



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

Bruna de Faria Dutra Andrade

CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E
NEUROPATOLÓGICA EM MODELO DE
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL POR INJEÇÃO
INTRACEREBRAL DE PILOCARPINA EM RATOS
WISTAR.

São José do Rio Preto
2017

Bruna de Faria Dutra Andrade

**Caracterização Comportamental e
Neuropatológica em Modelo de Epilepsia do
Lobo Temporal por Injeção Intracerebral de
Pilocarpina em Ratos *Wistar***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Orfa Yineth Galvis Alonso

São José do Rio Preto

2017

Andrade, Bruna de Faria Dutra

Caracterização Comportamental e Neuropatológica em Modelo de Epilepsia do Lobo Temporal por Aplicação Intracerebral de Pilocarpina em Ratos *Wistar*.

São José do Rio Preto, 2017.

122 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Orfa Yineth Galvis-Alonso

1. Status Epilepticus; 2. Pilocarpina; 3. Epilepsia do Lobo Temporal; 4. Amígdala; 5. Neurodegeneração.

Bruna de Faria Dutra Andrade

**Caracterização Comportamental e Neuropatológica em
Modelo de Epilepsia do Lobo Temporal por Injeção
Intracerebral de Pilocarpina em Ratos *Wistar***

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Orfa Yineth Galvis Alonso

2º Examinador: Prof. Dr. João Pereira Leite

3º Examinador: Prof. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

Suplentes: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury e

Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

São José do Rio Preto, 04/04/2017

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epilepsia do Lobo Temporal – Aspectos gerais.....	1
1.2 Manifestações Clínicas da ELT – Crises Epilépticas.....	2
1.3 Neuropatologia da ELT.....	5
1.4 Modelos Experimentais de ELT.....	6
1.5 A Amígdala.....	9
1.6 Objetivos.....	11
1.7 Hipótese.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Animais.....	13
2.2 Protocolo Experimental.....	14
2.3 Técnicas.....	16
2.3.1 Cirurgia estereotáxica.....	16
2.3.2 Indução do status epilepticus.....	18
2.3.3 Avaliação comportamental.....	20
2.3.4 Perfusão cerebral.....	22
2.3.5 Processamento dos cérebros.....	23
2.3.6 Histoquímica de Fluoro-Jade C.....	25
2.3.7. Histoquímica de Hematoxilina-Eosina (HE).....	26
2.3.8 Contagem neuronal.....	27
2.3.9 Análise estatística.....	33
3. RESULTADOS.....	34
3.1 <i>Status Epilepticus</i>	36
3.2 Crises Recorrentes Espontâneas.....	37
3.3 Lesão Neuronal de Estruturas Límbicas.....	40
3.3.1 Degeneração e Perda Neuronal Hipocampal.....	40

3.3.1.1 Grupo 24 horas.....	40
3.3.1.2 Grupo 30 dias	47
3.3.2 Degeneração e Perda Neuronal da Amígdala e Núcleo Dorsal Endopiriforme	54
3.3.2.1 Grupo 24 horas.....	54
3.3.2.2 Grupo 30 dias	58
3.3.3 Degeneração e Perda Neuronal dos córtices Perirrinal e Piriforme	64
3.3.3.1 Grupo 24 horas.....	64
3.3.3.2 Grupo 30 dias	69
3.3.4 Degeneração e Perda Neuronal do Tálamo e Hipotálamo	73
3.3.4.1 Grupo 24 horas.....	73
3.3.4.2 Grupo 30 dias	79
4. DISCUSSÃO.....	86
4.1 Modelos experimentais de indução de SE e avaliação comportamental aguda	86
4.2 Avaliação comportamental crônica.....	87
4.3 Lesão neuronal associada às crises agudas e crônicas	90
4.4 Hipocampo	93
4.5 Amígdala e DEn.....	96
4.6 Córtices Perirrinal e Piriforme	99
4.7 Tálamo e Hipotálamo.....	100
4.8 Considerações finais	105
5. CONCLUSÕES	107
6. REFERÊNCIAS	108
ANEXO I – Materiais utilizados nos experimentos.....	118
ANEXO II – Carta de Aprovação Comitê de Ética no Uso de Animais.....	122

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cynthia e Israel, anjos da minha vida, que me deram o dom de viver e uma criação abençoada, através da mais linda dádiva que um ser humano pode receber: o amor. E com amor, dedicarei esta e todas as minhas futuras conquistas à
vocês.

À minha irmã Glenda, companheira de vida e melhor amiga, que me permitiu experimentar um dos sentimentos mais doces, que é ter o amor de uma irmã.
Caminharemos e cresceremos juntas em todos os sentidos da vida.

