAE em ratos epiléticos.....	56

RESUMO

A epilepsia é uma condição crônica freqüentemente acompanhada de distúrbio cognitivo. Na maior parte das vezes, é difícil saber o quanto isso se deve à patologia de base que provoca as crises epiléticas, as crises epiléticas por si ou ao seu tratamento com fármacos antiepiléticos (FAEs), bem como ao contexto sócio-cultural do paciente. A epilepsia do lobo temporal (ELT) freqüentemente afeta a função de memória, o que pode ser avaliada pelo seu correlato eletrofisiológico: a potenciação de longa duração (LTP, do inglês: long-term potentiation). O objetivo principal deste estudo foi o de avaliar a influência da epilepsia em si e dos FAEs sobre a potenciação de longa duração em CA1 do hipocampo de ratos controles e com epilepsia induzida pela pilocarpina. Foram realizados estudos eletrofisiológicos com registros de campo para análise da LTP induzida por estimulação tetânica em 64 fatias de hipocampo. A metade destas provenientes de ratos controle e as demais de ratos com ELT induzida pela pilocarpina. De cada rato utilizado (8 controles e 8 epiléticos) foram obtidos 4 registros, um controle com Ringer e os outros sob efeito de carbamazepina (CBZ), valproato (VPA) e etossuximida (ESM). Ao compararmos os ratos controle com os epiléticos encontramos uma tendência a maior facilidade de se obter LTP no primeiro grupo (65,6% e 40,6% respectivamente; $p = 0,080$). Ao analisarmos o efeito dos FAEs no hipocampo epilético encontramos uma significativa facilitação da LTP quando utilizamos a CBZ, além de uma maior dificuldade com a ESM (no 5º minuto pós-indução, $p = 0,007$; no 30º minuto, $p = 0,034$), o que não ocorreu nos ratos controle. Assim, concluímos que há uma tendência a maior dificuldade de se obter LTP em hipocampo epilético e que há diferentes efeitos com o uso dos FAEs; ocorrendo uma significativa facilidade de se obter LTP entre os ratos epiléticos sob efeito da CBZ e uma maior dificuldade com a ESM.

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic condition, frequently accompanied by cognitive disturbance. Most of the times, it's hard to know whether this is due to the basis pathology that provokes the seizures, the seizures themselves or to the treatment with antiepileptic drugs (AEDs), as well as to the patient's social and cultural context. The temporal lobe epilepsy (TLE) frequently affects the memory function, and that can be evaluated by its electrophysiological correlate: the long-term potentiation (LTP). The main objective of this study was to evaluate the influence of epilepsy itself along with the AEDs influence, on the long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus of both control rats and pilocarpine induced epileptic ones. Electrophysiological studies were performed with field recordings to analyze the LTP induced by tetanic stimulation in 64 hippocampus slices. Half of them were obtained from control rats and the other half from rats with TLE induced by pilocarpine. From each used rat (8 control and 8 epileptic ones) 4 recordings were obtained, a control one with Ringer, and the others under the effect of carbamazepine (CBZ), valproate (VPA) and ethosuximide (ESM). When comparing the control rats with the epileptic ones a tendency to a greater facility in obtaining LTP is found for the first group (respectively 65,6% and 40,6%; $p= 0,080$). When analyzing the AEDs effect on the epileptic hippocampus a significant LTP facilitation was found when CBZ is used, along with a greater difficulty when using ESM (at the 5° minute after the induction, $p= 0,007$, at the 30° minute, $p= 0,034$), the same didn't occur with control rats. Thus, we conclude there's a tendency to a greater difficulty in obtaining LTP in epileptic hippocampus and that there are different effects for the AEDs use; occurring a significant facility in obtaining LTP among the epileptic rats under the effect of CBZ and a greater difficulty under the ESM one.

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma entidade nosológica que compreende uma ampla categoria de síndromes clínicas, decorrentes de atividade elétrica cerebral anormal, excessiva e hiper-sincrônica, que tende a se repetir e que pode decorrer de múltiplos processos patológicos, em diferentes áreas encefálicas.

A chamada crise epiléptica 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 nas quais a descarga se originou e para onde se propaga (Sander e Hart, 1999). Como geralmente, em cada caso, este trajeto de origem e propagação é sempre o mesmo, a manifestação é estereotipada. Assim, podemos encontrar manifestações motoras, sensitivas, psíquicas ou autonômicas que iniciam subitamente, duram poucos minutos (período ictal) e cedem espontaneamente, seguindo-se de sonolência e confusão mental (período pós-ictal) (Sander e Hart, 1999).

O distúrbio epiléptico além de ser freqüente na prática clínica, acometendo em torno de 2% da população, é uma condição crônica e recorrente que pode determinar importantes repercussões psicossociais. É notória a freqüência dos casos de distúrbio de aprendizado, estimando-se que aproximadamente 50% das crianças têm alguma dificuldade na escola (Ross e cols., 1980; Sillampa e cols., 1999).

Ao se pesquisar as causas do distúrbio cognitivo no paciente portador de epilepsia sempre devem ser levadas em conta a multiplicidade de fatores que estão envolvidos. Há os fatores ligados à doença de base que causa a epilepsia (a etiologia), às crises epiléticas propriamente ditas, ao efeito adverso dos fármacos antiepiléticos (FAEs), aos transtornos de humor e de conduta que freqüentemente 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).

Quando analisamos a influência dos FAEs na cognição destes pacientes também há vários aspectos que podem ser positivos ou negativos dependendo da situação. Obviamente, ao manter sob controle os fatores provocados pela epilepsia em si, como quando há múltiplas crises diárias, o fármaco trará benefícios sobre a cognição. Por outro lado, em virtude dos seus possíveis efeitos adversos, em especial a sonolência, o retardo nas reações e a diminuição da atenção trará prejuízos cognitivos (Perucca, 1996).

Como era de se esperar neste contexto, os estudos clínicos que objetivam caracterizar as causas reais do distúrbio cognitivo na epilepsia têm-se deparado com grandes desafios metodológicos, o que leva, muitas vezes, a resultados completamente contraditórios (Cornaggia e Gobbi, 2001). Isso decorre do fato de ser muito difícil isolar-se todos os fatores de confusão quando lidamos com um problema que se apresenta de múltiplas formas, variadas etiologias, com diferentes níveis de gravidade e tipos de tratamento, e que pode ser afetado de forma significativa por fatores sociais, econômicos e culturais. Assim, tendo-se o rigoroso cuidado ao extrapolar os dados para o contexto clínico, e utilizando-se os modelos experimentais adequados, os estudos *in vitro* possibilitariam

uma alternativa para contornarmos essas dificuldades. Possibilitariam uma análise mais isolada da influência da epilepsia em si e de seu tratamento farmacológico sobre o aprendizado.

Dispomos, atualmente, de modelos adequados para analisar experimentalmente estas variáveis: o estudo da *potenciação de longa duração* (LTP, do inglês *long-term potentiation*) utilizando-se a técnica de estudo *in vitro* de fatias encefálicas (técnica do *brain slice*) em modelo animal de epilepsia. A LTP é considerada como o correlato eletrofisiológico sináptico da memória e aprendizado (Kandel e col., 2000), podendo ser realizada *in vitro*. Neste caso, a LTP é tradicionalmente estudada em hipocampos dissecados de ratos através da técnica de fatias encefálicas (McIlwain e col., 1951), que preserva as vias neuronais para o registro eletrofisiológico (Yamamoto e McIlwain, 1966). O hipocampo, região sabidamente envolvida nos processos de memória, é a região cerebral que mais facilmente se obtém o fenômeno de LTP (Kandel e col., 2000).

Também temos a possibilidade de aplicarmos estas técnicas em ratos com epilepsia crônica pelo modelo da pilocarpina (Turski e cols., 1983). Este modelo é de especial importância no estudo proposto por reproduzir a epilepsia do lobo temporal (ELT), uma forma mais comum de síndrome epiléptica (cerca de 40% de todos os casos) e também a que mais freqüentemente se torna refratária ao tratamento medicamentoso, o que geralmente implica em tratamento polimedicamentoso ou mesmo cirúrgico. Além disso, trata-se de uma síndrome epiléptica onde a memória é a principal função cognitiva prejudicada (Jones-Gotman, 1996).

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1- Epilepsia

A epilepsia é uma condição relativamente comum na população geral e uma das mais freqüentes doenças tratadas pelo neurologista. Estima-se que a incidência da epilepsia em países desenvolvidos seja de aproximadamente 50/100.000, enquanto que em países em desenvolvimento essa taxa aumente para 100 casos/100.000 pessoas (Sander e Hart, 1999). No nosso meio, é descrita, para a população de Porto Alegre, a prevalência de 16,5 e 20,3/1000 respectivamente para epilepsia ativa e inativa (Fernandes e cols., 1993), e para a grande São Paulo a prevalência é de 11,9 por 1000 pessoas (Marino e cols., 1986).

As crises epilépticas podem ser classificadas de muitas formas (conforme a etiologia, idade de início e topografia das descargas, por exemplo). A mais aceita atualmente é a proposta pela *Liga Internacional Contra a Epilepsia* (ILAE, 1981) que se baseia nas manifestações clínicas e eletroencefalográficas das crises (tabela 1), e que propicia a principal fonte de embasamento para a decisão clínica na escolha dos fármacos, como veremos adiante. Esta classificação divide as crises em dois grandes grupos: as crises parciais, quando a fonte da descarga neuronal se origina em áreas corticais localizadas (podendo generalizar-se secundariamente); e as generalizadas, quando se originam em ambos hemisférios ao mesmo tempo. Desta forma, as primeiras apresentam uma manifestação clínica que antecede a perda de consciência, e na segunda esta perda de consciência inicia-se subitamente (ILAE, 1981).

Tabela 1. Classificação internacional das crises epiléticas conforme a *Liga Internacional Contra a Epilepsia* (ILAE, 1981).

I - CRISES PARCIAIS	
Crises parciais simples (CPS)	com sintomas motores com sintomas somatosensoriais ou sensoriais especiais com sintomas autonômicos com sinais psíquicos com ilusões com alucinações estruturadas
Crises parciais complexas (CPC)	início de CPS com progressão ao embotamento da consciência com alteração do estado de consciência desde o início
Crises parciais secundariamente generalizadas	CPS evoluindo para crise tônico-clônica generalizada CPC evoluindo para crise tônico-clônica generalizada CPS evoluindo para CPC que evolui à crise tônico-clônica generalizada
II- CRISES GENERALIZADAS	
A. crises de ausência	crises de ausência típicas crises de ausência atípicas
B. crises mioclônicas	
C. crises clônicas	
D. crises tônicas	
E. crises tônico-clônicas	
F. crises atônicas	
III- CRISES EPILÉPTICAS NÃO CLASSIFICÁVEIS (dados incompletos ou inadequados)	

A maioria dos pacientes (em torno de 40%) com crises epiléticas apresentam crises parciais complexas (Hauser e Kurland, 1975). Este tipo de crise é gerado pelo acometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, em especial do hipocampo. O acometimento pode decorrer de lesões estruturais, como por exemplo, tumores e malformações artério-venosas, mas em 60 a 65% dos casos (Muller, 1993a; Quigg e cols., 1997) o padrão histológico encontrado é a *esclerose hipocampal ou esclerose temporal mesial* (ETM). Esta é caracterizada por acentuada

perda de neurônios piramidais, gliose reacional e brotamento axonal que promove circuitos aberrantes. A perda neuronal referida ocorre com uma intensidade gradualmente menor nos seguintes subcampos da formação hipocampal: principalmente (1) em CA1 (CA: de *Cornu Ammonis*, pela semelhança com os chifres de carneiro da cabeça da divindade egípcia Ammon-Rá) (Lorente De No, 1934) e setor de Sommer (pró-subículo), (2) no hilo do giro denteado (GD) e CA3 e, por último, (3) nas células granulares do GD e CA2 (Bluncke e cols., 1999; Coutinho e cols., 1999). A perda neuronal também ocorre em outras áreas mesiais temporais como na camada III do córtex entorrinal²⁰ e no núcleo lateral da amígdala (Muller e cols., 1993b; Bluncke e cols., 1999; Pickamen e cols., 1998).

A síndrome epiléptica do lobo temporal contribui muito para a compreensão das bases da epilepsia. Isso se deve a possibilidade do fornecimento de tecido temporal humano durante a cirurgia da epilepsia, a que freqüentemente os pacientes necessitam ser submetidos. Além disso, os principais modelos animais de epilepsia mimetizam a ELT, como exemplificado pelo modelo da pilocarpina.

Em 1983, Turski e colaboradores descreveram o modelo experimental de ELT através da injeção sistêmica de pilocarpina. Um agonista colinérgico muscarínico proveniente de plantas sul-americanas, a *Pilocarpus jaborandi* e a *Pilocarpus microphyllus*, que produz primeiramente uma *fase aguda*, onde o animal apresenta crises convulsivas, que evoluem ao *status epilepticus*, que deve durar no mínimo 30 minutos. Cessadas estas convulsões, inicia-se a *fase silenciosa*, sem qualquer manifestação clínica ou eletroencefalográfica de epilepsia, e que duram alguns dias. Então, finalmente inicia-se um estado de crises recorrentes, espontâneas e permanentes, de origem límbica, a *fase crônica*.

Análises histológicas do hipocampo de animais experimentais no modelo da pilocarpina revelam um mesmo padrão de perda celular da esclerose hipocampal humana, com grande perda neuronal em CA1 e razoável perda em CA3. Além disso, eletrograficamente as crises desencadeadas por este modelo caracterizam-se por descargas epileptiformes hiper-sincrônicas, de alta amplitude e em trens de espículas (5-12 Hz), originadas normalmente no hipocampo, com propagação ao córtex. Análises eletrofisiológicas de fatias cerebrais evidenciam, neste modelo, descargas interictais evocadas e espontâneas geradas no hipocampo (Sanabria e Cavalheiro, 2000). Sabe-se também que estes animais, na fase crônica, respondem satisfatoriamente ao tratamento antiepiléptico utilizado em humanos. Todos estes fatos reforçam as ligações entre a ELT humana e as alterações provocadas pelo uso de pilocarpina sistêmica.

Esse modelo de epilepsia possibilita, como dissemos, o estudo dos mecanismos básicos envolvidos na epileptogênese; além de possibilitar a análise de tratamento para as crises, em especial os testes farmacológicos.

2.2- Os fármacos antiepilépticos

O tratamento da epilepsia baseia-se, em medidas gerais, tratamento farmacológico e cirúrgico. As medidas gerais referem-se ao paciente evitar situações predisponentes, como por exemplo, a privação de sono. Quanto ao tratamento cirúrgico, este é uma eficaz oportunidade, em casos selecionados considerados clinicamente refratários a despeito do uso de no mínimo quatro tipos de FAEs adequados ao tipo de epilepsia e com ótima adesão ao tratamento (Sander e Hart 1999).

O tratamento farmacológico é o principal tratamento da epilepsia controlando as crises em torno de 70 a 80% dos casos. São vários os

fármacos disponíveis, e sua escolha depende de sua eficácia diante dos diferentes tipos de crises e síndromes epiléticas (tabela 2) (Elkis, 1998), bem como de sua tolerância. De um modo geral, as crises generalizadas tônico-clônicas respondem bem ao valproato (VPA), a carbamazepina (CBZ), a fentoína (DPH), a primidona (PRM) e ao fenobarbital (FB). As crises generalizadas de ausência são bem controladas com VPA e etossuximida (ESM) e as crises parciais, por CBZ, VPA, DPH, PRM e FB.

Tabela 2. Medicações anti-epiléticas por tipos de crise*.

Droga anti-epilética	Faixa terapêutica mg/ml	Tipos de crise
carbamazepina	3-12	Parciais e secundariamente generalizadas
etossuximida	40-100	Ausências típicas e atípicas
fentoína	3-20	Parciais e generalizadas tônico-clônicas, status
fenobarbital	10-30	Parciais e generalizadas tônico-clônicas, febris, status
primidona		Parciais e generalizadas, febris
valproato	50-100	Primariamente generalizadas, ausências, mioclônicas, parciais
Vigabatrina		Parciais, síndrome de West, esclerose tuberosa
Felbamato		Parciais, generalizadas, síndrome de Lennox-Gastaut
Oxcarbazepina	8-20	Parciais e secundariamente generalizadas
Diazepan		Status, tratamento intermitente nas crises febris e surtos de crise
Gabapentina		adjunto nas epilepsias refratárias, reflexas e surto de crises
Clonazepan		Mioclônicas, generalizadas tônico-clônica, febril (intermitente)
Lamotrigina		Crises parciais, secundariamente generalizadas
Topiramato		Crises parciais, tratamentos adjuvantes

*Modificado de Elkis, 1998.

Além do uso na epilepsia, os FAEs são empregados em vários outros contextos clínicos, em especial nas doenças psiquiátricas e no manejo de dor. Por exemplo, a CBZ e o VPA têm consagrado uso como

estabilizadores do humor (Ernest e Goldberg, 2003); o VPA é bastante efetivo no tratamento profilático da enxaqueca (Agostine e col., 2003); a Gabapentina, além da CBZ, é muito útil no manejo de dores e disestesias das neuropatias periféricas (Backonja, 2002).

Voltando ao tratamento medicamentoso na epilepsia, devemos sempre ter em mente que, ao usarmos os FAEs, podemos nos deparar com efeitos adversos indesejáveis. Estes efeitos adversos podem ser de ordem hematológica, hepática e cutânea, geralmente de reconhecimento mais fácil do que os efeitos deletérios sobre a cognição, que também podem advir.

2.3- Cognição, epilepsia e fármacos antiepilépticos

Função cognitiva é a capacidade do cérebro humano de processar informações provenientes do mundo interno e externo para programar a conduta mais oportuna em alguns a elas (Aldenkamp, 2001). Esta capacidade envolve a habilidade de permanecer em contato com o mundo exterior, através da função de *vigília*; de selecionar e focar a informação, através da função da *atenção*; e de armazenar dados, através a função de *memória*.

Assim, dispondo desse “banco de dados”, ao entrar novamente em contato com estímulos semelhantes, haverá evocação das informações armazenadas, quanto ao próprio estímulo ou quanto à maneira de reagir a ele, e, desta forma, reagirá de forma mais efetiva. Ou seja, obteve-se um *aprendizado* com relação àquela situação particular.

O prejuízo da função cognitiva pode ser visto como uma redução da capacidade de aprendizado ou como uma deterioração de habilidades intelectuais já adquiridas. Nas crianças muitas vezes observa-se uma maior lentidão no aprendizado em comparação com crianças da mesma idade, além de, à semelhança dos adultos, poder ocorrer um declínio das

funções cognitivas que haviam sido adquiridos. Nos adultos, costuma-se denominar tal condição de quadro demencial (Chiu, 2000).

Os distúrbios de aprendizado que ocorrerem durante a epilepsia podem ser de duas formas - os permanentes e os dependentes da condição do paciente (dependência de estado). A segunda forma tem uma relevante implicação clínica por ser potencialmente tratável e reversível, podendo, outrossim, levar a danos permanentes caso persista.