A todos os pacientes portadores de epilepsia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, por me conceder as bênçãos e forças que me fizeram alcançar todas as minhas conquistas de vida, sobretudo esta. Gratidão pela oportunidade de me tornar Mestre.

À **Profa. Orfa Yineth**, por ter me iniciado na descoberta de uma nova vida, minha vida profissional, a vida acadêmica, de intensa responsabilidade e, ao mesmo tempo, fazendo dela um lugar repleto de amor, boas amizades e companheirismo. Gratidão por todos os ensinamentos, aprendizados, conselhos, paciência, risadas e muitos momentos que compartilhamos, não só como profissionais, mas como amigas. Sinto-me hoje mais preparada e amadurecida. Levarei sempre seu exemplo de profissional e pessoa maravilhosa, amiga e batalhadora, do laboratório para a vida.

Aos meus pais, **Cynthia e Israel** e minha irmã **Glenda**, que são a minha base, amores de minha vida! Eterna gratidão pelo amor incondicional, companheirismo, pela força e conselhos nos momentos difíceis, que me alimentaram a força de vontade e me fizeram seguir sempre em frente.

Ao meu amor, namorado e companheiro **Guilherme**, que como um anjo sempre me apoiou e me aconselhou em todos os momentos, bons e ruins. Gratidão por caminhar sempre comigo e torcer por minha felicidade e sucesso.

Aos meus amigos e colegas do **Laboratório de Fisiologia Experimental da FAMERP** - **Sandro Barbosa, Jéssica M Garcia, Alexandre D Gimenes, Ariane N. Queiroz, Milena Ricci, Ana Clara C. Giraldi, Érica Ichiba, Ana Paula Betaressi, Luiz H. Maniero, Larissa Gandolphi, Nayene Pacheco, Fernanda de Mira Cabello, Pedro Scaranello e Caroline Carvalho Riccardi**, por toda colaboração na execução dos experimentos, nas análises e na avaliação comportamental dos animais, e por toda a amizade e companheirismo, que ultrapassaram as barreiras profissionais. Com vocês o caminho se tornou muito mais fácil, vi o quanto é maravilhoso compartilhar de nossos conhecimentos trabalhando em equipe e o quão importante para o nosso crescimento é trabalhar com pessoas boas e amigas.

À agência de fomento **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)**, pelo período de bolsa de estudos concedido durante o mestrado.

Ao **Biotério da FAMERP** pela disponibilização dos ratos, e aos Senhores **Luiz Bizuti** e **Julio da Silva** pelo cuidado com os animais.

Ao **Laboratório de Histotecnologia – FAMERP** e aos senhores **Domingos Zanchetta Neto** e **Zanclayr Alves Santana**, pela disponibilização do micrótomo e meios de processamento histológico.

Ao **Laboratório Multiusuário – FAMERP** e as senhoras **Larissa Calfat, Nayara Morotti** e **Andrea Santos**, pela disponibilização do micrótomo e do sistema de

aquisição de imagens e microscopia de fluorescência.

À **Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury**, gratidão por ter prestado auxílio tão importante para meu ingresso no Mestrado, pela participação, confiança e atenção ao nosso projeto.

Ao **Prof. Dr. Jorge Mejia Cabeza**, pela colaboração e desenvolvimento do software para análise comportamental.

Aos membros da Secretaria de Pós Graduação em Ciências da Saúde, senhores **Luis Henrique Oliveira Ferreira** e **José Antonio Silistino**, pelo suporte e todo auxílio prestado durante o Mestrado.

A todos os animais utilizados em experimentação, especialmente os que pertenceram a minha pesquisa de Mestrado, minha eterna gratidão e respeito por sua imensa contribuição para com a ciência e estudo das doenças. - *“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.” Charles Darwin.*

“A persistência é o caminho do êxito.”

– Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Linha temporal dos procedimentos experimentais.	15
Figura 2	- Grupos experimentais. Dos 17 animais com cânulas na amígdala do grupo 30 dias, dois foram a óbito, após a anestesia cirúrgica e durante o SE. (*) A análise comportamental crônica foi realizada em 7 animais do grupo SE. As abreviações indicam: SE (Status Epiléptico) e Ctrl (Controle).	16
Figura 3	- Rato fixado no estereotáxico durante cirurgia para implante de cânula intracerebral, na amígdala.	18
Figura 4	- Sistema utilizado para indução de <i>Status Epiléptico</i> (SE).	20
Figura 5	- A e B) Sistema de monitoramento por vídeo das CRE; C) Ratos <i>Wistar</i> utilizados no experimento.	22
Figura 6	- Cérebros após perfusão e processamento em PFA 4%.	23
Figura 7	- Imagens representativas da orientação de corte – coronal - das secções cerebrais cortadas em micrótomo para confecção das lâminas para análise neuropatológica	24
Figura 8	- Imagem de secção panorâmica do hipocampo de um rato corada por FJC, destacando a região do Corno de Amon 4 (CA4), mostrando neurônios em processo de degeneração em fluorescência	26
Figura 9	- Imagem de secção panorâmica do hipocampo de um rato corada por HE, destacando a região do Corno de Amon 4 (CA4), mostrando neurônios em normais remanescentes.	27
Figura 10	- Imagem coronal do cérebro do rato, representativa das regiões cerebrais do nível anterior do tálamo e hipotálamo, amígdala e córtices perirrinal e piriforme, analisadas quantitativamente.	30
Figura 11	- Imagem coronal do cérebro do rato, representativa das regiões cerebrais do nível posterior do tálamo e hipotálamo, amígdala e córtices perirrinal e piriforme, e nível anterior do hipocampo, analisadas quantitativamente.	31
Figura 12	- Imagem coronal do cérebro do rato, representativa das regiões cerebrais do nível posterior do hipocampo, dividido em porções dorsal e ventral, analisadas quantitativamente.	32
Figura 13	- Curva de peso dos grupos controle e SE durante o experimento.	36
Figura 14	- A) Regressão linear entre a duração do SE generalizado total (antes e após o DZP) e o número total de CRE registradas entre os dias 8 e 30 após o SE (n=7). B) Gráfico da evolução do número de CRE parciais e generalizadas ao longo dos 22 dias (n = 7). C) Número total de CRE (parciais e generalizadas), no período do dia (7h às 18h) e da noite (19h às 6h) detectadas entre os dias 8 e 30 após o SE.	39
Figura 15	- Regressão linear mostrando correlação positiva entre a duração do SE total (em	42

- minutos) e número de neurônios em degeneração de CA1 do hipocampo nos animais do grupo 24 horas.
- Figura 16** - Secções coradas por FJC representativas das regiões de CA1 e hilo, do hipocampo, mostrando as diferenças entre a degeneração neuronal entre os níveis anterior e posterior/ dorsal e ventral. 43
- Figura 17** - Contagem de neurônios normais remanescentes do hipocampo dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 24 horas após a injeção de pilocarpina ou solução salina. 44
- Figura 18** - Secções coradas por HE do hipocampo de animais do grupo 24 horas, comparando-se Ctrl (à esquerda) e SE (à direita). 45
- Figura 19** - Regressão linear mostrando correlação negativa entre a duração do SE (total e parcial total, antes e após o DZP) e o número de neurônios normais nas regiões em CA1 dorsal posterior direito (Pearson, $R = -0,472$ e $p = 0,04$), CA1 ventral posterior direito (Pearson, $R = -0,447$ e $p = 0,04$), CA3 ventral posterior direito (Pearson, $R = -0,629$ e $p = 0,01$) e CA3 ventral posterior esquerdo (Pearson, $R = -0,559$ e $p = 0,02$). 46
- Figura 20** - Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal do hipocampo de um rato do grupo 30 dias que apresentou alta frequência de CRE, mostrando as regiões de CA1 do hipocampo anterior e posterior (dorsal e ventral) e a degeneração das células granulares do giro denteado do hipocampo anterior e posterior. 49
- Figura 21** - Contagem de neurônios normais remanescentes hipocampo dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 30 dias após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). 50
- Figura 22** - Secções coradas por HE representativas do hipocampo do grupo 30 dias, mostrando a perda neuronal comparando-se do grupo SE com relação ao Ctrl (*Teste t student*, $p < 0,05$). 51
- Figura 23** - Regressão linear mostrando correlação positiva entre o número de CRE parciais e totais e a degeneração neuronal de CA1 anterior direito (Pearson, $R = 0,599$ e $p = 0,04$), CA1 anterior esquerdo (Pearson, $R = 0,573$ e $p = 0,04$), CA1 ventral posterior direito (Pearson, $R = 0,66$ e $p = 0,02$) e CA1 ventral posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,577$ e $p = 0,047$) e o número de CRE totais (parciais + generalizadas) 52
- Figura 24** - Regressão linear mostrando correlação negativa entre o número de neurônios normais e a duração do SE generalizado do hilo anterior direito (Pearson, $R = -0,512$ e $p < 0,001$) e do SE parcial total (crises parciais antes e após o DZP) com CA1 ventral posterior esquerdo (Pearson, $R = -0,498$ e $p = 0,0381$) nos animais do grupo 30 dias 53
- Figura 25** - Regressão linear mostrando correlação negativa entre o número de neurônios normais do hipocampo e o número de CRE totais em CA1 anterior esquerdo 53

- (Pearson, $R = -0,906$ e $p = 0,009$), CA1 dorsal posterior esquerdo (Pearson, $R = -0,659$ e $p = 0,04$), CA1 ventral posterior direito (Pearson, $R = -0,488$ e $p = 0,009$) e Hilo ventral posterior esquerdo (Pearson, $R = -0,653$ e $p = 0,03$).
- Figura 26** - Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal dos núcleos da amígdala e núcleo dorsal endopiriforme. 55
- Figura 27** - Contagem de neurônios normais remanescentes dos núcleos da amígdala dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 24 horas após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). 56
- Figura 28** - Secções coradas por HE dos núcleos da amígdala de animais do grupo 24 horas, comparando-se SE e Ctrl. 57
- Figura 29** - Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal dos núcleos da amígdala e núcleo endopiriforme dorsal de um rato que apresentou alta frequência de CRE, do grupo 30 dias. 60
- Figura 30** - Contagem de neurônios normais remanescentes dos núcleos da amígdala dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 30 dias após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). 61
- Figura 31** - Secções coradas por HE representativas dos núcleos da amígdala e núcleo endopiriforme dorsal de animais do grupo 30 dias, comparando-se Ctrl e SE. 62
- Figura 32** - Regressão linear mostrando correlação negativa entre o número de neurônios normais de LaVM posterior esquerdo e o número de CRE parciais e generalizadas (Pearson, $R = -0,479$ e $p = 0,04$ e $R = -0,599$ e $p = 0,04$, respectivamente) e o número de neurônios normais de BLP posterior direita e DEn anterior esquerdo com o número de CRE totais (Pearson, $R = -0,753$ e $p = 0,02$ e $R = -0,579$ e $p = 0,04$, respectivamente). 63
- Figura 33** - Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal dos córtices perirrinal e piriforme do grupo 24 horas. 66
- Figura 34** - Contagem de neurônios normais remanescentes dos córtices perirrinal e piriforme dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 24 horas após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). 67
- Figura 35** - Secções coradas por HE representativas dos córtices perirrinal e piriforme de animais do grupo 24 horas, comparando-se Ctrl e SE. A densidade neuronal do córtex perirrinal dorsal foi similar entre o grupo Ctrl e SE. 68
- Figura 36** - Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal dos córtices perirrinal e piriforme do grupo 30 dias. 71
- Figura 37** - Contagem de neurônios normais remanescentes dos córtices perirrinal e piriforme dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 30 dias após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). 72
- Figura 38** - Secções coradas por HE representativas dos córtices perirrinal e piriforme de 73

- animais do grupo 30, comparando-se Ctrl e SE.
- Figura 39** - Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal do tálamo do grupo 24 horas. 75
- Figura 40** - Regressão linear mostrando correlação positiva entre a duração do SE total (todas as crises antes e após DZP) e SE parcial (todas as crises parciais antes do DZP) com o número de neurônios em degeneração em VM anterior direito (Pearson, $R = 0,576$ e $p = 0,02$), VM anterior esquerdo (Pearson, $R = 0,461$ e $p = 0,04$) e VPPC posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,494$ e $p = 0,03$). 76
- Figura 41** - Contagem de neurônios normais remanescentes dos núcleos do tálamo e hipotálamo dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 24 horas após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). 77
- Figura 42** - Secções coradas por HE representativas dos núcleos do tálamo de animais do grupo 24 horas, comparando-se Ctrl e SE. 78
- Figura 43** - Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal do tálamo de um rato com alta frequência de CRE com forte marcação FJC. As setas indicam neurônios em degeneração. 81
- Figura 44** - Regressão linear mostrando correlação positiva entre a duração do SE generalizado total (antes e após o DZP) e número de neurônios em degeneração de VM anterior direito (Pearson, $R = 0,611$ e $p = 0,01$) nos animais do grupo 30 dias e correlação positiva entre o número de CRE totais e a degeneração neuronal dos núcleos laterais do tálamo em LPLR posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,913$ e $p = 0,0006$); LPMR posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,910$ e $p = 0,0008$); LDVL anterior esquerdo (Pearson, $R = 0,759$ e $p = 0,01$). 82
- Figura 45** - Contagem de neurônios normais remanescentes dos núcleos do tálamo e hipotálamo dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 30 dias após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). 83
- Figura 46** - Secções coradas por HE representativas dos núcleos do tálamo de animais do grupo 30 dias, comparando-se Ctrl e SE. 84
- Figura 47** - Regressão linear mostrando correlação negativa entre a duração do SE generalizado e o número de neurônios normais em PVP anterior esquerdo (Pearson, $R = - 0,488$ e $p = 0,03$) e VM anterior direito (Pearson, $R = - 0,659$ e $p = 0,008$) nos animais do grupo 30 dias e correlação negativa entre o número de CRE parciais e o número de neurônios normais em PVP anterior direito (Pearson, $R = - 0,587$ e $p = 0,04$) e número de CRE totais e o número de neurônios normais em PVP anterior esquerdo (Pearson, $R = - 0,575$ e $p = 0,04$)... 85