Um dos fatores de maior importância na determinação da habilidade cognitiva na epilepsia é a etiologia. Quando a epilepsia é sintomática os pacientes apresentam um QI inferior do que quando é idiopática (Dam, 1999). Isso se deve à que as epilepsias sintomáticas ocorrem em um contexto de base orgânica quando há maior possibilidade de comprometimento do funcionamento cerebral, inclusive da cognição de forma permanente (Guerreiro e Guerreiro, 1999).

Considerando-se o distúrbio epiléptico propriamente dito, várias situações podem ser causadoras de transtorno de aprendizado dependente de estado. Em primeiro lugar as alterações *ictais*, como é o exemplo do status não-convulsivo que pode não ser reconhecido durante meses. Além destas, as alterações *peri-ictais*, como o indivíduo que apresenta múltiplas convulsões por dia e não consegue recuperar plenamente a capacidade cognitiva entre uma crise e outra. Segundo Seidenberg (1981), o lapso que existe entre idade mental e idade cronológica é maior em crianças mais velhas, com início mais precoce de convulsões, com um número maior de convulsões ao longo da vida ou com múltiplos tipos de convulsões.

Outra situação digna de nota em epilepsia é que talvez o prejuízo cognitivo transitório possa também ser decorrente de descargas epiléticas inter-ictais específicas. Isso foi bem ressaltado por Cornaggia e Gobbi (2001) em revisão sobre o assunto, onde relata no nível eletroencefalográfico alterações desde generalizadas até focais, sem qualquer concomitante clínico aparente, com declínio acentuado das

funções cognitivas. Além disso, relata exemplo em que a supressão dessas descargas por FAEs poderia promover melhora nas funções cognitivas, e enfatiza a necessidade de mais estudos sobre este importante assunto.

Prosseguindo na análise dos fatores envolvidos nos distúrbios cognitivos no paciente epilético, já podemos ver que os fármacos podem ter efeitos positivos e negativos dependendo da situação. Obviamente a mantermos sob controle os fatores provocados pela epilepsia em si, como quando há múltiplas crises diárias, o fármaco trará benefícios na cognição do indivíduo. Por outro lado, devemos identificar a relativa contribuição destes medicamentos como causa de prejuízo cognitivo em virtude dos seus possíveis efeitos adversos, em especial a sonolência, a redução na velocidade das reações e a diminuição da atenção.

Embora se acredite que todos os FAEs possam interferir com o desempenho cognitivo, esses efeitos geralmente são modestos em monoterapia e em níveis séricos adequados (Guerreiro e Guerreiro, 1999). Efeitos adversos consistentes sobre a cognição ocorrem com barbitúricos e diazepínicos, sendo que resultados mistos foram encontrados com CBZ, DPH e VPA (Aldenkamp, 2001; Guerreiro e Guerreiro, 1999). Em um estudo comparativo verificaram-se mais prejuízos com FB que com DPH e CBZ em testes de memória e de função visuomotora (Gallasi e cols., 1992). Também em outros dois estudos os pacientes que receberam FB apresentaram piores escores de inteligência com o uso por longo tempo quando comparado com VPA (Vining e cols., 1987; Calandre e cols., 1990). Comparando VPA e CBZ os pacientes que receberam a primeira mostraram menor performance de memória e função visuomotora (Gallasi e cols. 1992). Entretanto, os pacientes que usaram VPA apresentavam melhor desempenho em testes de inteligência que aqueles com FB (Vining e cols., 1987; Calandre e cols., 1990).

Quanto aos efeitos cognitivos em função da dose, apenas para CBZ encontrou-se algum efeito dose dependente, no caso uma *melhora da*

função cognitiva com maior dose (Amman e cols., 1990; Aldenkamp e cols., 1993). Nada foi encontrado com relação à VPA (Amman e cols., 1987; Read e cols., 1998) ou a DPH (Stevens e cols. 1974).

Quanto ao efeito absoluto dos FAEs sobre a cognição não há dados consistentes. Dois estudos com CBZ, um em voluntários normais (Tompson e cols., 1980) e outro em pacientes portadores de epilepsia (Aldenkamp e cols. 1993), relatam que não há prejuízo cognitivo quando comparados com o grupo de não tratados. Isto é contraposto pelo estudo de Meador e colaboradores (1991 e 1993) que relata leves prejuízos na memória, atenção e rapidez mental. Da mesma forma, para VPA verificou-se um moderado prejuízo da rapidez mental e psicomotricidade (Thompson e Trimble, 1981; Craig e Tallis, 1994; Prevey e cols., 1996).

Dessa maneira, os estudos clínicos que objetivam caracterizar as reais causas do distúrbio cognitivo na epilepsia têm se deparado com grandes desafios metodológicos, induzindo, muitas vezes, a resultados completamente contraditórios (Cornaggia e Gobbi 2001). Isso decorre do fato de ser muito difícil isolarmos todos os fatores de confusão quando lidamos com um problema que apresenta múltiplas formas, etiologias, gravidade, tratamentos, e que pode ser afetado de forma importante por fatores sociais, econômicos, culturais. Assim, tendo-se um rigoroso cuidado ao extrapolarmos os dados para o contexto clínico, os estudos *in vitro* possibilitariam detectar e afastar estes fatores de confusão.

Uma vez que dispomos de modelos de epilepsia em animais de laboratório, e o fenômeno da LTP é tido como um correlato eletrofisiológico sináptico de memória e aprendizado, é perfeitamente factível realizarmos estudos *in vitro*.

2.4- Potenciação de longa duração: o modelo sináptico de memória e aprendizado

Em 1966, Lømo ao estudar os efeitos da ativação da via perfurante às células granulares no hipocampo de coelhos anestesiados, observou que breves trens de estímulos resultavam numa eficácia aumentada da transmissão sináptica que poderia durar horas (Lømo, 2003). Esta observação foi estudada então em conjunto com Tim Bliss a partir de 1968, o que resultou na descrição em 1973 do fenômeno de LTP (Bliss e Lømo, 1973). Este fenômeno logo foi proposto como a possível base da memória e aprendizado ocorrer em uma área sabidamente relacionada com memória e aprendizado, além de ser compatível com a suposição de que o armazenamento de informações no encéfalo deveria ocorrer na forma de alterações na eficácia sináptica, e ser dependente da atividade prévia. Esta suposição decorre da demonstração, por Cajal, de que redes neuronais não são caracterizadas por continuidade citoplasmática, mas sim, comunicam-se por junções especializadas que Scherrington chamou de sinapses (Bliss e Collingridge, 1993). Na década de 40, Donald Hebb propôs a regra na qual a sinapse ligando duas células é potenciada se ambas são ativadas ao mesmo tempo (Hebb, 1949).

A LTP é expressa como um aumento persistente na amplitude do componente sináptico da resposta evocada, registrada em células individuais (registros intracelulares) ou em populações de neurônios (registros de campo ou extracelulares). Podemos ver na figura 1 um exemplo de um registro completo de LTP, obtido em nosso laboratório, através de registros de potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS). Nos minutos iniciais que precedem a estimulação registra-se a amplitude, que pode ser chamada de *basal*, pois é considerado com sendo o referencial para se analisar o quanto houve de mudança da amplitude após a estimulação que objetiva desencadear a LTP.

A LTP da transmissão sináptica no hipocampo é considerada o modelo experimental principal para as alterações sinápticas que podem estar na base do aprendizado e memória (Malenka e Nicoll, 1999). Vários fatores relacionados a LTP aos fenômenos cognitivos de memória e aprendizado. Como bem relatado por Bliss e Collingridge (1993) e Izquierdo (1993) a LTP é, por si só, uma forma de memória expressa antes no nível sináptico que ao nível comportamental. Ou seja, é um fenômeno que demonstra claramente um aprendizado sináptico, pois, *após um estímulo prévio* esta sinapse modifica de forma *duradoura* a sua atividade, expressa pelo aumento da amplitude do potencial sináptico. Desta forma, demonstrada a ocorrência desta “memória sináptica”, no loco que anteriormente se presumia ser o foco de armazenamento da memória, este fenômeno começou a ser estudado também como candidato a ser o mecanismo de armazenamento de memória em nível comportamental (Izquierdo, 1993).

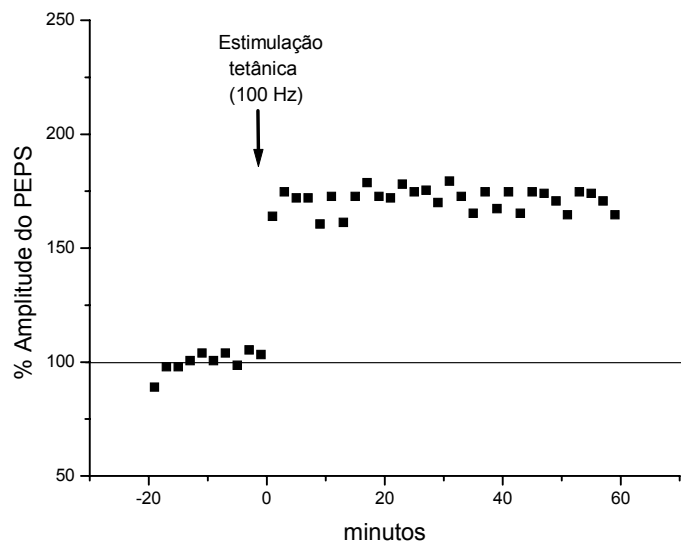


Figura 1: Gráfico típico de LTP demonstrando o percentual de aumento da amplitude do PEPS, tomando os 20 minutos iniciais como valor basal (100%), após a estimulação tetânica elétrica de 100Hz, pelo tempo em minutos. Proveniente de nossos resultados.

Podemos, didaticamente identificar quatro fontes que sugerem a LTP como base da memória (Bliss e Collingridge, 1993; Izquierdo, 1993). A primeira é a *similaridade que existe entre a LTP e a memória*, sendo indicados pela associatividade, a existência de um período precoce lábil, durante e após a indução, similar à fase de consolidação das memórias. Também, a longa persistência da manutenção sem a necessidade de expressão, e a expressão em resposta a reiteração do estímulo que tem sido usado para sua aquisição.

A segunda fonte baseia-se nos experimentos correlacionais, onde cita experimentos de Roman e colegas (1987) que constataram a ocorrência da LTP no córtex piriforme, sob estimulação do trato olfatório lateral em associação com o aprendizado de uma discriminação olfatória. Esse experimento mostrou, pela primeira vez, que a LTP ocorre em áreas do encéfalo especialmente envolvidas com o aprendizado, que está sendo medido (Roman e col., 1987). Embora estes experimentos constituam a melhor evidência a favor da LTP como base da memória elas não provam a relação causa e efeito entre essas duas variáveis.

A terceira fonte que sugere a LTP como base da memória utiliza ratos mutantes com defeitos enzimáticos específicos, provocando um prejuízo da capacidade de se obter LTP hipocampal e também memórias dependentes do hipocampo (Silva e cols, 1992a, e Silva e cols, 1992b). Estes experimentos, embora interessantes, também não demonstram a relação causa e efeito entre LTP e memória.

A quarta e última fonte, que provê a melhor evidência de que a LTP em várias regiões do cérebro pode ser a base de importantes aspectos da memória, provém de experimentos farmacológicos. Analisando-se as diferentes fases da memória, a fase de consolidação é sensível a AP5 (2-amino-5-fosfonovalerato) (Morris e cols. 1986; Jerusalinsky e cols. 1992) e a agonistas e antagonistas gabaérgicos (Brioni e col., 1990; Izquierdo e col., 1992); a fase pós-consolidação precoce é acompanhada pela

atividade da proteína cinase C (PKC) aumentada e sensível a inibidores de PKC (Silva e cols, 1992a, e Silva e cols, 1992b); e a fase de expressão é sensível a CNQX (6-ciano-7-nitro-quinoxalina-2,3-diona) (Liang e col., 1991; Kim e col., 1993), atuando sobre os receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico), mas não a AP5 (Jerusalinski e col., 1992) Todos esses achados de estudos farmacológicos também ocorrem com as fases de indução, estabilização, manutenção precoce e expressão da LTP.

Assim sendo, a LTP hipocampal tornou-se o principal modelo de plasticidade sináptica dependente de atividade. Ela também é encontrada em sinapses excitatórias de outras áreas encefálicas, embora, o fenômeno hipocampal seja o mais estudado até porque é nesta estrutura que é mais fácil obtê-la.

2.5- Estrutura e circuitaria hipocampal

O hipocampo é componente chave dos processos de memória e aprendizado, sendo que a evidência em seres humanos mais comumente citada é o caso do paciente H.M., que em 1953 sofreu uma remoção bilateral dos hipocampos durante o tratamento cirúrgico da epilepsia. Após esse procedimento H.M. permaneceu com severa e irreversível amnésia anterógrada (Portuguez, 1998).

O hipocampo recebe este nome por sua estrutura assemelhar-se a um cavalo marinho (do grego, *hippo*: cavalo e *Kampos*: monstro marinho). Ele encontra-se na formação hipocampal, na parte mesial do lobo temporal, medialmente ao corno temporal do ventrículo lateral. A formação hipocampal considerada em conjunto por suas relações anátomo-funcionais compreende o hipocampo, o giro denteado, o subículo e o córtex entorrinal, como mostrado na figura 2.

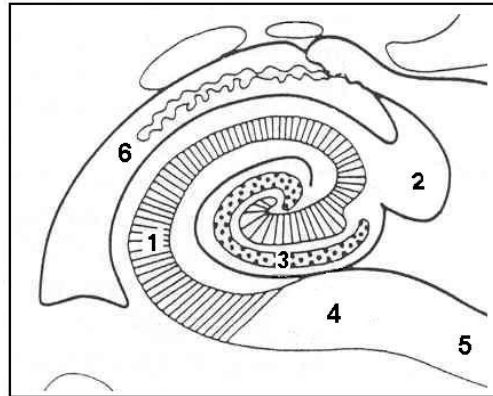


Figura 2: Esquema da formação hipocampal e estruturas associadas: (1) o hipocampo, (2) a fímbria, (3) o giro denteado, (4) o subiculum, (5) o córtex entorrinal e (6) o corno temporal do ventrículo lateral. Modificado de Knowles, 1992.

O hipocampo apresenta uma organização bastante regular ao longo de seu eixo, sendo ideal para investigações anatômicas e fisiológicas (Brown e Zador, 1990). A figura 3 demonstra alguns dos principais elementos neurais presentes em uma fatia transversal ao eixo longitudinal do hipocampo. Em fatias tomadas com esta orientação preserva-se a circuitaria intrínseca mais importante do hipocampo, embora também existam vias longitudinais perpendiculares ao plano da fatia (Brown e Zador, 1990).

Na figura 3 podemos ver a divisão do hipocampo em quatro regiões baseadas na morfologia celular e conexões, designadas como CA1 a CA4 (como já dissemos, CA significa *Cornu Ammonis*) (Lorente de Nó, 1934). As principais células do hipocampo, as células piramidais, possuem morfologia variável conforme a região CA em que se encontram. Assim, indo de CA3 a CA1 os corpos celulares tornam-se progressivamente menores, com os dendritos apicais mais longos e delgados, e com um padrão mais regular de arborização (Brown e Zador, 1990).

Estes neurônios piramidais recebem este nome por apresentarem corpos celulares de forma piramidal (cônica), com 20 a 40 μm de base e 40 a 60 μm de altura. Seus corpos celulares encontram-se dispostos ao longo da espessura de duas a três células em uma camada chamada *stratum pyramidale*. Cada um apresenta um dendrito apical com 5 a 10 μm de diâmetro, que se dirige profundamente ao *stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*. Apresentam também vários dendritos basais de 3 a 6 μm de diâmetro que harborizam em direção ao *stratum oriens*. Da mesma forma, se projeta o axônio que alcança a periferia do hipocampo para formar o *alveus* (Brown e Zador, 1990).

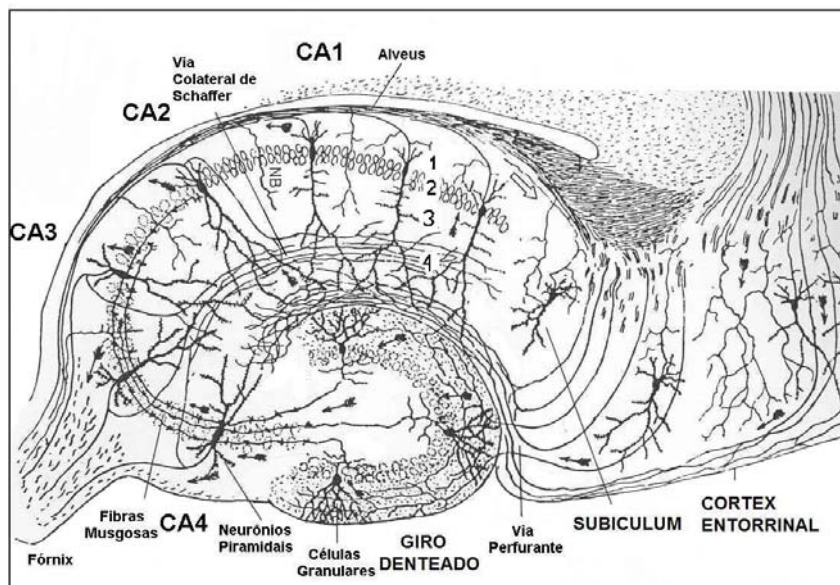


Figura 3: Seção transversal da formação hipocampal demonstrando as regiões hipocâmpais de CA1 a CA4 e a sua estruturação em camadas fundamentais, no sentido periférico a central: o Alveus, (1) a camada polimórfica (*stratum oriens*), (2) a camada piramidal (*stratum pyramidale*), e a camada molecular composta pelo (3) *stratum radiatum* e (4) *stratum lacunosum-moleculare*). Modificado de Brown e Zador, 1990.

A aferência ao hipocampo e ao giro denteado provém principalmente do córtex entorrinal (via perforante), da região septal (via fórnix) e do hipocampo contralateral (pelas conexões comissurais). Do ponto de vista de circuito neuronal hipocampal que processa esta informação, é útil, para a compreensão, usarmos o conceito clássico simplificado da via trissináptica (figura 4). Esta se compõe primeiro da sinapse entre o córtex entorrinal e as células granulares do giro denteado, através da via perforante; da segunda sinapse entre as células granulares e os neurônios piramidais de CA3, pelas fibras musgosas; e da terceira sinapse, entre os neurônios piramidais de CA3 e CA1, pela via colateral de Schaffer (Andersen 1996).

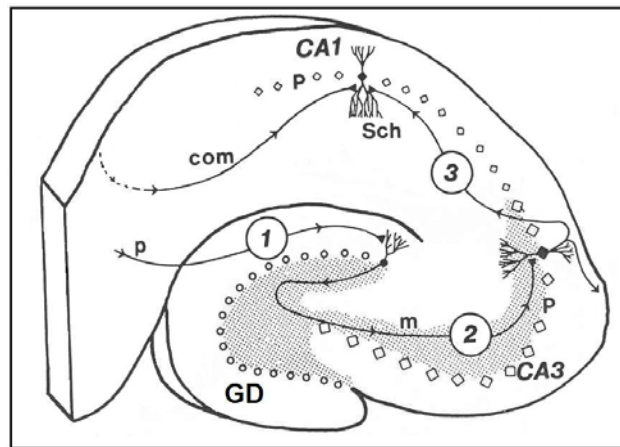


Figura 4: Diagrama esquemático do circuito tri-sináptico hipocampal mostrando (1) a via perforante (p) provendo aferência às células granulares localizadas no giro denteado (GD); (2) as fibras musgosas (m) provendo aferência às células piramidais da região de CA3 do hipocampo; e (3) a colateral de Schaffer (Sch) provendo aferência às células piramidais da região de CA1 do hipocampo. Mostra também a via comissural (com). Modificado de Brown e Zador, 1990.