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

BLA	- Núcleo amigdalóide basolateral anterior
BLP	- Núcleo amigdalóide basolateral posterior
BMP	- Núcleo amigdalóide basomedial posterior
CA1	- Corno de Amon 1
CA2	- Corno de Amon 2
CA3	- Corno de Amon 3
CA4	- Corno de Amon 4
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CRE	- Crises recorrentes espontâneas
Ctrl	- Controle
DEn	- Núcleo dorsal endopiriforme
DZP	- Diazepam
ELT	- Epilepsia do lobo temporal
ELTM	- Epilepsia do lobo temporal mesial
FJC	- Fluoro jade C
HE	- Hematoxilina-eosina
H-PILO	- Aplicação intrahipocampal de pilocarpina
i.m	- Intramuscular
i.p	- Intraperitoneal
LaVM	- Núcleo amigdalóide lateral ventromedial
LDDM	- Núcleo talâmico laterodorsal dorsomedial
LDVL	- Núcleo talâmico laterodorsal ventrolateral
LPI	- Lesão precipitante inicial
LPLR	- Núcleo talâmico laterodorsal posterior
LPMR	- Núcleo talâmico mediorostral posterior
MDM	- Núcleo talâmico mediodorsal medial
MePV	- Núcleo amigdalóide medial posterodorsal
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PFA	- Paraformaldeído

PMCo	- Núcleo amígdaloide póstero-medial cortical
PMV	- Núcleo premamilar ventral do hipotálamo
Po	- Grupo nuclear talâmico posterior
pós-SE	- Pós <i>status epilepticus</i>
PVC	- Policloreto de vinila
PVP	- Núcleo talâmico paraventricular posterior
s.c	- Subcutâneo
SE	- <i>Status epilepticus</i>
SNC	- Sistema nervoso central
S-PILO	- Aplicação sistêmica de pilocarpina
TCE	- Trauma crânio encefálico
VM	- Núcleo talâmico ventromedial
VPPC	- Núcleo talâmico ventral parvicelular posterior

RESUMO

Introdução: Epilepsia do lobo temporal (ELT), a epilepsia focal mais frequente entre adultos, caracteriza-se por apresentar perda neuronal em estruturas límbicas como hipocampo e amígdala. Estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que a aplicação de pilocarpina na amígdala de ratos induz *Status Epilepticus* (SE). Contudo, ainda não há dados disponíveis sobre as características comportamentais do SE induzido por aplicação intra-amigdalar de pilocarpina, nem sobre o efeito desse SE no comportamento e na morfologia de estruturas límbicas. Estudos utilizando modelos de aplicação de ácido cáinico ou de estimulação elétrica na amígdala sugerem que esta estrutura, além de ser suscetível a gerar crises epiléticas, pode estar envolvida no desenvolvimento da doença crônica. **Objetivo:** Caracterizar alterações comportamentais e neuropatológicas, agudas e crônicas, que ocorrem após a indução de SE por aplicação de pilocarpina na amígdala de ratos *Wistar* adultos. **Material e Métodos:** Foram utilizados ratos *Wistar* adultos e machos (N total = 32). Foi implantada uma cânula na amígdala direita de todos os animais e, após uma semana, foi aplicada pilocarpina para indução do SE (0,9 mg/uL, Grupo SE, N= 18) ou solução salina 0,9% (1 ul, Grupo Ctrl, N = 14) na amígdala. O SE foi tratado 4 horas após seu início com diazepam (10mg/kg, i.p). A seguir, os animais foram distribuídos ao acaso em dois grupos caracterizados de acordo com o tempo de estudo, após o início do SE e a eutanásia: 24h e 30 dias. O comportamento de todos os animais foi registrado por vídeo a partir das injeções na amígdala até 24 horas (grupo 24h), 30 dias (grupo 30 dias) após o SE e, após cada período, os cérebros foram perfundidos, processados em parafina e cortados em secções coradas por hematoxilina-eosina (HE) e fluoro-jade C (FJC) para contagem de

neurônios normais e em degeneração, respectivamente. **Resultados:** 1) A injeção de pilocarpina no complexo amigdalopiriforme de ratos *Wistar* induziu SE em 100% dos animais de ambos os grupos, sendo que, ao total, 83,3% apresentaram SE com crises predominantemente generalizadas ($Racine \geq 3$); 2) 100% dos animais do grupo crônico apresentaram Crises recorrentes espontâneas (CRE), predominantemente parciais, que sofreram picos de aumento em até 30 dias; 3) O número de CRE generalizadas foi dependente da gravidade e duração do SE, ocorrendo com muita frequência em quatro dos sete animais avaliados; 4) O número de CRE parciais e generalizadas definiu o grau de lesão neuronal de maneira geral. 5) Foi encontrada lesão neuronal – incluindo degeneração e perda neuronal – no hipocampo (regiões do Corno de Amon 1, 3 e 4 - CA1, CA3, CA4), hilo e células granulares do giro dentado – este último apenas no grupo 30 dias), núcleos da amígdala (laterais mediais e mediais corticais, predominantemente – LaVM, MePV e PMCo), núcleo endopiriforme dorsal (DEn), núcleos do tálamo (predominantemente núcleos mediais, paraventriculares e parvicellulares – PVP, MDM, VM e VPPC) e hipotálamo (apenas posterior, núcleo ventral pré-mamilar – PMV) e córtices perirrinal (porções dorsais e ventrais) e piriforme (porções laterais e mediais). **Conclusão** - A injeção de pilocarpina no complexo amigdalopiriforme em ratos *Wistar* induz SE, epilepsia e lesão neuropatológica de estruturas límbicas, similares à ELT humana.

Palavras-chave: *Status Epilepticus*; Pilocarpina; Epilepsia do Lobo Temporal; Amígdala; Neurodegeneração.

ABSTRACT

Introduction: Temporal Lobe Epilepsy (TLE), the most frequent focal epilepsy among adults, is characterized by neuronal loss in limbic structures such as the hippocampus and amygdala. Electrophysiological studies have shown that the application of pilocarpine in amygdala of rats induces Status Epilepticus (SE). However, there is no data yet available on the behavioral characteristics of SE induced by intra-amygdalar application of pilocarpine as well as on the effect of this SE on the behavior and morphology of limbic structures. Studies using models of application of kainic acid or electrical stimulation in the amygdala suggest that this structure, besides being susceptible to epileptic seizures, may be involved in the development of chronic disease. **Objective:** To characterize the acute and chronic behavioral and neuropathological alterations occurring after SE induction by the application of pilocarpine in the amygdala of adult Wistar rats. **Material and Methods:** Adult and male Wistar rats (total N = 32) were used. A cannula was implanted in the right amygdala of the animals and after one week pilocarpine was applied for SE induction (0,9 mg/uL, SE group, N= 18) or saline solution (1 ul, Ctrl group, N = 14) in the amygdala. Rats were treated 4 hours after SE-onset with diazepam (10mg / kg, i.p). Afterwards, the animals were randomly assigned to two groups characterized according to the time of study after SE onset and euthanasia: 24h and 30 days. The behavior of all animals was recorded by video since the intra-amygdala injections up to 24 hours (group 24h) and 30 days (group 30 days). At the end, brains were paraffin-processed, sectioned and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Fluoro-Jade C (FJC) for counting of normal and degenerating neurons, respectively. **Results:** 1) Injection of pilocarpine into the amygdalo-piriform region of Wistar rats induced SE in 100%;

83.3% of the animals had SE with predominantly generalized seizures (Racine \geq 3); 2) 100% of the animals in the chronic group displayed predominantly partial Spontaneous Recurrent Seizures (SRS); 3) The number of generalized SRSs was dependent on the severity and duration of SRS, occurring very frequently in four of the seven animals evaluated; 4) The number of partial and generalized SRSs defined the degree of neuronal lesion in general. 5) Neuronal lesion - including degeneration and neuronal loss - was found in the amygdala nuclei (cortical and medial lateral, predominantly - LaVM, MePV and PMCo), dorsal endopriform nuclei (Den), thalamus nuclei (predominantly medial, paraventricular and parvicellular nuclei - PVP, MDM, VM and VPPC) and hypothalamus (posterior only, pre-mammillary ventral nucleus - PMV) and peririnal (lateral and medial portions) and piriform cortices (lateral and medial portions). **Conclusion** - Injection of pilocarpine into the amygdala of Wistar rats induces SE, epilepsy and neuropathological injury of limbic structures, similar to human ELT.