Após alcançar CA1 a informação poderá sair do hipocampo. Os axônios dos neurônios piramidais desta região se organizam no *alveus* ou em fibras comissurais, projetando-se principalmente em direção ao subículo e ao hipocampo contralateral.

Com a intenção de estudar a relação da memória e aprendizado com a epilepsia e os FAEs, estudaremos aqui o correlato sináptico eletrofisiológico destas funções, a LTP, em fatias de hipocampo de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos.

Nossa hipótese é a de que a epilepsia experimental determina comprometimento da capacidade do hipocampo em gerar LTP, e que os FAEs podem afetar positiva ou negativamente esta capacidade.

3 - OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo geral:

- Avaliar a influência da epilepsia em si e dos FAEs sobre a LTP *in vitro* em fatias de hipocampo de ratos controles e com epilepsia induzida pela pilocarpina.

E como objetivos específicos:

- a. A comparação da probabilidade de obtenção da LTP na região CA1 do hipocampo de ratos controle e epiléticos;
- b. Avaliação da média da amplitude e da inclinação (“*slope*”) do PEPS em ratos controle e epiléticos que obtiveram LTP;
- c. A análise do possível efeito da CBZ, VPA e ESM na probabilidade de obtenção da LTP em ratos controle e epiléticos;
- d. A análise do possível efeito da CBZ, VPA e ESM na média da amplitude e da inclinação (“*slope*”) do PEPS em ratos controles e epiléticos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4 – MATERIAL E MÉTODOS

Para testar nossas hipóteses a respeito das modificações que a LTP poderia sofrer devido à epilepsia e aos FAEs, trabalhamos no Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Neste laboratório, induzimos epilepsia em ratos através do modelo da pilocarpina e utilizamos a técnica de fatiamento cerebral para obtermos hipocampos viáveis para infusão dos fármacos e estudo da LTP *in vitro*.

4.1- Amostra

A amostra estudada consistiu de 30 ratos Wistar machos sem propensão genética ao desenvolvimento de crises epiléticas espontâneas. Todos os ratos foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na forma de 10 filhotes em três vezes sucessivas. Estes filhotes foram distribuídos aos dois grupos em estudo, controles e epiléticos, buscando-se sempre dispor, aleatoriamente, um maior número de ratos ao grupo que receberia a infusão de pilocarpina. Isso se deve ao fato de que no modelo de indução de epilepsia pela pilocarpina alguns ratos não sobrevivem ou não alcançam um nível satisfatório de severidade de crise que induzirá epilepsia crônica.

Conforme a *Escala de Racine* (Racine, 1972) (tabela 4) o nível de severidade de crise na fase aguda da infusão de pilocarpina é graduado de 1 a 5 (quanto maior o grau maior a intensidade da crise). Aceitamos

para serem incluídos no grupo epiléptico apenas os ratos que alcançaram os graus 3, 4 ou 5 desta escala, pois geralmente tornam-se epilépticos crônicos.

Assim procedendo, obtivemos a distribuição dos ratos como podemos ver na tabela 3 e na figura 5. Além disso, salientamos que todos os oito ratos que receberam a solução salina para comporem o grupo controle sobreviveram e todos os oito ratos do grupo epiléptico, com Racine 3 a 5, apresentaram crises epilépticas crônicas em observação posterior.

Tabela 3: Distribuição dos 30 ratos filhotes na estruturação dos grupos epiléptico* e controle**.

	Racine 3-5*	Racine 1-2	Morreram	Controle**
1 ^{os} filhotes (n: 10)	3	3	1	3
2 ^{os} filhotes (n: 10)	2	3	2	3
3 ^{os} filhotes (n: 10)	3	3	2	2
Total (30 ratos)	8	9	5	8

*Os ratos que alcançaram com a injeção de pilocarpina o Racine de 3 a 5 compõe grupo epiléptico.

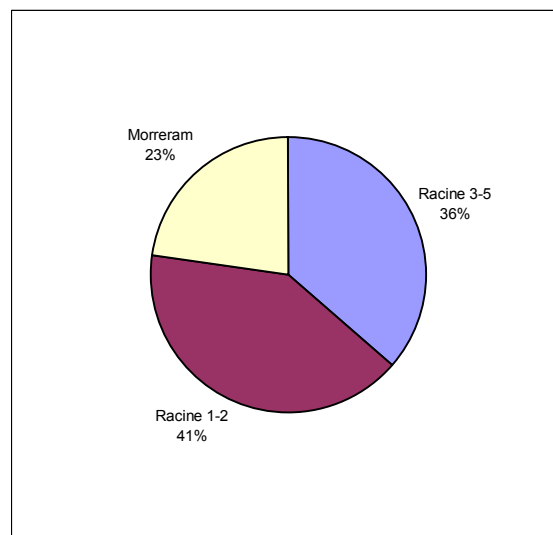


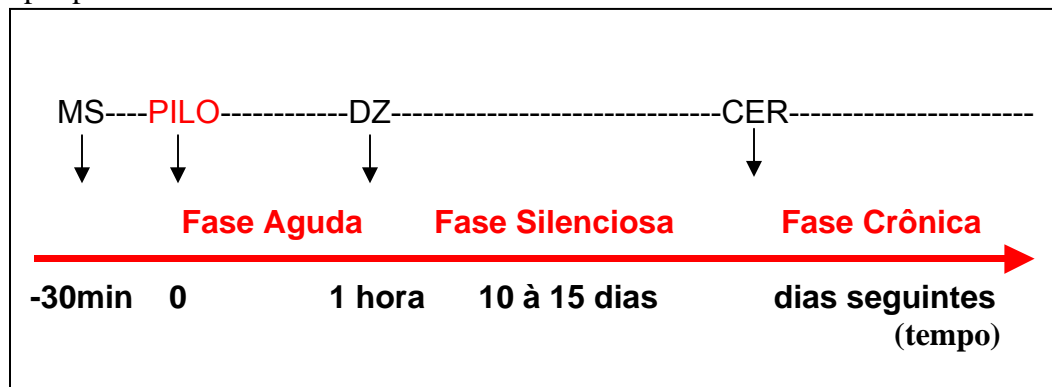
Figura 5: Resultados da infusão de pilocarpina em 22 ratos durante a formação do grupo epiléptico. Aceito apenas para ingresso neste grupo os oito ratos que atingiram os graus 3, 4 e 5 da escala de Racine.

4.2- Indução da Epilepsia do Lobo Temporal pelo Modelo da Pilocarpina

Para a indução da ELT no presente estudo utilizamos o protocolo desenvolvido por Cavalheiro e colaboradores (1991) (Figura 6).

Todos os ratos, conforme dissemos, foram obtidos do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS com 30 dias de vida e pesando entre 90 e 120 gramas. Foram mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS por 24 horas, para se ambientarem, e então foram submetidos à indução da epilepsia.

Figura 6: Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina no grupo epiléptico.



MS: metilescopolamina, PILO: pilocarpina, DZ: diazepam, CER: crises espontâneas repetitivas

Previamente à administração de pilocarpina, os animais recebem uma injeção intraperitoneal de metilescopolamina (MS, 1mg/Kg). Este fármaco é um antagonista colinérgico que não ultrapassa a barreira hematoencefálica e foi utilizado para minimizar os efeitos colaterais colinérgicos periféricos da pilocarpina.

Passados 30 minutos da infusão de metilescopolamina, visando a obtenção de *status epilepticus* (SE), injetou-se nos ratos do grupo experimental, cloridrato de pilocarpina (Sigma, 380 mg/Kg) via intraperitoneal. Em seguida, iniciada a chamada fase aguda do protocolo, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico onde tiveram seu comportamento analisado, por pelo menos três observadores treinados, durante sessenta minutos.

Durante este período de fase aguda, a intensidade das alterações comportamentais decorrentes do distúrbio epiléptico, logo após a injeção de pilocarpina, foram classificadas de acordo com a escala de Racine (tabela 4)⁶⁵. Observou-se, seqüencialmente: (1) acinesia e piloereção, (2) automatismos orofaciais e de extremidades, (3) tremores e clonias de cabeça e pescoço, (4) clonias de patas posteriores e anteriores, (5) elevação e queda. Foram também observadas salivação e perda fecal e urinária. Considerou-se como critério para SE, a persistência de crises contínuas por no mínimo 30 minutos (Cavalheiro e col., 1991; Mello e col., 1993).

Tabela 4: Escala de Racine (Racine, 1972) para intensidade de respostas motoras dos animais à injeção de pilocarpina.

- | |
|--|
| <p>0- Imobilidade
1- Automatismos Faciais
2- Mioclonias de Cabeça e Pescoço
3- Clonias de Patas Anteriores
4- Clonias de Patas Posteriores
5- Elevação e Queda</p> |
|--|

Uma hora após a administração da pilocarpina e a observação das crises durante a fase aguda, foi injetado intraperitonealmente diazepam, na dose de 4mg/Kg. Este fármaco atua como um antiepilético, com rápido início de ação, que foi utilizado com o objetivo de abortar as crises convulsivas e evitar possíveis complicações decorrentes de um SE prolongado (como por exemplo, a broncoaspiração e a desidratação). Dessa forma, todos os animais tiveram um período para desenvolver SE limitado pelo mesmo tempo (60 minutos), o que nos leva a uma padronização do grupo experimental.

Depois de abortadas as crises, os animais eram transferidos para as suas gaiolas, que eram aquecidas durante o primeiro dia, e passavam a receber auxílio em sua alimentação e hidratação. Era realizada reposição hidroeletrólítica e nutritiva através de água via oral e injeção subcutânea de solução salina, bem como alimentação padrão acrescida de banana amassada como repositores de potássio. Tais cuidados eram realizados durante um período de três dias.

Como relatado anteriormente, mesmo tomando estes cuidados cinco animais evoluíram para o óbito nos primeiros minutos da injeção de pilocarpina ou nas 24 horas subseqüentes.

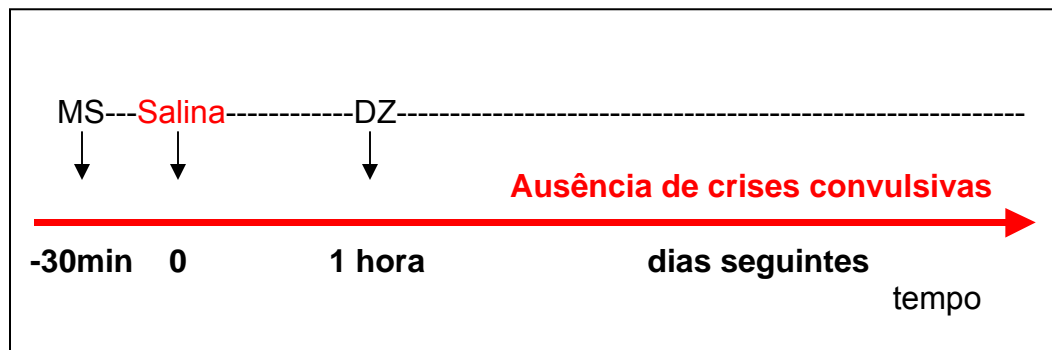
À fase aguda do modelo segue-se, após a injeção de diazepam, um período de ausência de crises comportamentais, conhecido na literatura como período silencioso (Cavalheiro e cols., 1991), que variou entre 10 e 15 dias. Passado este período os animais iniciaram crises parciais límbicas ou generalizadas, de caráter espontâneo e recorrente (em uma média de três a cinco crises por semana). A partir desse momento o animal era considerado como epilético crônico (Figura 6): a comprovação de que os ratos tornaram-se epiléticos era feita identificando-os com tinta preta não alérgica e alojando-os no biotério em gaiolas com frente transparente, para que pudessem ter suas crises

filmadas para posterior análise (e identificação das convulsões). Foram filmados por um período de 12 horas (6 horas do ciclo claro: 14:00 às 20:00; e 6 horas do ciclo escuro: 24:00 às 6:00). Na nossa amostra todos apresentaram crises recorrentes ao alcançarem o Racine de três a cinco.

4.3 – Constituição do grupo controle

Todos os passos citados acima foram realizados no grupo controle, apenas que a injeção de pilocarpina foi substituída por solução salina (soro fisiológico 0,9%) de mesmo volume injetado intraperitonealmente (figura 7). Desta forma, temos constituído os dois grupos de estudo com a única diferença de um grupo ser epiléptico e o outro não. Nenhum rato controle foi a óbito.

Figura 7: Delineamento Experimental do grupo controle.

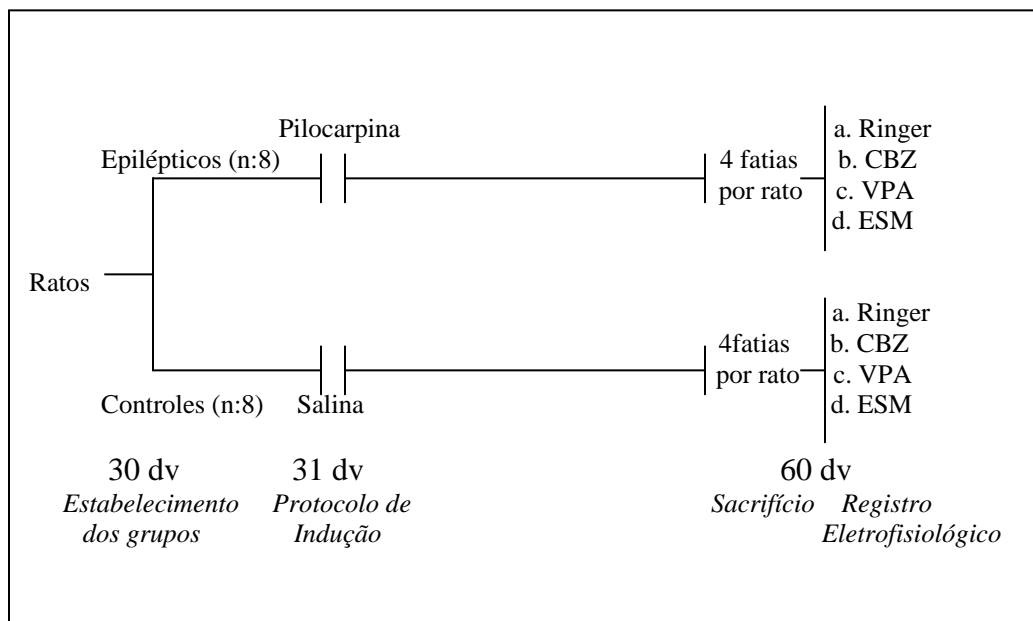


MS: Metilscopolamina, DZ: Diazepam.

4.4 - Delineamento experimental e subgrupos

Além desta divisão inicial entre ratos controle e epilépticos, formamos quatro subgrupos dentro de cada grupo com o intuito de estudar o efeito dos FAEs. Os quatro subgrupos consistiram dos registros eletrofisiológicos controle com Ringer e dos estudos com os fármacos em foco: CBZ, VPA e ESM. Dessa forma obtemos o seguinte delineamento de estudo:

Tabela 5: Delineamento Experimental e subgrupos:



CBZ: carbamazepina, VPA: valproato, ESM: etoxuccimida, dv= dias de vida.

Assim, foram analisados 16 ratos ao todo, sendo oito normais e 8 epiléticos. Como para cada um dos ratos foram ensaiadas quatro fatias hipocampais, cada uma individualmente correspondendo a um registro eletrofisiológico do protocolo de LTP, para que fosse testado cada um dos três fármacos e 1 controle (Ringer) por fatia/registo, teremos 32 estudos por grupo, ou 64 registros ao todo (controles e epiléticos). Não se utilizou a mesma fatia hipocampal do mesmo rato para todos os quatro estudos para evitar que a indução de um pudesse interferir na fisiologia hipocampal do próximo.

4.5 - A obtenção das fatias de hipocampo para o estudo *in vitro*

Transcorrido o período de 30 dias após a indução da ELT pela injeção de pilocarpina e da simultânea constituição do grupo controle (60 dias de vida), os animais foram sacrificados e tiveram seus hipocampus dissecados e fatiados para o registro eletrofisiológico e indução da LTP.

Antes de serem sacrificados por decapitação, mediante uso de guilhotina (*Insight Equipamentos*) todos os animais foram pesados e anestesiados com Tiopental (40mg/Kg). Rapidamente após a decapitação, era realizada a craniotomia com o auxílio de uma lâmina de bisturi, uma tesoura e uma pinça, conforme os cortes demonstrados na figura 8. A seguir, o encéfalo era dissecado e extraído da caixa craniana utilizando-se uma espátula e imediatamente submerso em líquido cefalorraquidiano artificial de dissecção (Ringer de dissecção) em constante oxigenação (Figura 9). A composição para o Ringer de dissecção era, em mM: NaCl- 124; KCl- 2; KH₂PO₄ - 1.25; MgSO₄ -5; CaCl₂- 0.2; NaHCO₃- 26; D-Glicose- 10, em pH de 7.4 (Avoli e Oliver, 1989). Em comparação ao Ringer normal descrito a seguir, este possuía baixo nível de cálcio, alto nível de magnésio e era mantido em baixa temperatura (entre 0 e 4°C) para evitar o estresse celular.

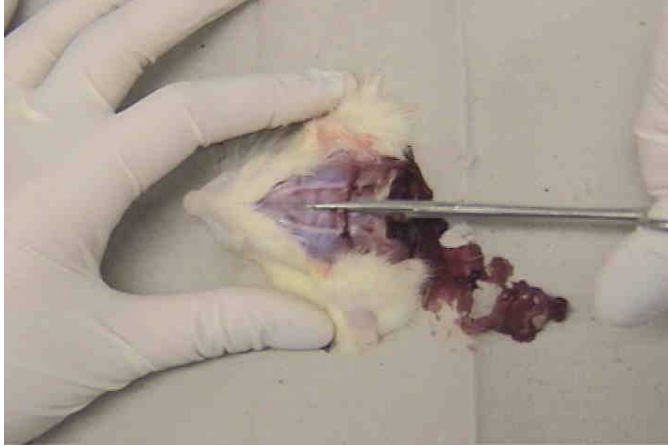


Figura 8: Realização da craniotomia após a abertura da pele com o bisturi, em cabeça recém-decapitada.



Figura 9: Retirada do encéfalo da caixa craniana com o auxílio de espátula apropriada e submersão em ringer de dissecação gelado.

Logo em seguida a remoção, o encéfalo era colado em uma lamínula (figura 10) suportado por ágar (também colado) em sua face posterior, formando um bloco para facilitar o corte. Então, esta montagem encéfalo/ágar sobre a lamínula era, por sua vez, colada em uma cuba própria para ser fixada na plataforma do vibrátomo (*Vibroslice*, modelo 752 M - *Campden Instruments*, EUA). Esta cuba, que então se encontrava repleta de Ringer de dissecação sob baixa temperatura

mantendo o encéfalo submerso, recebia um fluxo lento de uma mistura gasosa (“carbogênio” - 95% de O₂/ e de 5% CO₂) para manter a viabilidade do tecido encefálico.

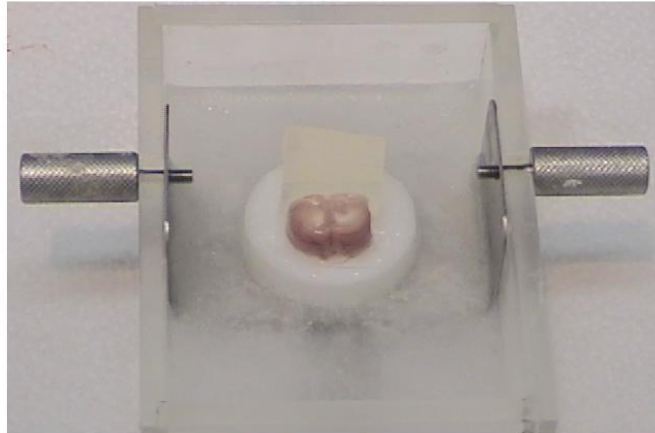


Figura 10: Encéfalo colado juntamente com o ágar sobre a lamínula para ser fatiado.

Desta forma, estava preparado o encéfalo para ser fatiado no vibrátomo (Figura 11). Foram realizados cortes axiais obtendo-se fatias de tecido na altura do hipocampo com uma espessura de 400 μ m. Essas fatias, após o corte, eram colocadas em repouso em um recipiente contendo líquido cefalorraquidiano artificial normal (Ringer normal) em temperatura ambiente (aproximadamente 21° - 24° C) também sob constante oxigenação (figura 12). A composição do Ringer normal era, em mM: NaCl, 124; KCl, 2; KH₂PO₄, 1.25; MgSO₄, 2; CaCl₂, 2; NaHCO₃, 26; D-Glicose, 10, sob pH de 7.4 (Henderson 1984).

Terminado o fatiamento, realizava-se a dissecação manual do hipocampo do restante do encéfalo, sob lupa cirúrgica de mesa (Jena, Alemanha) (figura 13) com auxílio de microtesoura e pinça. Após isso, as fatias hipocampais ficavam em repouso durante 1 hora, em um Becker contendo Ringer normal, sob oxigenação constante, para posteriormente serem levadas à câmara de registro.

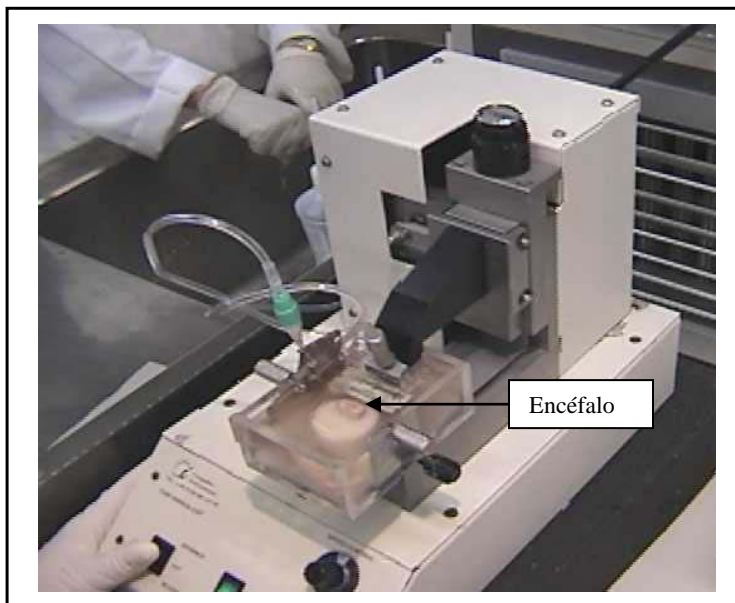


Figura 11: Vibrátomo utilizado no fatiamento do encéfalo em cortes com espessura de $400\mu\text{m}$, sob constante oxigenação e à temperatura entre 0 e 4°C .

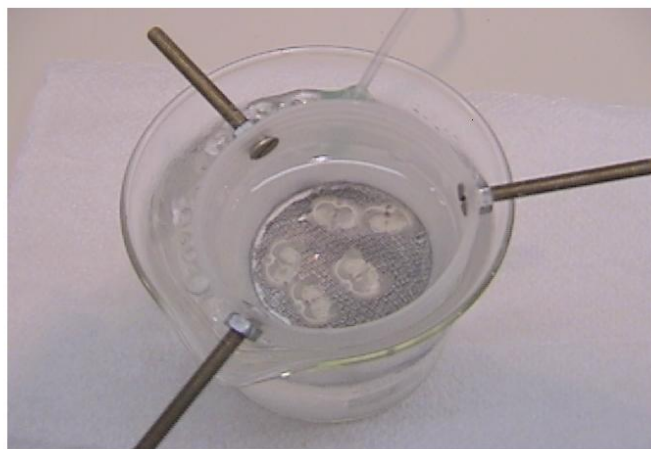


Figura 12: Fatias de encéfalo de 1 rato em Ringer normal sob constante oxigenação (banho de manutenção).

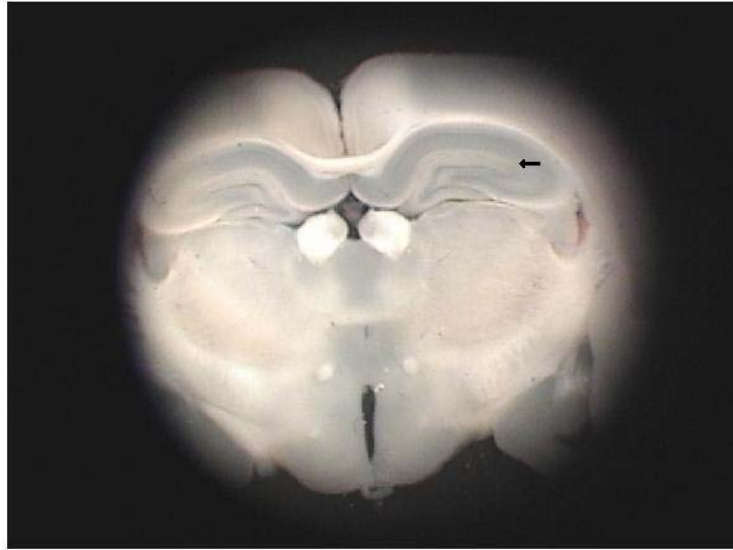


Figura 13: Imagem visualizada sob lupa cirúrgica de mesa de uma fatia encefálica durante a dissecação dos hipocampos (seta salientando o hipocampo direito).

4.6 - Os instrumentos para realização dos registros eletrofisiológicos

A montagem do equipamento de eletrofisiologia (*setup*) (Figura 14) é realizada sobre uma mesa antivibracional (TMC- *Technical Manufacturing Corporation*). Além de servir de suporte aos equipamentos, esta mesa absorve a trepidação do ambiente sobre os eletrodos evitando assim seu deslocamento quando posicionados no tecido hipocampal. Esse sistema livre de vibração funciona através de circulação interna de gás nitrogênio.

Sobre a mesa antivibracional encontrava-se a cuba com a fatia de hipocampo, os eletrodos de estímulo e registro, o pré-amplificador, os micromanipuladores e a lupa, todos envolvidos por uma gaiola de Faraday (TMC - *Technical Manufacturing Corporation*). Esta gaiola promove o isolamento protetor contra os ruídos eletromagnéticos produzidos pelos equipamentos eletroeletrônicos do ambiente.

Também sobre a mesa antivibracional e envolta pela gaiola de Faraday a câmara de registros que serve para abrigar, manter viável e permitir a manipulação das fatias de tecido cerebral durante o registro eletrofisiológico.

É na cuba da câmara de registro que a fatia de hipocampo mantém-se estática sobre um papel filtro, estando constantemente embebido em uma lâmina de Ringer normal, em fluxo constante, aquecida e oxigenada. A temperatura da câmara é mantida a 34° C por meio de um termorregulador acoplado. A oxigenação é realizada por fluxo constante de carbogênio (95% de O₂/ e de 5% CO₂).

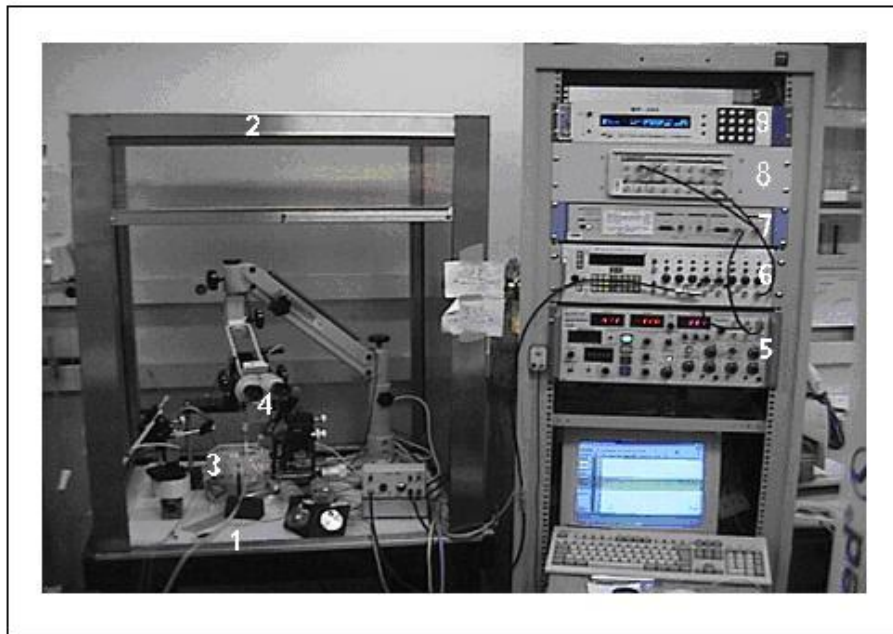


Figura 14: Montagem do Equipamento (*SETUP*) de eletrofisiologia com: (1) mesa antivibracional, (2) gaiola de Faraday, (3) câmara de registro, (4) lupa cirúrgica de mesa, (5) amplificador AXOCLAMP-2B, (6) estimulador Master-8, (7) condicionador de sinais CyberAmp 320 (8) conversor analógico-digital Digidata 1322A (9) controle do minimanipulador MP285.

Como o nosso intuito foi o de estudar a LTP nas sinapses entre a via Colateral de Schaffer e os neurônios piramidais de CA1, o eletrodo de estímulo foi posicionado na região correspondente aos axônios desta via e o eletrodo de registro na região dendrítica (*stratum radiatum*), a região onde se localizam estas sinapses (figura 15).

O posicionamento dos referidos eletrodos foi realizado através de micromanipuladores. Foi utilizado um do tipo manual para o eletrodo de estímulo, e um motorizado MP285 (*Sutter Instrument Company*) para o eletrodo de registro. Além disso, para uma adequada visualização do hipocampo e dos eletrodos durante o posicionamento, utilizou-se uma lupa cirúrgica de mesa (MU m 19, D.F.Vasconcellos) (Figura 14).

Como eletrodo de estímulo foi utilizado um microeletrodo bipolar de platina-irídio, com diâmetro interno de 75 μm e externo de 140 μm isolado externamente com *teflon*, exceto em suas pontas. O seu posicionamento era realizado introduzindo-se a extremidade em torno de 100 μm no *stratum radiatum* da fatia de hipocampo.

Para o eletrodo de estímulo emitir o pulso de corrente de estímulo basal (20 Hz), bem como o trem de pulso (100 Hz) de estímulo para a indução da LTP, na frequência e intensidade de corrente adequados, utilizou-se um gerador de pulso programável, o Master 8.

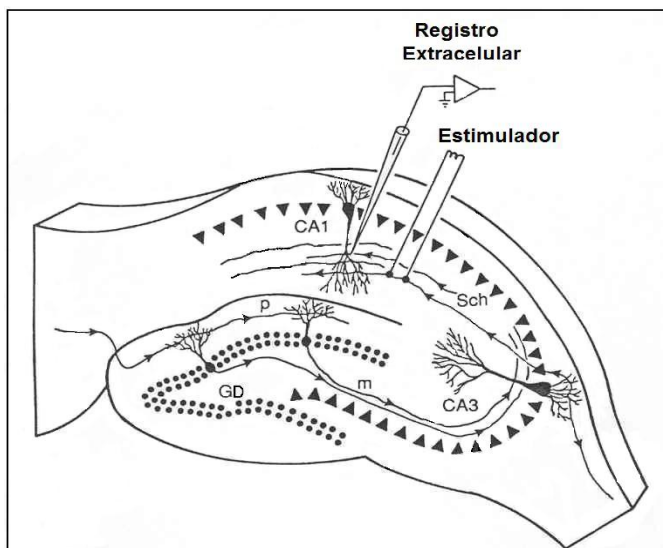


Figura 15: Fatia hipocampal mostrando o posicionamento dos eletrodos de estímulo, na via colateral de Schaffer (Sch), e de registro, no *stratum radiatum* de CA1. GD: giro denteado; p: via perfurante; m: via de fibras musgosas. Modificado de Braun e Zador, 1990.

Para captação dos grafoelementos do registro extracelular gerados utilizou-se uma micropipeta de vidro (capilares de boro-silicato). Estas micropipetas de registro apresentavam, antes do estiramento, o diâmetro externo de 1.5 mm e o interno de 1.12 mm e foram preparadas com o auxílio de um estirador de micropipetas MP-87 (*Sutter Instrument Company*). Após estiradas, eram preenchidas com Ringer normal e sua resistência permanecia entre 0,1 a 10 M Ω .

O sinal captado pela micropipeta de registro (o PEPS) era pré-amplificado pelo headstage (*Axon Instruments*), um pré-amplificador diferencial com ganho unitário. Após, o PEPS era enviado ao AxoClamp 2B (*Axon Instruments*) que atua como fixador de corrente. Em seguida o estímulo captado passava por um condicionador de sinais, o CyberAmp 320 (*Axon Instruments*), e deste, a um conversor do sistema analógico em digital, o Digidata 1322A (*Axon Instruments*). O PEPS então era visível e mensurável (a amplitude e a inclinação) no microcomputador, utilizando-se o software AxoScope9 (*Axon Instruments*). Para os cálculos destas

medidas era utilizado o software Excel (*Microsoft*) e para construção de gráficos o Origin 5.0 (*Microcal™ Software, Inc.*) (Figura 14 e 16).

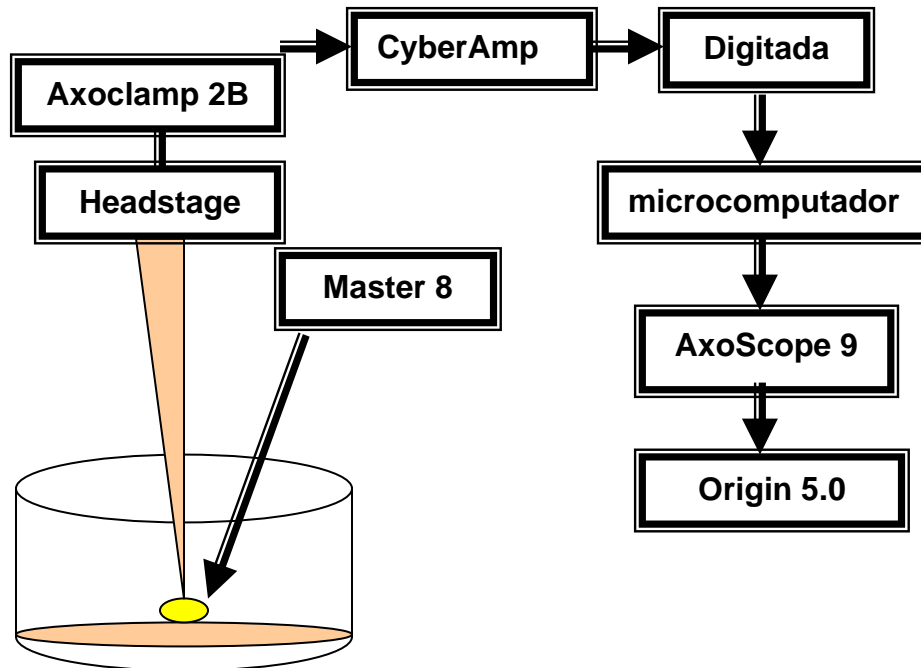


Figura 16: Ilustração esquemática dos equipamentos utilizados para a obtenção dos registros eletrofisiológicos de campo para o estudo da LTP.

4.7 - Aquisição dos registros eletrofisiológicos e a indução da LTP

Com os eletrodos de estímulo e de registro adequadamente posicionados, na via colateral de Schaffer e *stratum radiatum* de CA1 respectivamente, conforme descrito acima, iniciávamos a busca dos grafoelementos do registro de campo (extracelular), que, no nosso estudo, era sempre o PEPS. Quando identificado, mantinha-se durante todo o estudo uma intensidade de corrente necessária para se obter dois terços da amplitude máxima do PEPS, geralmente um valor entre 50 e 70 μ A. Após, os estímulos eram mantidos em uma frequência de 0.05 Hz

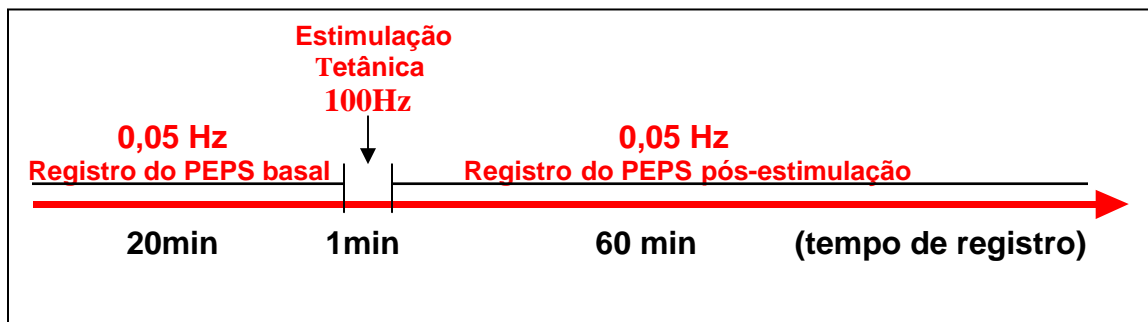
durante todo o tempo do registro, excetuando-se apenas o breve período de estimulação tetânica (Figura 17).

Depois de estabilizada a amplitude do PEPS, iniciava-se a gravação dos grafoelementos que só terminaria no final de experimento. Em primeiro lugar, registrava-se a atividade de base durante vinte minutos, o que era tomado como o valor basal (valor pré-estimulação), ou referencial de 100% para quantificar o quanto potenciou (aumentou) a amplitude após a hiper-estimulação elétrica tetânica.