Keywords: Status Epilepticus; Pilocarpine; Temporal Lobe Epilepsy; Amygdala; Neurodegeneration.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia do Lobo Temporal – Aspectos gerais

A epilepsia consiste em um distúrbio de ordem neuronal caracterizado pela predisposição do cérebro em gerar crises epiléticas espontâneas e recorrentes, podendo ser convulsivas ou não.⁽¹⁾ Isto ocorre devido a alteração na atividade elétrica cerebral que é gerada por uma hipsincronização e hiperexcitabilidade neuronal.⁽²⁾

Atualmente, a epilepsia pode ser considerada um problema de saúde pública, em função das consequências sócio-econômicas, psicológicas e orgânicas geradas, que são prejudiciais à qualidade de vida do paciente.^(3,4) Mundialmente, estima-se que 1% a 2% da população tenha epilepsia, afetando, atualmente, cerca de 50 milhões de pessoas.^(5,6) Destes pacientes, até 90% vivem em países em desenvolvimento.^(7,8) Nos Estados Unidos, a epilepsia é correspondente ao terceiro distúrbio neurológico mais comum (*Comorbidity in adults with epilepsy--United States, 2010, 2013*).⁽⁹⁾ Dentre a população brasileira, cerca de 1 milhão de pessoas apresenta epilepsia, sendo que, entre elas, 380 mil não são tratados adequadamente.⁽¹⁰⁾

Dados estatísticos demonstram que, no Brasil, no período de agosto de 2015 a agosto de 2016 foram registradas 55.638 internações por epilepsia, com o valor total gasto de 43 milhões de reais. Adicionalmente, foram registrados 1.365 óbitos, com uma taxa de mortalidade de 2,37% neste período.⁽¹¹⁾

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia em adultos, de conhecida resistência ao tratamento farmacológico e caracterizada por perda neuronal hipocampal e comprometimento cognitivo progressivos.⁽¹²⁾ A maioria dos

casos de ELT, aproximadamente 60%, correspondem à epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM), de elevada prevalência e proporção de pacientes com crises epiléticas refratárias ao tratamento medicamentoso – cerca 30% dos casos.^(13,14)

Pacientes que sofrem de epilepsia são mais propensos a apresentar transtornos cognitivos, comportamentais ou psicossociais.⁽¹⁵⁾ É conhecida, desde a antiguidade, a associação entre epilepsia e transtornos psiquiátricos,⁽¹⁶⁾ sendo comum relacioná-la à fenômenos sobrenaturais, como bruxas, deuses, e até mesmo demônios. A isto se deve o grande estigma que os pacientes portadores desta doença sofrem. Dentre as comorbidades psiquiátricas prevalentes associadas à ELT, estão a depressão e ansiedade.⁽¹⁷⁾

Os mecanismos que envolvem a gênese e progressão da ELTM parecem ser de origem multifatorial, relacionados aspectos genéticos, distúrbios metabólicos, vasculares, doenças infecciosas, fatores tóxicos ou traumas, embora não sejam ainda bem elucidados.^(13,18)

1.2 Manifestações Clínicas da ELT – Crises Epiléticas

Crises epiléticas são manifestações apresentadas por pacientes portadores de epilepsia, que consistem em descargas hipsincrônicas anormais de uma conjunto de neurônios cerebrais, podendo ser convulsivas ou não-convulsivas. O diagnóstico da epilepsia é definido eletroclínicamente, ou seja, a partir da caracterização do tipo de crise epilética por avaliação clínica e dos padrões anormais de eletroencefalograma (EEG), indicando a presença de ondas de padrão epileptiforme.⁽¹⁹⁾

A Comissão para a Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra a

Epilepsia (*The International League Against Epilepsy* - ILAE), propôs duas classificações conceituais sobre epilepsia e crises epiléticas. Embora haja uma mais atual e realizada em decorrência de estudos mais modernos em epilepsia, a classificação e terminologia originais (ILAE, 1981) são mais aceitas e utilizadas na prática clínica e baseiam-se nas manifestações clínicas e eletroencefalográficas das crises.⁽²⁰⁾