O protocolo de estimulação elétrica tetânica consistiu da aplicação de quatro trens de estímulo elétrico a 100Hz, cada um com 1 segundo de duração, aplicados a intervalos regulares de 20 segundos, com mesma intensidade de corrente em uso durante o registro basal (pré-estimulação). Este protocolo de indução da LTP segue o mesmo descrito por Bliss e Lømo em 1973 quando da descrição do fenômeno da LTP.

Realizada a estimulação, mantinha-se o mesmo protocolo utilizado para o registro da atividade de base nos vinte minutos iniciais (frequência de 0.05 Hz, mesma intensidade de corrente, jamais trocando a posição dos eletrodos); o registro já em curso seguia sendo feito inclusive durante a estimulação, por mais 60 minutos (figura 17).

Figura 17: Delineamento experimental do estudo eletrofisiológico para registro da atividade de base e da LTP* pós-estimulação elétrica tetânica.



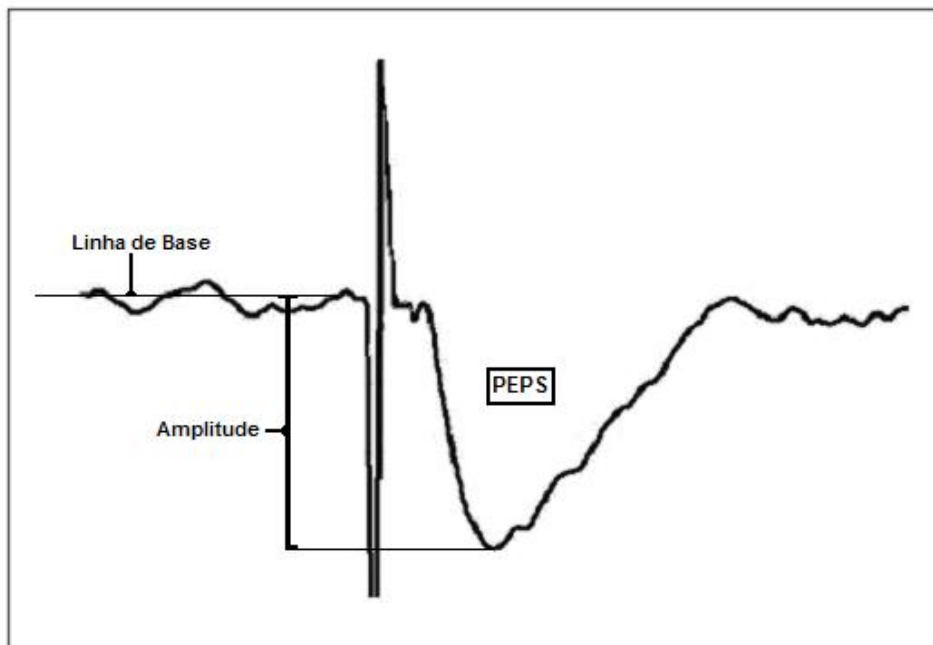
*Sob intensidade de corrente constante.

4.8 - Análise dos registros eletrofisiológicos obtidos

A análise dos PEPS obtidos foi realizada com o auxílio do microcomputador com seguintes programas: AxoScope 9 (Microcal TM Software, Inc., EUA), Excel (Microsoft [®] Excel97), Origin 5.0 (Microcal TM Software, Inc., EUA). Os PEPS eram visualizados na tela do microcomputador e medidos através do programa AxoScope 9 (como na figura 18 e 19). Duas medidas foram consideradas: a amplitude e a inclinação (*slope*).

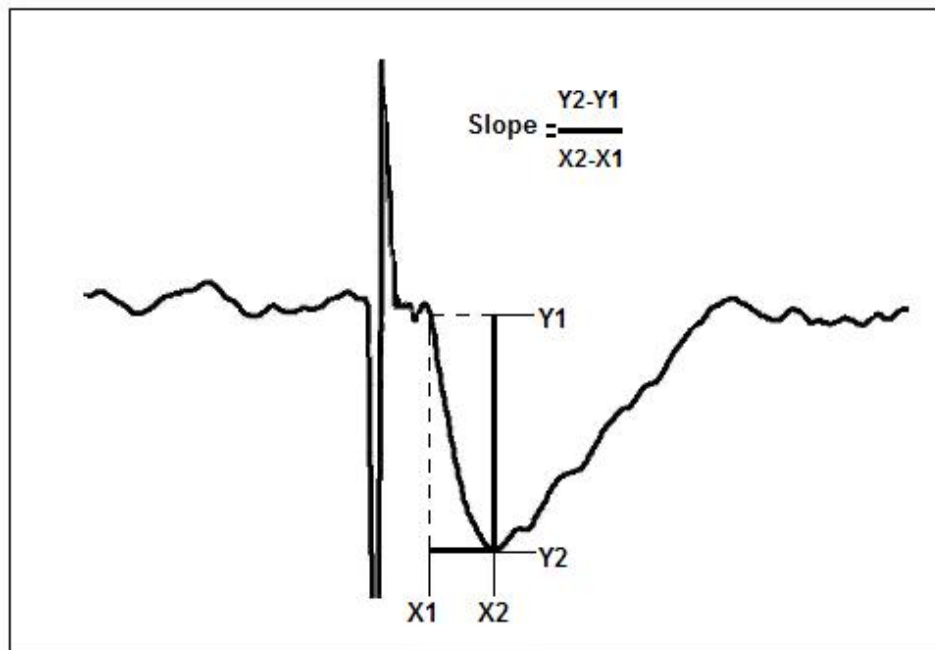
A amplitude refere-se ao tamanho da deflexão, medida da linha de base até o ponto mais inferior alcançado por esta onda negativa (Figura 18), e é medida em milivolts (mv).

Figura 18: No programa AxoScope medimos o tamanho da onda do PEPS, em milivolts, como a distância entre a linha de base até o ponto mais inferior da deflexão (linha cheia).



Por sua vez, a inclinação refere-se ao grau de inclinação do braço descendente do referido PEPS (Figura 19). Sua unidade é mv/ms. A forma adotada para o cálculo do slope baseia-se na divisão do tamanho do braço descendente (Y), que é medido de um ponto do início da deflexão até o ponto mais inferior do PEPS, pelo tempo para percorrer estes dois pontos (X) (Sarihi e cols. 2002).

Figura 19: No programa AxoScope medimos o *slope*, ou seja, o grau de *inclinação* do braço descendente do PEPS, como a razão entre o tamanho do braço descendente (mv) pelo tempo (ms) percorrido por este mesmo braço (linha tracejada).



Para confecção dos gráficos típicos de LTP (Figura 20) foram utilizados os valores da amplitude durante o registro. Como o registro de base é realizado sob estimulação a 0,05Hz, isso equivale a três estímulos por minuto. Desta forma, foi realizada a média da amplitude de três em três PEPS sucessivos, valor que corresponde à média do minuto cujos pontos correspondentes estão distribuídos ao longo do gráfico.

Além disso, para possibilitar a realização dos cálculos e análise estatística das amplitudes e da inclinação, foram escolhidos momentos ao longo do tempo total de registro para representá-los. Estes tempos foram os minutos -10 e -1 do registro de base pré-indução e 1, 5, 30 e 60 minutos após a indução (estímulo de alta frequência - 100Hz) (Figura 21). Cada tempo representa a média dos 10 registros correspondentes ao período aproximado que compreendia cada um desses minutos.

Figura 20: Gráfico típico de LTP. Observa-se o aumento médio na amplitude do PEPS (de aproximadamente 45%) após a estimulação elétrica de alta frequência (tempo 0). Proveniente do nosso estudo.

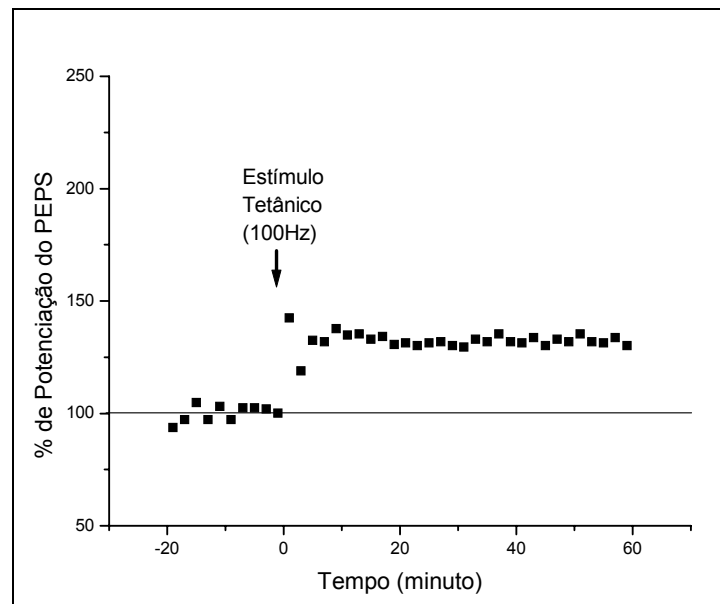
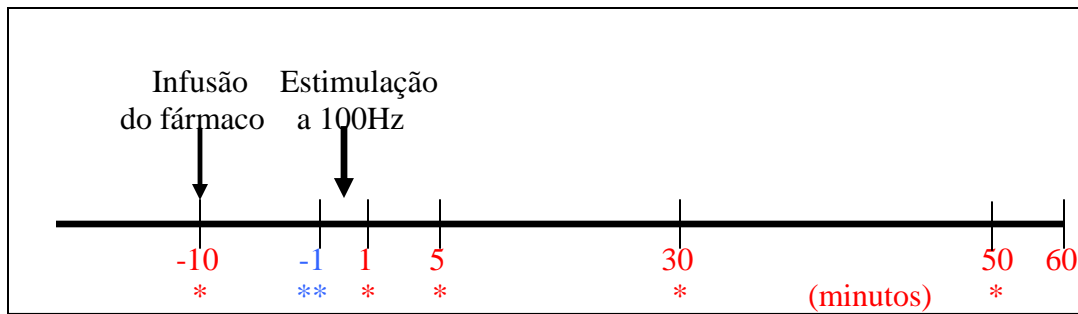


Figura 21: Delineamento experimental básico: etapas utilizadas para análise estatística* sempre comparando com a etapa controle**.



A confirmação de que se obteve LTP após a estimulação tetânica dependia da ocorrência de um aumento sustentado na amplitude do PEPS basal de no mínimo 40%, por um período mínimo de 30 minutos. Este aumento mínimo era comparado com a amplitude do “minuto -1”, considerado como valor referência para a comparação com os valores dos minutos 1, 5, 30 e 50 após a indução. O valor -10 corresponde ao momento da suspensão da infusão de Ringer pelo início da infusão do fármaco em estudo (exceto no estudo controle, no qual se mantinha Ringer durante todo o estudo).

4.9 - Os fármacos em estudo: diluição e administração

A escolha dos fármacos do presente estudo baseou-se no seu efeito clínico, conforme descrito anteriormente. Foi escolhido um fármaco de amplo espectro, com ação tanto em epilepsias parciais quanto em generalizadas, o VPA. Também foi usado um antiepiléptico com ação principalmente em epilepsias parciais, a CBZ. E por último foi escolhido

o fármaco de ação específica em epilepsia generalizada (crises de ausência), a ESM (Elkis, 1998).

Estes fármacos foram infundidos *in vitro* durante o registro eletrofisiológico nas fatias de hipocampus dos referidos ratos cronicamente epilépticos e em seus controles. Foram aplicados por banho de perfusão através da câmara de registros e em concentração baseada na concentração plasmática recomendada para ser obtido um controle satisfatório das crises convulsivas *in vivo* (McNamara, 1996) (tabela 5).

O estudo controle, sem fármacos, foi realizado sob perfusão de Ringer, que foi a solução que serviu de veículo para administração dos fármacos. O VPA (*Sigma-Aldrich*) e a ESM (*Sigma-Aldrich*) são facilmente diluídos em Ringer, o que foi diretamente realizado alcançando concentrações finais de 600 μ M e 700 μ M, respectivamente. Quanto à CBZ (*Sigma-Aldrich*) foi necessário primeiro realizar diluição em dimetil-sulfóxido (DMSO; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) e, posteriormente, adiciona-lo ao banho de perfusão chegando-se à concentração final de CBZ de 50 μ M e de DMSO de 0,03%. Utilizamos no banho do grupo controle para a CBZ a mesma concentração final de DMSO (0,03%).

Tabela 6: As concentrações dos FAEs utilizadas no banho de perfusão (Ringer) estão relacionadas à concentração plasmática recomendada ao controle de crises convulsivas na prática clínica diária.

Droga	Concentração plasmática em μ g/ml*	Concentração plasmática em μ M**	Concentração utilizada no banho de perfusão em μ M
Carbamazepina	6-12	25-50	50
Ácido valpróico	30-100	181-601	600
Etossuximida	40-100	284-709	700

*Conforme McNamara, 1986. **Calculado a partir de McNamara, 1986.

4.10 - Análise estatística

O plano de análise estatística foi direcionado conforme as diferentes características dos nossos dados:

1) Quando os dados eram repetidos e com distribuição aproximadamente normal e com variâncias homogêneas usamos análise da variância (ANOVA) para medidas repetidas;

2) Quando nos deparamos com variância muito heterogênea dos dados, o que não nos permitia usar a ANOVA “clássica”, usamos um teste não paramétrico para dados repetidos, o teste de Kruskal-Wallis;

3) Quando criamos variáveis categóricas do tipo “induziu LTP” ou “não induziu LTP” (com base na amplitude do PEPS ter alcançado ou não, respectivamente, após a estimulação, 40% da amplitude basal), ou seja, variáveis dicotômicas, para a análise em comparações múltiplas⁷¹ (grupos, tratamentos e tempos) foi realizado um teste não paramétrico para amostras pareadas (teste Q de Cochran) (Zar, 1999).

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ($\alpha = 5\%$) o nível de significância adotado.

5 - RESULTADOS

5 - RESULTADOS

Nossos resultados referem-se aos 64 registros eletrofisiológicos de campo para o estudo da LTP (4 registros por rato, sendo 1 controle sob Ringer e os outros sob o efeito de CBZ, VPA e ESM), sendo que a metade destes foram realizados em ratos controle e a outra metade em epiléticos crônicos pelo modelo da pilocarpina (ver em *anexos* os gráficos do grau de potenciação do PEPS pelo tempo dos 64 registros).

Inicialmente analisamos, tomando como amostra os minutos -10 e -1, se houve adequada estabilização da amplitude e da inclinação (*slope*) nos 20 minutos do registro de base antes da indução da LTP. Isto foi avaliado para verificar a integridade funcional da fatia de hipocampo. Nos nossos registros não houve qualquer diferença estatisticamente significativa de estabilização entre todos os 64 registros, entre os 2 grupos (normais e epilético), entre os 16 ratos entre si e entre os tratamentos (CBZ, VPA e ESM) com relação ao controle sem fármacos (Tabela 7), o que denota semelhança dos registros de base pré-indução nestes fatores.

Tabela 7: Análise comparativa da amplitude e da inclinação do EPSP basal entre grupos, ratos e tratamentos: uma forma de validação dos registros (ANOVA).

	Amplitude		Inclinação (<i>slope</i>)	
	F	P	F	p
Total registros	0,92	0,571	0,57	0,917
Grupos*	0,07	0,788	0,34	0,562
Ratos**	1,02	0,451	0,56	0,883
Tratamentos***	1,05	0,379	0,51	0,675

O total de registros refere-se aos 64 registros do estudo. *Grupos referem-se aos ratos controles e epiléticos, os dois grandes grupos (32 registros por grupo). ** Ratos correspondem a comparação entre os 16 ratos do estudo (4 registros por grupo). *** Tratamentos referem-se a comparação entre Ringer, CBZ, VPA e ESM, ou seja, comparando estes quatro grupos entre si (16 registros em cada grupo).

5.1- A probabilidade de obtenção e manutenção da LTP em ratos controle e epiléticos

Foi realizada a análise comparativa do percentual de obtenção e manutenção da LTP de ratos epiléticos crônicos com seus controles (Tabela 8). No primeiro minuto após a estimulação tetânica encontramos quase idêntico percentual de obtenção de LTP comparando controles e epiléticos. Por outro lado, a manutenção da LTP sofreu uma tendência, sem significância estatística, de ocorrer mais freqüentemente nos ratos normais do que nos epiléticos (em especial no 30º minuto: 65,6% e 40,6%, respectivamente; $p=0,080$).

Tabela 8: Análise comparativa do percentual de obtenção da LTP nas diversas amostras obtidas dos ratos controles e epiléticos, nos tempos 1, 5, 30 e 50 minutos*.

	Controles	Epiléticos	p**
Minuto 1	59,4%	53,1%	0,801
Minuto 5	50%	37,5%	0,450
Minuto 30	65,6%	40,6%	0,080
Minuto 50	65,6%	46,9%	0,208

*Analisado o total de 32 estudos eletrofisiológicos (1 por fatia de hipocampo) por grupo.

** teste Q de Cochran.

Foram analisadas também as características quanto à média de aumento percentual da amplitude e da inclinação entre os animais que desenvolveram LTP (Tabelas 9 e 10). Não se encontrou diferença estatisticamente significativa, embora uma tendência no 5º minuto da média de aumento percentual da amplitude ser maior do grupo controle (77,4% em relação a 56,9% no grupo epilético; $p=0,061$). Também a inclinação não se comporta de forma diferente entre os ratos controle e epiléticos que obtiveram LTP.

Tabela 9: Comparação da média de aumento percentual da amplitude entre o grupo controle e o epiléptico nos tempos 1, 5, 30 e 50 minutos (ANOVA 1 via).

	Controles		Epilépticos		p
	Média	DP	Média	DP	
Minuto 1	81,3%	38,6%	86,7%	47,2%	0,689
Minuto 5	77,4%	36,7%	56,9%	16,1%	0,061
Minuto 30	72,3%	39%	67,3%	25%	0,680
Minuto 50	68,1%	27,1%	68,5%	29,7%	0,966

Tabela 10: Comparação da média de aumento percentual da inclinação entre o grupo controle e o epiléptico nos tempos 1, 5, 30 e 50 minutos (ANOVA 1 via).

	Controles		Epilépticos		p
	Média	DP	Média	DP	
Minuto 1	94,6%	58,2%	106,2%	54,7%	0,541
Minuto 5	97,9%	54,5%	91,8%	44%	0,754
Minuto 30	99%	76,8%	81,6%	65,2%	0,502
Minuto 50	86%	49,4%	86,4%	51,4%	0,981

5.2- Análise do efeito da perfusão das fatias com FAEs nos parâmetros da LTP em ratos controle

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no percentual de indução e manutenção da LTP sob efeito dos diferentes fármacos. Apesar disso, encontramos uma tendência a maior percentagem de obtenção de LTP com a perfusão de CBZ (Figura 22 e Tabela 11).

Quando analisamos a média do percentual de aumento da amplitude e da inclinação entre os que obtiveram LTP não constatamos diferenças significativas entre os diferentes grupos de FAE (Tabelas 12 e 13).

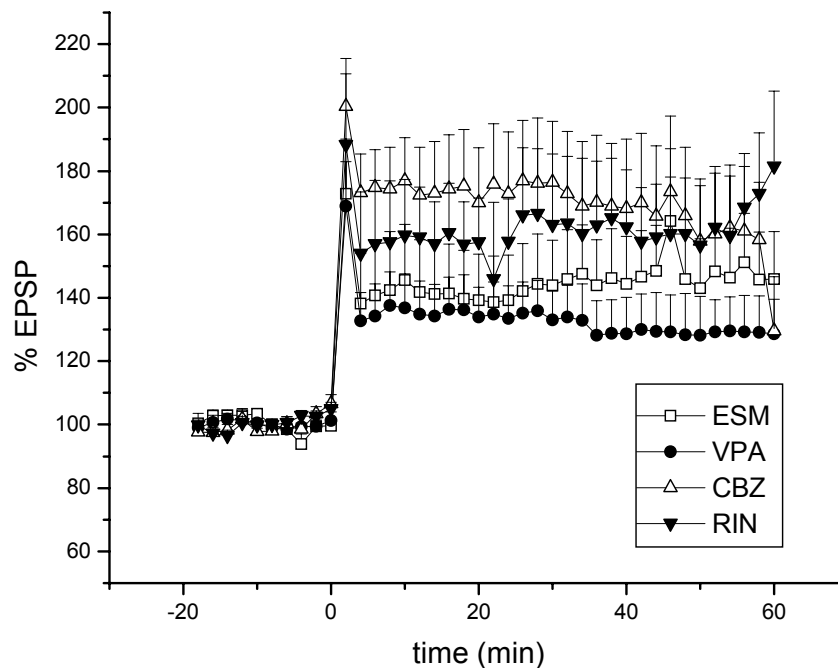


Figura 22: Análise no grupo controle do efeito do ringer, da CBZ, do VPA e da ESM no percentual de aumento da amplitude do potencial pós-sináptico excitatório (EPSP) ao longo do tempo.

Tabela 11: Análise comparativa do efeito dos FAEs na obtenção da LTP em ratos controle.

	Ringer*	CBZ*	VPA*	ESM*	p**
Minuto 1	62,5	87,5	37,5	50	0,142
Minuto 5	50	75	25	50	0,334
Minuto 30	62,5	87,5	37,5	75	0,309
Minuto 50	62,5	87,5	37,5	75	0,309

*Resultado expressa o percentual de casos testados (n por droga: 8) que obtiveram LTP (considerado quando houve aumento de amplitude do PEPS de 40% ou mais após estimulação tetânica).

**teste Q de Cochran.

Quando analisamos o grau de potenciação média da inclinação entre os que obtiveram ou não LTP, constatamos que inclinação segue a mesma tendência da amplitude (o parâmetro considerado para haver ou não LTP) em sua potenciação (Tabela 14).

Tabela 12: Comparação entre efeito dos FAEs na média da amplitude (valor expresso como % de aumento da amplitude do PEPS após estimulação tetânica) dos que obtiveram LTP nos ratos controle (ANOVA de 1 via).

	Ringer		CBZ		VPA		ESM		p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Minuto 1	78,5	58,5	81,7	34,1	74,1	16	89,5	41,6	0,966
Minuto 5	77,5	54,7	84,9	25,1	65,1	21	77,4	36,7	0,926
Minuto 30	80,9	56,1	81,5	40	56,1	20,7	62,7	31,6	0,709
Minuto 50	73	41,7	69,3	21,8	56,4	22,1	68,5	25,9	0,884

Tabela 13: Análise comparativa do efeito dos FAEs no percentual de aumento da inclinação dos ratos controle que obtiveram LTP (ANOVA de 1 via).

	Ringer		CBZ		VPA		ESM		p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Minuto 1	95,6	55,6	100,7	83,4	82,7	44,6	91,2	26,5	0,979
Minuto 5	103,7	43,9	104,4	75,6	105,3	39,4	78,4	47,4	0,902
Minuto 30	87,9	60,7	121,1	124,8	108,6	19,7	79,1	21,3	0,797
Minuto 50	78,5	66,8	91,7	66,9	103,1	18,7	76,9	17,5	0,877

Tabela 14: Comparação da média da potenciação da inclinação em estudos que obtiveram e não obtiveram LTP conforme o FAE, em ratos controle nas diversas amostras de tempo dos registros.

	Ringer		CBZ		VPA		ESM	
	Com LTP	Sem LTP	Com LTP	Sem LTP	Com LTP	Sem LTP	Com LTP	Sem LTP
Minuto 1	95,6	30,1	100,7	71,9	82,7	51,6	91,2	48,1
Minuto 5	103,7	11,8	104,4	51,8	105,4	50	78,4	32,1
Minuto 30	87,9	10,1	121,1	-17,8	108,6	30,5	79,2	17,6
Minuto 50	78,5	14,5	91,7	-27,2	103,1	17,8	76,9	17,6

5.3- Análise do efeito da perfusão das fatias com FAEs nos parâmetros da LTP em ratos epilépticos

Ao analisar os ratos epilépticos encontramos uma diferença mais nítida do que nos ratos controle quanto ao maior percentual de obtenção de LTP sob efeito da CBZ, e uma menor obtenção com a ESM. A diferença é estatisticamente significativa no 5º ($p=0,007$) e 30º ($p=0,034$) minutos pós-indução (Figura 23 e Tabela 15).

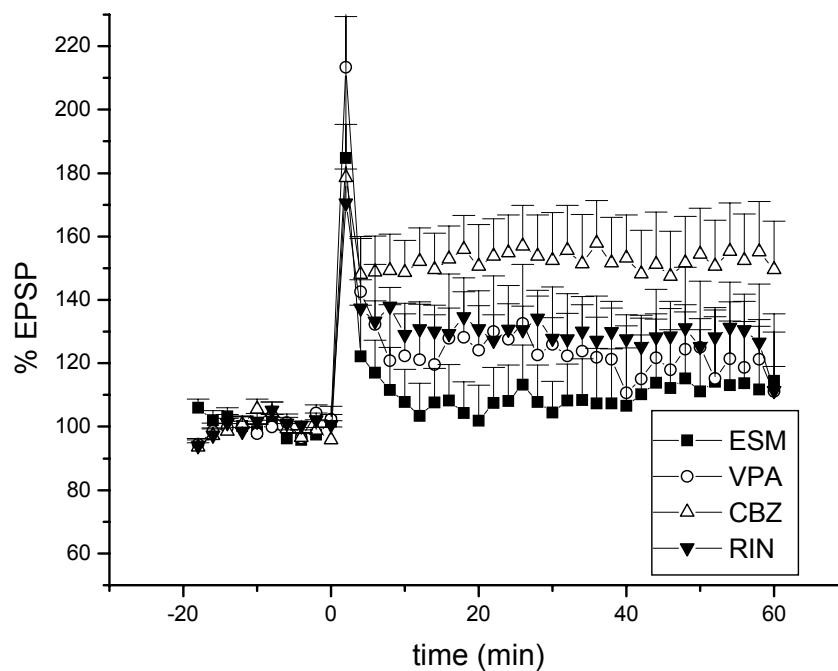


Figura 23: Análise no grupo epiléptico do efeito do ringer, da CBZ, do VPA e da ESM no percentual de aumento da amplitude do potencial pós-sináptico excitatório (EPSP) ao longo do tempo.

Tabela 15: Análise do efeito dos FAEs no percentual de obtenção da LTP em ratos epiléticos.

	Ringer*	CBZ*	VPA*	ESM*	p**
Minuto 1	62,5	62,5	50	37,5	0,861
Minuto 5	37,5 ^{ab}	87,5 ^a	25 ^b	0 ^b	0,007
Minuto 30	25 ^{ab}	75 ^a	50 ^b	12,5 ^b	0,034
Minuto 50	62,5	62,5	37,5	25	0,340

*Resultado expressa o percentual de casos testados (n por droga: 8) que obtiveram LTP (considerado quando houve aumento de amplitude do PEPS de 40% ou mais após estimulação tetânica).

**teste Q de Cochran.

Ao analisarmos o percentual de aumento da amplitude e da inclinação, somente entre os que obtiveram LTP (Tabela 16 e 17) não há diferença estatística.

Quando analisamos o grau de potenciação média da inclinação entre os que obtiveram ou não LTP, constatamos que da inclinação segue a mesma tendência da amplitude em sua potenciação (Tabela 18), da mesma forma que ocorre com os ratos controle.

Tabela 16: Comparação entre efeito dos FAEs na média da amplitude (valor expresso como % de aumento da amplitude do EPSP após estimulação tetânica) dos que obtiveram LTP nos ratos epiléticos (ANOVA 1 via).

	Ringer		CBZ		VPA		ESM		p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Minuto 1	63,6	22,3	85	31,4	109,5	26,7	98,1	87,1	0,278*
Minuto 5	52,2	6,7	55,1	18,6	70,1	15,6	**	**	0,473
Minuto 30	54,7	13	80,4	30,5	60	13,3	42,8	0	0,361
Minuto 50	51,4	9,1	74,1	37,7	82,9	27,3	75,8	49,9	0,490

*Teste de Kruskal-Wallis, devido a heterogeneidade de variâncias.

**Com ESM não houve LTP no minuto 5.

Tabela 17: Análise comparativa do efeito dos FAEs no percentual de aumento da inclinação dos ratos epilépticos que obtiveram LTP (ANOVA 1 via).

	Ringer		CBZ		VPA		ESM		p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Minuto 1	74,1	24,8	125,8	70,1	125,2	45,5	75,3	29,1	0,240
Minuto 5	92,5	33,3	87,9	41,2	104,3	91,9	**	**	0,914
Minuto 30	95,6	113,3	106,9	57,9	45,1	60,4	52,8	0	0,539
Minuto 50	57,5	57,9	104,9	57,8	108,3	32,7	79,1	25,5	0,652

**Com ESM não houve LTP no minuto 5.

Tabela 18: Média do aumento do slope (percentual após estimulação tetânica) em estudos que obtiveram ou não LTP conforme o tratamento, nas diversas amostras de tempo dos registros, em ratos epilépticos.

	Ringer		CBZ		VPA		ESM	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
	LTP	LTP	LTP	LTP	LTP	LTP	LTP	LTP
Minuto 1	74,1	45,4	125,8	46,2	125,1	49,1	75,3	26,5
Minuto 5	92,5	34,9	87,9	42,1	104,3	11,6	**	17,8
Minuto 30	95,6	29,5	106,9	22	45,1	12,8	52,8	8,2
Minuto 50	57,5	49,5	104,9	37,5	108,3	-14,6	79,1	28,2

**Sem LTP no minuto 5 sob efeito do ESM nos ratos epilépticos.

6 - DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

O fato de não constarmos diferença significativa de aumento ou diminuição da amplitude e da inclinação do PEPS nos vinte minutos do registro de base, em quaisquer das comparações realizadas, atesta a fidelidade dos registros eletrofisiológicos. Assim, podemos considerar que não houve oscilação do PEPS basal que pudesse prejudicar a interpretação dos resultados.

Da mesma forma, ao analisarmos o efeito dos FAEs sobre os PEPS basais, podemos observar que, quando comparados com seus controles, não se verificaram alterações do registro de base antes da estimulação tetânica. Isso ocorre inclusive com os registros dos ratos epiléticos, que demonstraram um maior percentual de obtenção da LTP sob ação da CBZ.

6.1- A probabilidade de obtenção e manutenção da LTP em ratos controle e epiléticos

Apesar dos nossos resultados não serem estatisticamente significativos, houve uma tendência de maior sucesso em obter-se LTP nos ratos controle do que em epiléticos no 30º minuto ($p=0,08$). Resultado significativo nesta mesma comparação foi encontrado em estudo recente por Frison e colegas (2003). Neste estudo foram comparados 21 ratos controle com 19 epiléticos (pelo modelo da pilocarpina), tendo sido encontrada uma diferença estatisticamente significativa, com um $p=0,012$, também apenas no 30º minuto.

Apesar de aumentarmos a quantidade de animais previstos no cálculo de tamanho da amostra necessária para a realização do nosso estudo (de 5 para 8 ratos por grupo), possivelmente não houve significância estatística devido ao seu tamanho.

Como referimos anteriormente, apesar de até hoje não ter sido mostrado a direta correlação de causa e efeito, a LTP é considerada como o principal fenômeno que pode estar na base da memória e do aprendizado. Ela é assim considerada (1) por ser ela própria uma forma de memória expressa em nível sináptico, (2) por apresentar as mesmas fases da memória comportamental, (3) por ocorrer em áreas encefálicas envolvidas com aprendizado (e durante sua realização), (4) por sofrer os mesmos efeitos durante estudos em ratos mutantes com defeitos enzimáticos ou (5) durante experimentos farmacológicos específicos (Bliss e Collingridge, 1993; Izquierdo, 1993).

Desta maneira, considerando a LTP um fenômeno eletrofisiológico associado à memória e ao aprendizado buscamos correlacionar os nossos achados também com estudos de memória comportamental *in vivo*. Assim, os estudos utilizando o mesmo modelo (pilocarpina) demonstraram uma menor capacidade no grupo de ratos epiléticos, em comparação aos controles, nas provas de memória espacial (labirinto aquático de Morris e labirinto radial de Onton) (Leite e col., 1990; Wu e col., 2001; Rutten e col., 2002; Kinoshameg e Persinger, 2002), o que está de acordo com os nossos resultados (bem como com os de Frison e colegas).

Seguindo-se a estes achados, Rice e colaboradores (1998) demonstraram que o distúrbio de memória na epilepsia induzida pela pilocarpina é dependente de receptores NMDA. Isto foi baseado no bloqueio do distúrbio através do MK-801, um inibidor destes receptores glutamatérgicos.

Outro estudo também demonstra que utilizando inibidores do brotamento neuronal, achado típico da esclerose hipocampal, evita-se a piora da função cognitiva induzida pela pilocarpina sem evitar o desenvolvimento de epilepsia (Ikegaya e col., 2000). Isto nos alerta em relação aos diferentes mecanismos moleculares e celulares que podem estar envolvidos nos processos de memória e aprendizado paralelamente aos fatores epileptogênicos. O brotamento neuronal aberrante pode tratar-se de um epifenômeno reativo à epilepsia, talvez tentando recuperar a fisiologia normal, e que acaba por interferir com este fenômeno cognitivo dependente do hipocampo. Assim, devemos atentar para estratégias experimentais com medicamentos que bloqueiem o brotamento neuronal para a melhora da memória e aprendizado, associado aos FAEs no tratamento da ELT causada pela ETM.

Igualmente aos modelos animais, os pacientes com epilepsia do lobo temporal também demonstram uma menor capacidade de aquisição de memória (Kilpatrick e col., 1997; Stella, 1999; Fleck e col., 1999; Giovagnoli, 1999; Breier e col., 2000; Hermann e col., 2002; Culhane-Shelburne e col., 2002). Vemos então, a importante congruência dos achados de memória sináptica (a LTP), da memória comportamental em animais de laboratório pelo modelo da pilocarpina e em pesquisa clínica com seres humanos. Isto nos concede um indício mais seguro para validarmos os nossos achados.

Para tentarmos observar alguma diferença de potenciação mesmo entre os que obtiveram LTP por serem controles ou epiléticos, comparamos as médias alcançadas de potenciação da amplitude e da inclinação. Neste contexto, a potenciação se comportou de forma semelhante entre casos e controles.

6.2- O efeito dos FAEs na LTP de ratos controle

No estudo com ratos controle sob efeito dos diferentes fármacos antiepilépticos não obtivemos resultados estatisticamente significativos no percentual de obtenção de LTP. Apesar disso, encontramos uma tendência à facilitação deste fenômeno com o uso de CBZ, FAE que promoveu efeito significativo nos ratos epilépticos. Desta forma, devemos atentar ao fato de que o efeito da CBZ encontrado nos ratos epilépticos não se deve unicamente à interferência nos fenômenos epileptógenos intrínsecos da epilepsia do lobo temporal (tanto de mecanismos celulares quanto de circuitaria aberrante). Deve valer-se também de outros mecanismos existentes durante a neurofisiologia normal do hipocampo, o que remete a importância deste fato nos outros contextos clínicos que não a epilepsia onde também se utiliza a CBZ, como dito anteriormente.

De forma semelhante, foi encontrado por Kubota e colegas (1992) um efeito facilitador da CBZ na LTP do giro denteado de ratos não epilépticos. Também Sudha e colegas (1995) encontraram, em ratos não epilépticos que a CBZ promove melhora do aprendizado. Essa melhora foi associada a uma diminuição de acetilcolinesterase no hipocampo e no córtex piriforme, bem como aumento de serotonina e de dopamina. Esse achado de diminuição da acetilcolinesterase, promovendo aumento dos níveis de acetilcolina é compatível com o principal alvo terapêutico sintomático atual na Doença de Alzheimer (Engelhardt e cols., 2000; Sano e Mitsis, 2002), doença que evolui com um quadro demencial que geralmente se inicia com distúrbios de memória de curta duração que é dependente de conexões hipocampais.

Contrariamente à CBZ, o VPA no nosso estudo mostra uma tendência a dificultar a obtenção da LTP o que está de acordo com estudos eletrofisiológicos prévios (Lee e cols., 1996; Zhang e cols., 2003). Este efeito negativo parece relacionar-se ao aumento da transmissão sináptica inibitória mediada por GABA (Zhang e cols. 2003). De forma análoga, foi observado por Rayevsky e Kharlamov (1993), em estudo de memória comportamental *in vivo*, que drogas GABAérgicas, em especial o VPA, reduzem a taxa de aquisição de respostas aversivas condicionadas.

Um elegante estudo de Modadori e Classen (1984), realizado em ratos *in vivo*, avaliou o efeito de vários FAEs sobre a alteração de memória provocada por eletrochoque. Seus resultados também apontam na mesma direção do nosso estudo, demonstrando que o VPA aumenta e a CBZ reduz significativamente os efeitos amnésicos deste modelo experimental. Em 1989, Rostock e colegas, utilizando o mesmo modelo com eletrochoque, demonstraram da mesma forma, o efeito protetor da CBZ, embora o VPA tenha se mostrado “fracamente ativo”.

Somente identificamos um estudo na literatura sobre efeito da CBZ em testes de memória em indivíduos não epiléticos. Trata-se de um estudo randomizado, duplo-cego, em 15 indivíduos que utilizaram CBZ em dose terapêutica durante um mês; os resultados apontam um prejuízo de performance de memória significativa no grupo tratado (Meador e cols., 1993) o que se contradiz com nossos achados. Não encontramos uma explicação ao fato.

Quanto à análise das médias de aumento de amplitude e inclinação somente entre os animais que manifestaram LTP não encontramos quaisquer diferença entre os tratamentos com FAEs e os controles. Ou seja, todos os animais que exibiram a potenciação se comportaram da mesma forma.

6.3- O efeito dos FAEs na LTP de ratos com epilepsia crônica

Como já dissemos, ao analisarmos os ratos epiléticos encontramos uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,007$ no minuto 5; $p=0,034$ no minuto 30) com relação aos controles em termos de facilidade de obtenção de LTP sob efeito da CBZ e maior dificuldade com ESM. Ou seja, o efeito deste FAE foi mais expressivo em ratos com hipocampos epileptógenos (pelo modelo da pilocarpina) do que nos normais. Isso sugere um efeito “reparador” da CBZ no distúrbio de memória associado a ETM.

Em 1985, Hawkins e colaboradores demonstraram em um modelo animal de epilepsia límbica com injeção hipocampal de toxina tetânica, que, sob uso da CBZ durante a epilepsia, o déficit de memória identificado no teste de labirinto em “Y” era abolido.

Outro estudo, publicado por Engelberts (2002), com epilepsia parcial crônica bem controlada mostrou que o uso de CBZ não prejudica a memória, além de outras funções cognitivas analisadas.

Um importante estudo realizado por Riva e Devoti (1999), analisou a performance cognitiva de 6 crianças durante o uso e 1 ano após a descontinuação da CBZ. Demonstram que durante o uso da substância não afetava as funções intelectuais, de memória, atenção e as funções frontais complexas. Por outro lado, houve melhora das funções relacionadas com o lobo frontal após a suspensão do FAE, o que não contradiz nossos achados que analisaram apenas o hipocampo.

Em contrapartida, estudos em humanos portadores de epilepsia mostram dados em desacordo com os nossos. Gillham e colaboradores (1990) ao analisarem diferentes domínios cognitivos sob efeito de CBZ, VPA e DPH, relatam não haver diferenças em teste de memória sob efeito de CBZ e VPA (e sim menor desempenho com DPH). Este achado está em desacordo com o nosso estudo que mostra um melhor efeito da CBZ que com o VPA na LTP. Essa diferença pode ser devido a nossa amostra ter estudado somente a ELT o que não é o caso do estudo comentado, que utilizou uma amostra de epiléticos sem distinção, o que a nosso ver pode representar um erro de seleção.

Outro estudo, de Forsythe e colaboradores (1991), também demonstra resultado em desacordo o nosso, relatando que a CBZ afeta memória e a VPA não. Este estudo talvez possa diferir do nosso pelo mesmo motivo do anterior que não tratou apenas de ELT; nele foram analisados 64 casos novos de epilepsia (em geral) em crianças que receberam aleatoriamente CBZ, VPA ou DPH. Também contrário ao nosso estudo, o grupo de pacientes estudado por Prevey e colaboradores (1996) e o de Stores e colaboradores (1992), com epilepsia recém diagnosticada não relatam diferenças entre controles e pacientes quanto ao uso de CBZ ou VPA. A crítica a esses estudos ampara-se no fato da epilepsia ser uma condição que abriga sob seu conceito as mais diversas doenças, que afetam diferentemente diversas áreas encefálicas, e que devem ser investigados separadamente para evitar equívoco na seleção dos pacientes. Por esse motivo, estudamos apenas a ELT causada pela ETM a que o modelo da pilocarpina muito se assemelha.

Consistente a isso, o estudo de Ronnberg e colaboradores (1992) que analisou os efeitos da CBZ em monoterapia em pacientes com epilepsia parcial complexa. Seus achados demonstram que a CBZ não induz disfunção de memória, o que não se afasta, em princípio, de nossos

resultados. De forma semelhante, Gigli e colaboradores (1996) demonstram em pacientes com ELT recém-diagnosticada que os efeitos cognitivos da CBZ são mínimos e limitados ao início do tratamento.

Nos animais com epilepsia temporal o VPA e a ESM promoveram uma piora na obtenção da LTP. Estudo de Lamberty e colaboradores (2000) também relata dificuldade na expressão da LTP com VPA em ratos com ELT, embora pelo modelo do abrasamento. Este efeito possivelmente se deva ao sistema GABAérgico, como relatado anteriormente.

A CBZ mostrou-se facilitadora da expressão da LTP no tecido hipocampal epiléptico que tinha se mostrado menos propenso que o controle a desencadear este fenômeno. Isso está de acordo com o estudo clínico em crianças que avaliou o efeito da CBZ na performance psicomotora; este estudo encontrou efeitos dependentes da dose de CBZ *com melhora da função cognitiva com maior dose* (Aman e col., 1990).

Talvez poderíamos supor que a CBZ trouxe melhora significativa também por ser muito efetiva na epilepsia do lobo temporal, ao contrário da ESM (Elkis, 1998). Mas isso não justificaria a menor facilitação pelo VPA que também é ativo neste tipo de epilepsia.

Não encontramos na literatura estudos de ESM, apenas em ELT, para entendermos melhor o motivo da maior dificuldade de se obter LTP que no controle sem fármaco.

Da mesma forma que nos ratos controle, não há diferenças do grau de potenciação entre os que obtiveram LTP conforme o FAE em estudo ou seu controle sem fármaco. Ou seja, entre os que expressaram LTP não ocorrerem diferenças nas características estudadas de aumento da amplitude e da inclinação por efeito de algum dos FAEs.

7 - CONCLUSÕES

7 - CONCLUSÕES

Nosso estudo utilizando o modelo da pilocarpina para indução de ELT em ratos e estudando a LTP em região CA1 do hipocampo evidenciou:

- a. Tendência à uma maior facilidade na obtenção da LTP em ratos controle do que em epiléticos;
- b. Que não há diferença entre os ratos controle e epiléticos que obtiveram LTP quanto à média de amplitude e da inclinação;
- c. Que entre os ratos epiléticos houve uma significativa maior facilidade de se obter LTP sob efeito da CBZ. Por outro lado, houve uma maior dificuldade para se obter este fenômeno com o uso da ESM;
- d. Que não há diferença entre os FAEs e seus controles quanto à média de amplitude e da inclinação entre os animais que obtiveram LTP.

8 - PERSPECTIVAS FUTURAS

8 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o aprendizado adquirido durante o presente estudo e com as várias questões levantadas, pretendemos seguir com esta linha de investigação. Assim, uma das questões que gostaríamos de investigar é quanto a utilização crônica de FAEs. Será que o efeito obtido com o uso da CBZ sob infusão aguda durante o estudo eletrofisiológico é o mesmo ao uso diário (crônico) *in vivo*?

Também nos perguntamos se obteríamos dados estatisticamente semelhantes ao obtido com a memória eletrofisiológica (LTP) ao estudar memória comportamental (*in vivo*) nestes ratos e com estes FAEs.

Além disso, como é sabido que há uma crescente dificuldade com a idade de se produzir a LTP, há dúvida se obteríamos os mesmos resultados ao estudar ratos com outras idades.

Estas questões devem nortear um projeto que continue e aprofunde o presente estudo. Analisaremos ratos controle e epiléticos com diferentes idades (e tempos de epilepsia) sob uso de FAEs diários. Estes ratos serão submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris e, após, ao protocolo de LTP aqui descrito.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agostoni E, Frigerio R, Santoro P. Antiepileptic drugs in the treatment of chronic headaches. *Neurol Sci.* 2003; 24(2):128-31.
2. Aldenkamp AP, Alpherts WCJ, Blennow G, Elmqvist D, Heijbel J, Nilsson HL, Sandstedt P, Tonny B, Wahlander L, Wosse E. Withdrawal of antiepileptic medication: effects on cognitive function in children: the results of the multicentre Holmfrid study. *Neurology* 1993; 43:41-51.
3. Aldenkamp AP. Effects of antiepileptic drugs on cognition. *Epilepsia* 2001; 42(1):46-9.
4. Aman MG, Werry JS, Paxton JW, Turbot SH. Effects of sodium valproate on psychomotor performance in children as a function of dose, fluctuations in concentration and diagnosis. *Epilepsia* 1987; 28:115-24.
5. Aman MG, Werry JS, Paxton JW, Turbot SH, Stewart AW. Effects of carbamazepine on psychomotor performance in children as a function of drug concentration, seizure type and time of medication. *Epilepsia* 1990; 31:51-60.
6. Andersen P, Moser E, Moser MB, Trommald M. Cellular correlates to spatial learning in the rat hippocampus. *J Physiol Paris.* 1996;90(5-6):349.
7. Avoli M, Oliver A. Bursting in human epileptogenic neocortex is depressed by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Neurosci Lett* 1987; 76: 249-54. Breier JI, Fletcher JM, Wheless JW, Clark A, Cass J, Constantinou JE. Profiles of cognitive performance associated with reading disability in temporal lobe epilepsy. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2000; 22(6):804-16.
8. Backonja MM. Use of anticonvulsants for treatment of neuropathic pain. *Neurology.* 2002; 59(2):S14-7.
9. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232(2): 331-56.
10. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361:31-39.
11. Bluncke I, Beck H, Ailing AL, Otmar DW. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1999; 36: 205-23.
12. Brioni JD, Decker MW, Gamboa L. Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning. *Brain Res.* 1990; 522:227-34.
13. Brown TH, Zador AM. Hippocampus. In: Shepherd, editor. *The synaptic organization of the brain.* 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1990. p 347-388.
14. Calandre EP, Dominguez-Granados R, Gómez-Rubio M, Molina-Font JA. Cognitive effects of long-term treatment with phenobarbital and valproic acid in school children. *Acta Neurol Scand* 1990; 81:504-6.
15. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 1991; 32: 778-82.

16. Chiu E. Demência, depressão e qualidade de vida. In: Forlenza OV, Caramelli, editores. Neuropsiquiatria geriátrica. São Paulo: Atheneu; 2000. p 39-50.
17. Cornaggia CM, Gobbi G. Learning disability in epilepsy: definitions and classifications. *Epilepsia* 2001; 42(1):2-5.
18. Coutinho LMB, Hilbig A, Calcagnotto MA, Paglioli E, Paglioli Neto E, Da Costa JC, Palmi AL, De Paula EC. Neuropatologia das epilepsias de difícil controle. *Arq Neuropsiq* 1999; 57(2):405-10.
19. Craig I, Tallis R. Impact of valproate and phenytoin on cognitive function in elderly patients: results of a single-blind randomized comparative study. *Epilepsia* 1994; 35:381-90.
20. Culhane-Shelburne K, Chapiesski L, Hiscock M, Glaze D. Executive functions in children with frontal and temporal lobe epilepsy. *J Int Neuropsychol Soc.* 2002 Jul;8(5):623-32.
21. Dam M. Children with epilepsy: the effect of seizures, syndromes, and etiological factors on cognitive functioning. *Epilepsia.* 1990; 31(4):S26-9.
22. Du F, Whetsell WO Jr, Abou-Khalil B, Blumenkopf B, Lothman EW, Schwarcz R. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1993; 16:223-33.
23. Egelhardt E, Lacks J, Rozenthal M, Marinho VM. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. In: Forlenza OV, Caramelli P, editores. Neuropsiquiatria geriátrica. São Paulo: Atheneu; 2000. p 151-69.
24. Elkis LC. Farmacologia das drogas antiepilépticas. In: Da Costa JC, Palmi A, Yacubian EMT, Cavalheiro E, editores. Fundamentos neurobiológicos das epilepsia: aspectos clínicos e cirúrgicos. São Paulo: Lemos; 1998. p 721-45.
25. Engelberts NH, Klein M, van der Ploeg HM, Heimans JJ, Jolles J, Kasteleijn-Nolst Trenite DG. Cognition and health-related quality of life in chronic well-controlled patients with partial epilepsy on carbamazepine monotherapy. *Epilepsy Behav.* 2002; 3(4):316-321.
26. Ernst CL, Goldberg JF. Antidepressant properties of anticonvulsant drugs for bipolar disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 2003; 23(2):182-92.
27. Fernandes JG, Schmidt MI, Monte TL, Tozzi S, Sander JWAS. Prevalence of epilepsy: the Porto Alegre study. *Epilepsia* 1992; 33(3): 132.
28. Fleck DE, Berch DB, Shear PK, Schefft BK, Privitera MD, Strakowski SM. Directed forgetting deficits in patients with temporal lobe epilepsy: an information processing perspective. *J Int Neuropsychol Soc.* 1999; 5(6):549-55.
29. Forsythe I, Butler R, Berg I, McGuire R. Cognitive impairment in new cases of epilepsy randomly assigned to carbamazepine, phenytoin and sodium valproate. *Dev Med Child Neurol.* 1991; 33(6):524-34.
30. Frison TB. Estudo da potenciação de longa duração em fatias de hipocampo de ratos com períodos distintos de epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina [Dissertação de Mestrado]. Porto alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003. 200p.
31. Gallassi R, Morreale A, Di Sarro R, Marra M, Lugaresi E, Baruzzi A. Cognitive effects of antiepileptic drug discontinuation. *Epilepsia* 1992; 33(6): 41-4.
32. Gigli GL, Maschio M, Diomedes M, Placidi F, Silvestri G, Marciari MG. Cognitive performances in newly referred patients with temporal lobe epilepsy:

- comparison with normal subjects in basal condition and after treatment with controlled-release carbamazepine. *Int J Neurosci*. 1996; 88(1-2):97-107.
33. Gillham RA, Williams N, Wiedmann KD, Butler E, Larkin JG, Brodie MJ. Cognitive function in adult epileptic patients established on anticonvulsant monotherapy. *Epilepsy Res*. 1990; 7(3):219-25.
 34. Giovagnoli AR. Verbal semantic memory in temporal lobe epilepsy. *Acta Neurol Scand*. 1999; 99(6):334-9.
 35. Guerreiro CAM, Guerreiro MM. Cognição e epilepsia. In: Guerreiro CAM, Guerreiro MM, editores. *Epilepsia: o paciente otimamente controlado*. São Paulo: Lemos; 1999. p 33-8.
 36. Hauser WA, Kurland LT. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia*. 1975 Mar; 16(1):1-66.
 37. Hawkins CA, Mellanby J, Brown J. Antiepileptic and anti-amnesic effect of carbamazepine in experimental limbic epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1985; 48(5):459-68.
 38. Hebb DO. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York: Wiley; 1949.
 39. Henderson G. Pharmacological analysis of synaptic transmission in brain slice. In Wallis DI, editor. *Electrophysiology: a practical approach*; 1993. 5^o cap.
 40. Hermann BP, Seidenberg M, Bell B. The neurodevelopmental impact of childhood onset temporal lobe epilepsy on brain structure and function and the risk of progressive cognitive effects. *Prog Brain Res*. 2002; 135:429-38.
 41. Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N. L-type Ca(2+) channel blocker inhibits mossy fiber sprouting and cognitive deficits following pilocarpine seizures in immature mice. *Neuroscience*. 2000; 98(4):647-59.
 42. ILAE - Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*. 1981; 22(4):489-501.
 43. Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amígdala, medial septum and hippocampus of rats. *Behav Neural Biol*. 1992; 58:16-25.
 44. Izquierdo I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. *Drug Dev Res* 1993; 30:1-17.
 45. Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Waltz. Amnesia by infusion of glutamate receptor blockers into the amígdala, hippocampus and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol*. 1992; 58:76-80.
 46. Jones-Gotman M. Psychological evaluation for epileptic surgery. In: Shorvon S, Dreifuss F, Fish D, Thomas D, editores. *The treatment of epilepsy*. 1^a ed. Oxford: Blackwell Science; 1996. p 662.
 47. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of neural science*. 4a ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p 1259.

48. Kilpatrick C, Murrie V, Cook M, Andrewes D, Desmond P, Hopper J. Degree of left hippocampal atrophy correlates with severity of neuropsychological deficits. *Seizure*. 1997; 6(3):213-8.
49. Kim M, Campeau S, Falls WA, Davis M. Infusion of the non-NMDA receptor antagonist CNQX into the amygdala blocks the expression of fear-potentiated startle. *Behav Neural Biol*. 1993; 59(1):5-8.
50. Kinoshameg SE, Persinger MA. Working memory and reference memory in adult rats following limbic seizures induced at 21 or 90 days of age. *Psychol Rep*. 2002; 91(1):729-30.
51. Kubota T, Jibiki I, Fujimoto K, Yamaguchi N. Facilitative effect of carbamazepine on previously induced hippocampal long-term potentiation. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992; 42(4):843-7.
52. Lamberty Y, Margineanu DG, Klitgaard H. Absence of Negative Impact of Levetiracetam on Cognitive Function and Memory in Normal and Amygdala-Kindled Rats. *Epilepsy Behav*. 2000; 1(5):333-342.
53. Lee GY, Brown LM, Teyler TJ. The effects of anticonvulsant drugs on long-term potentiation (LTP) in the rat hippocampus. *Brain Res Bull*. 1996; 39(1):39-42.
54. Leite JP, Nakamura EM, Lemos T, Masur J, Cavalheiro EA. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Braz J Med Biol Res*. 1990; 23(8):681-3.
55. Liang KC, Hon W, Tyan YM, Liao WL. Involvement of hippocampal NMDA and AMPA receptors in acquisition, formation and retrieval of spatial memory in the Morris water maze. *Chin J Physiol*. 1994; 37(4):201-12.
56. Lomo T, The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358:617-20.
57. Lorente De No. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal fur Psychologie und Neurologie* 1934; 46:113-74.
58. Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – a decade of progress? *Science* 1999; 285:1870-73.
59. Marino JrR, Cukiert A, Pinho E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo. Um estudo da prevalência. *Arq Neuro-Psiquiatr (São Paulo)* 1986; 44(3):243-254.
60. McIlwain H, Buchel L, Cheshire JD. The inorganic phosphate and phosphocreatine of brain especially during metabolism in vitro. *Bioch J* 1951; 48:12-20.
61. McNamara JO. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, editores. *The pharmacological basis of therapeutics*. 9a ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p 475.
62. Meador KJM, Loring DW, Allen ME, Zamrini EY, Moore EE, Abney OL, King DW. Comparative cognitive effects of carbamazepine and phenytoin in healthy adults. *Neurology* 1991; 41:1537-40.
63. Meador KJM, Loring DW, Abney OL, Allen ME, Moore EE, Zamrini EY, King DW. Effects of carbamazepine and phenytoin on EEG and memory in healthy adults. *Epilepsia* 1993; 34:153-7.

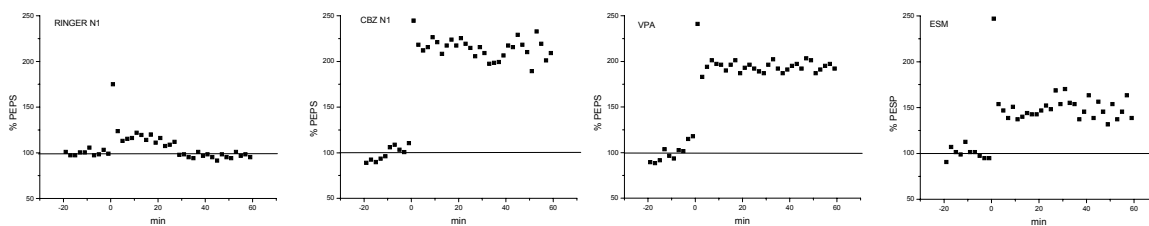
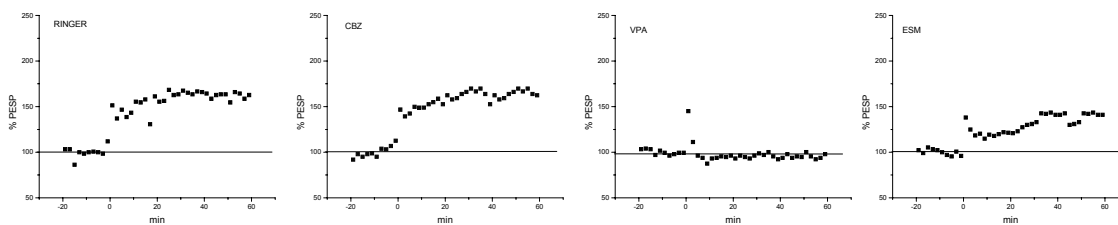
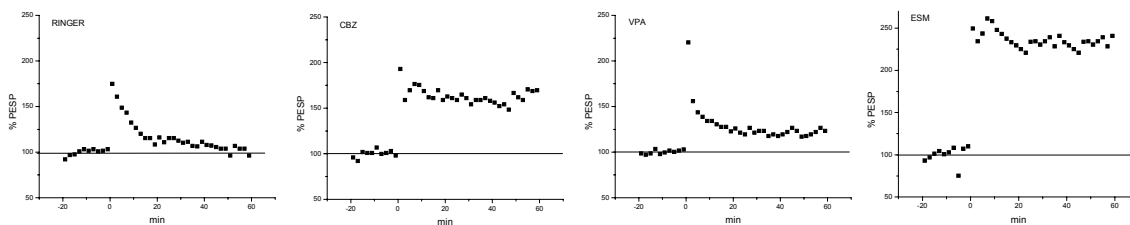
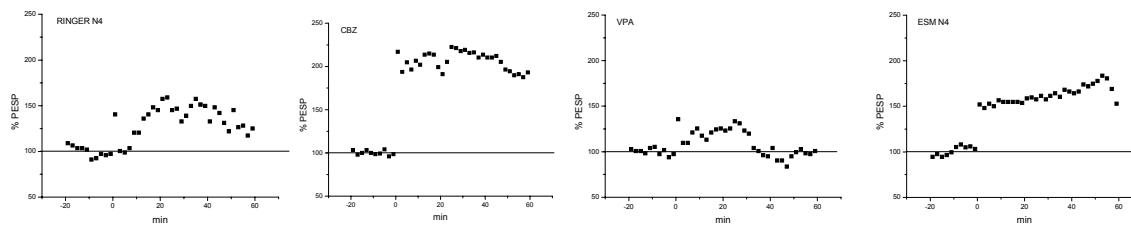
64. Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpina model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 1993; 34:985-95.
65. Mondadori C, Classen W. The effects of various antiepileptic drugs on E-shock-induced amnesia in mice: dissociability of effects on convulsions and effects on memory. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1984; 99:125-9.
66. Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by a N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 1986; 297:681-83.
67. Muller M. Morphological and functional consequences of chronic epilepsy in rat hippocampal slice cultures. *Europ J Physiol* 1993a; 422(4): 418-23.
68. Muller M, Gahwiller BH, Rietschin L, Thompson SM. Reversible loss of spines and altered excitability after chronic epilepsy in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci* 1993b; 90(1): 257-61.
69. Perucca E. Principles of drug treatment. In: Shorvon S, Dreifuss F, Fish D, Thomas D, editors. *The treatment of epilepsy.* Oxford: Blackwell Science; 1996. 152-68.
70. Pickamen A, Tunanen J, Partanen K, e cols. Amigdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1998; 32: 233-53.
71. Portuguese MW. Avaliação pré-cirúrgica do lobo temporal: linguagem e memória. In: Da costa JC, Palmini AL, Yacubian EMT, Cavalheiro E. *Fundamentos neurobiológicos das epilepsias – aspectos clínicos e cirúrgicos;* São Paulo: Lemos Editorial; 1998. p 939-56.
72. Prevey ML, Delaney RC, Cramer JA, Cattanach L, Collins JF, Mattson RH. Effect of valproate on cognitive functioning. Comparison with carbamazepine. The Department of Veterans Affairs Epilepsy Cooperative Study 264 Group. *Arch Neurol.* 1996; 53(10):1008-16.
73. Quigg M, Bertran EH, Jackson T. Longitudinal distribution of hippocampal atrophy in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1997; 27:101-10.
74. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1972; 32:281-92.
75. Rayevsky KS, Kharlamov AN. GABA-ergic drugs: effects on conditioning, memory and learning. *Pharmacol Res Commun.* 1983; 15(1):85-96.
76. Read CL, Stephe LJ, Stolarek IH, Paul A, Sills GJ, Brodie MJ. Cognitive effects of anticonvulsant monotherapy in elderly patients: placebo-controlled study. *Seizure* 1998; 7:159-62.
77. Rice AC, Floyd CL, Lyeth BG, Hamm RJ, DeLorenzo RJ. Status epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioral changes and cognitive deficits. *Epilepsia.* 1998; 39(11):1148-57.
78. Riva D, Devoti M. Carbamazepine withdrawal in children with previous symptomatic partial epilepsy: effects on neuropsychologic function. *J Child Neurol.* 1999; 14(6):357-62.
79. Roman F, Staubli U, Lynch G. Evidence for synaptic potentiation in a cortical network during learning. *Brain Res* 1987; 418:221-226.

80. Ronnberg J, Samuelsson S, Soderfeldt B. Memory effects following carbamazepine monotherapy in patients with complex partial epilepsy. *Seizure*. 1992; 1(4):247-53.
81. Ross EM, Peckham CS, West PB. Epilepsy in childhood: findings from the National Child Development Study. *Br Med J* 1980; 1:207-10.
82. Rostock A, Hoffmann W, Siegemund C, Bartsch R. Effects of carbamazepine, valproate calcium, clonazepam and piracetam on behavioral test methods for evaluation of memory-enhancing drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1989; 11(9):547-53.
83. Rutten A, van Albada M, Silveira DC, Cha BH, Liu X, Hu YN, Cilio MR, Holmes GL. Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects. *Eur J Neurosci*. 2002; 16(3):501-13.
84. Sanabria ERG, Cavalheiro EA. Epileptogênese: contribuição dos modelos experimentais. In: Guerreiro CAM, Guereiro MM, editores. *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editorial; 2000. p 29-57.
85. Sander JW, Hart YM. *Epilepsia: um guia prático*. Merrit Publishing International. 1999.
86. Sano M, Mitsis EM. Degenerative disease. In: Johnson RT, Griffin JW, McArthur JC. *Current therapy in neurologic disease*. 6^a ed. St. Louis: Mosby; 2002. p 308-12.
87. Sarihi A, Fathollahi Y, Motamedi F, Naghdi N, Rashidy-Pour A. Effects of lidocaine inactivation of the median raphe nucleus on long-term potentiation and recurrent inhibition in the dentate gyrus of rat hippocampus. *Brain Res* 2003; 159-68.
88. Seidenberg M, O'Leary DS, Berent A, Boll T. Changes in seizure frequency and test-retest scores on Wechsler adult intelligence scale. *Epilepsia* 1981; 22:75-83.
89. Sillanpaa M, Gram L, Johannessen SI, Tomson T. *Epilepsy and mental retardation*. Pertersfield: Wrightson Biomedica Publishing, 1999.
90. Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 1992; 257(5067):201-6
91. Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 1992; 257(5067):206-11.
92. Stella F. Memory disorders in epileptic patients. *Arq Neuropsiquiatr*. 1999; 57(2B):415-20.
93. Stevens JH, Schaffer JW, Brown CC. A controlled comparison of the effect of diphenylhydantoin and placebo on mood and psychomotor function in normal volunteers. *J Clin Pharmacol* 1974; 14:543-51.
94. Stores G, Williams PL, Styles E, Zaiwalla Z. Psychological effects of sodium valproate and carbamazepine in epilepsy. *Arch Dis Child*. 1992; 67(11): 1330-7.
95. Sudha S, Lakshmana MK, Pradhan N. Changes in learning and memory, acetylcholinesterase activity and monoamines in brain after chronic carbamazepine administration in rats. *Epilepsia*. 1995; 36(4):416-22.
96. Thompson PJ, Huppert F, Trimble MR. Anticonvulsant drugs, cognitive function and memory. *Acta Neurol Scand* 1980; 80:75-80.

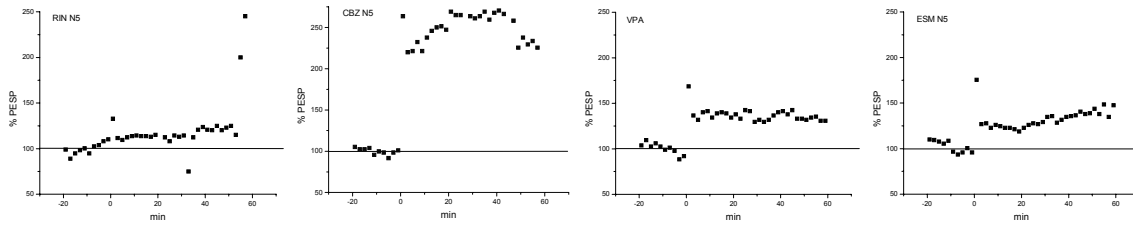
97. Thompson PJ, Trimble MR. Sodium valproate and cognitive functioning in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 12:819-24.
98. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983; 9: 315-35.
99. Vining EP, Mellitis ED, Dorsen MM, Cataldo MF, Quasney SA, Spilberg SP, Freeman JM. Psychologic and behavioral effects of antiepileptic drugs in children: a double-blind comparison between phenobarbital and valproic acid. *Pediatrics* 1987; 80:165-74.
100. Wu CL, Huang LT, Liou CW, Wang TJ, Tung YR, Hsu HY, Lai MC. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats result in long-term deficits in spatial learning and hippocampal cell loss. *Neurosci Lett*. 2001; 312(2):113-7.
101. Yamamoto C, McIlwain H. Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J Neurochem* 1966; 13:1333-43.
102. Zar JH. Two-factor analysis of variance. In: Zar JH, editor. *Bioestatistical analysis*. 4^a ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999. p 231-72.
103. Zhang MM, Xiao C, Yu K, Ruan DY. Effects of sodium valproate on synaptic plasticity in the CA1 region of rat hippocampus. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41(11):1617-1623.

ANEXO

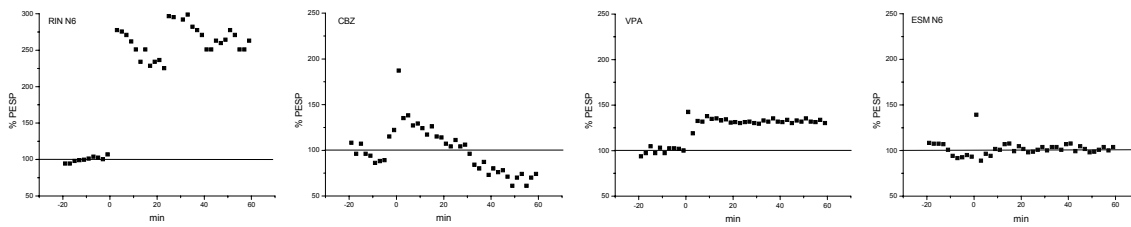
ANEXO

Gráficos dos Registros Eletrofisiológicos**Rato Controle n° 1****Rato Controle n° 2****Rato Controle n° 3****Rato Controle n° 4**

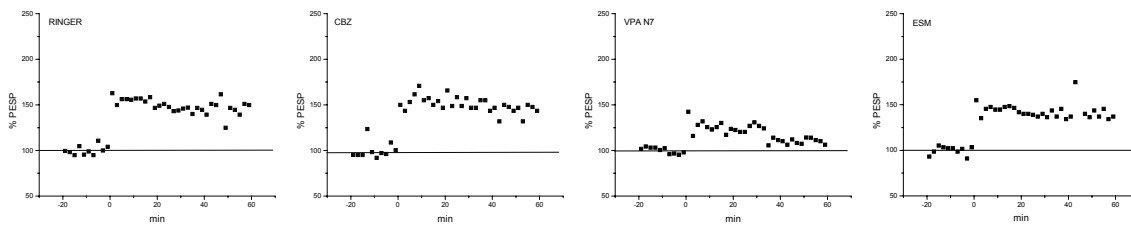
Rato Controle n° 5



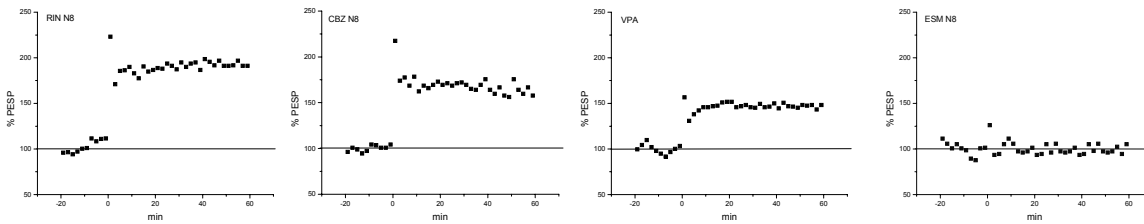
Rato Controle n° 6



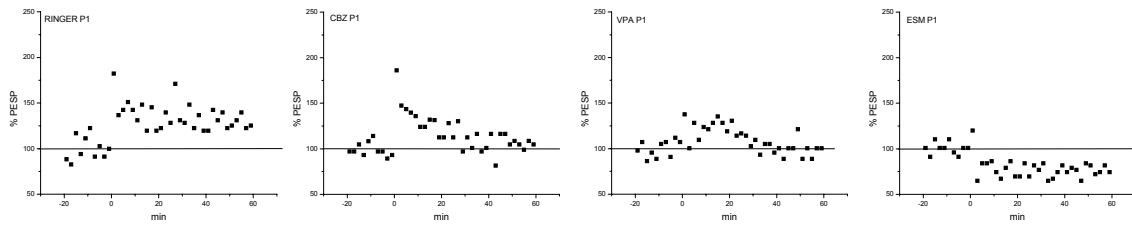
Rato Controle n° 7



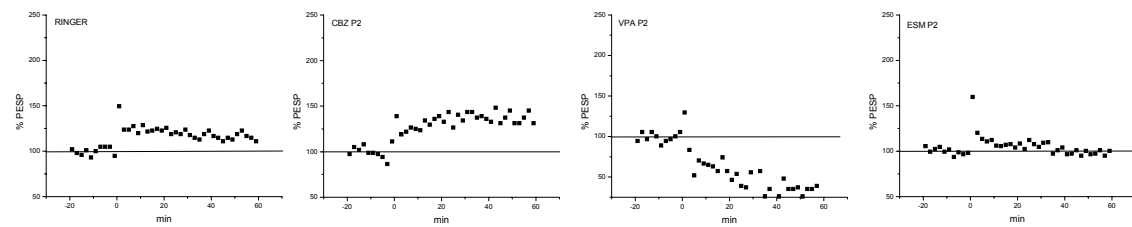
Rato Controle n° 8



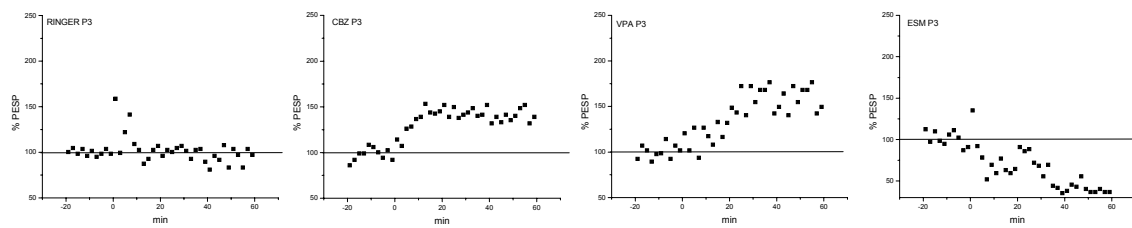
Rato Epilético nº 1



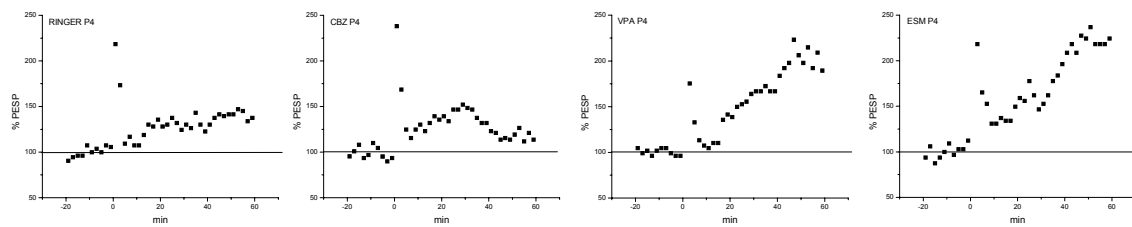
Rato Epilético nº 2



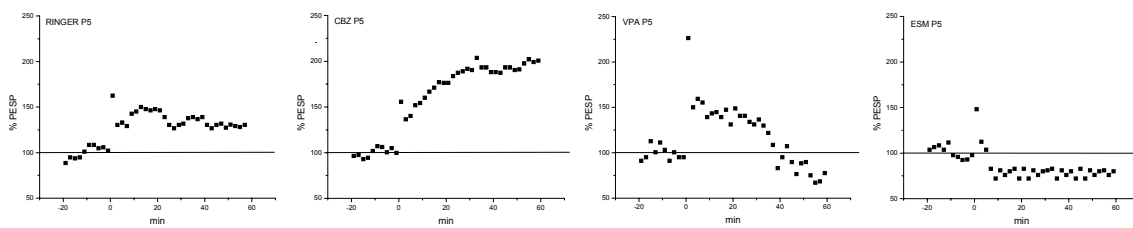
Rato Epilético nº 3



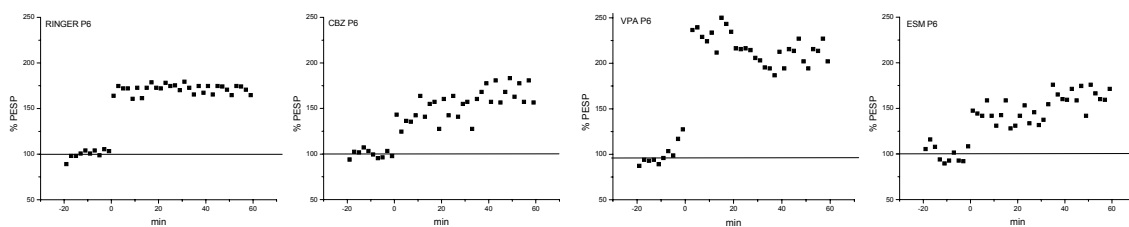
Rato Epilético nº 4



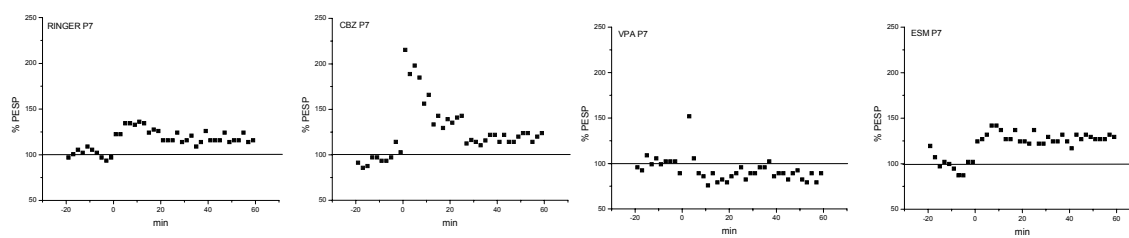
Rato Epiléptico nº 5



Rato Epiléptico nº 6



Rato Epiléptico nº 7



Rato Epiléptico nº 8