Segundo a classificação de ILAE (1981), com relação às manifestações clínicas, as crises epiléticas podem ser classificadas em: a) Parciais – quando a origem da descarga ictal se dá em áreas corticais localizadas (focos epiléticos), em apenas um grupo de neurônios do cérebro; b) Generalizadas – quando se originam em ambos os hemisférios, se propagando no cérebro como um todo.^(21,22)

As crises parciais podem ser classificadas em: simples, quando a consciência é preservada; complexas, quando há perda da consciência; e secundariamente generalizadas, quando as crises iniciam-se de maneira focal e posteriormente difundem-se para outras partes do encéfalo. As crises generalizadas, por sua vez, dividem-se em: tônico-clônicas, tônicas, mioclônicas, atônicas e de ausência, envolvendo geralmente episódios de queda com enrijecimento com clônia muscular, exceto as crises de ausência, em que ocorre a interrupção de qualquer ação do indivíduo por poucos segundos com perda da consciência, mais comum na infância.^(19,23)

Geralmente, os pacientes apresentam sintomas ictais, que ocorrem pouco antes do início de uma crise, em sua maioria bem variáveis. Estas sensações são caracterizadas pela presença de aura, que consiste geralmente em sensações epigástricas, “déjà vu” (forma de ilusão da memória que leva o indivíduo a crer já ter visto ou vivido alguma coisa ou situação de fato desconhecida ou nova para si), “jamais vu” (oposto de déjà vu, quando há sensação de que algo familiar é totalmente

desconhecido), alterações afetivas e fenômenos experimentais e psíquicos, podendo ser seguidos de olhar fixo não responsivo e movimentos motores estereotipados.^(14,24) Estas auras, em geral, possuem duração de poucos minutos e estão presentes em 20 a 90% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal.⁽²⁵⁾ As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes são muito variáveis, visto que a hiperexcitabilidade neuronal envolve diferentes regiões cerebrais.

O *status epilepticus* (SE, ou Estado de Mal Epiléptico) é uma condição de emergência clínica caracterizada pela ocorrência de uma ou mais crises convulsivas durante um período maior que cinco minutos. Geralmente, o episódio de SE é inicialmente tratado com benzodiazepínicos, como o diazepam.⁽²⁶⁾ Se não tratado a tempo, está associado ao surgimento de lesões neuronais e cognitivas graves, permanentes e muitas vezes irreversíveis.⁽¹²⁾

A ocorrência de episódios de SE pode desencadear futuramente a epilepsia crônica em humanos e, por isso, designa-se como uma Lesão Precipitante Inicial (LPI) para o desenvolvimento da doença. As crises epilépticas surgem, em geral, na infância tardia ou na adolescência. Geralmente história prévia de convulsão febril na infância, hipóxia, trauma crânio-encefálico, infecções do SNC e episódios de SE podem ser considerados como LPI para o desenvolvimento da epilepsia.^(27,28,29) O período de latência entre a ocorrência da LPI e o desencadeamento da epilepsia crônica é variável e muitas vezes pode levar de meses a anos. Neste período, geralmente ocorrem eventos de plasticidade neuronal (alterações que envolvem circuitos sinápticos, neuronais e neurotransmissores), de origem e mecanismos pouco conhecidos, denominados epileptogênese.

1.3 Neuropatologia da ELT

Com relação à neuropatologia, a ELT geralmente é associada à esclerose hipocampal, achado encontrado em 50-70% dos pacientes, que caracteriza-se pela morte neuronal variável de estruturas do hipocampo, especialmente das células piramidais do setor de *Sommer* (CA1, CA3, e o hilo). Estes achados contribuem para a atrofia hipocampal, muitas vezes associados a padrões anormais de EEG. As células granulares do giro denteado e células piramidais de CA2 geralmente são menos afetadas. Adicionalmente, observa-se reorganização sináptica e axonal, caracterizada com brotamentos de terminações axônicas das células granulares (as fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado.^(13,30) Estas alterações são eventos de plasticidade neuronal, e estão relacionadas à geração e perpetuação das crises epiléticas. Esta hipótese surgiu a partir da ideia de que novas aferências axônicas de fibras musgosas reinervariam sítios sinápticos vazios em decorrência da morte celular, o que geraria um circuito monossináptico de caráter excitatório entre as células granulares.^(31,32)

No entanto, a ELT não está restrita ao hipocampo, podendo englobar uma rede de estruturas límbicas.⁽³³⁾ A amígdala, o tálamo, os córtices perirrinal e piriforme fazem parte da rede neuronal que engloba o sistema límbico, comumente associado às emoções. Estudos em modelos de ELT em ratos têm demonstrado que estas regiões podem ser fortemente afetadas, além do hipocampo.

Os mecanismos exatos do processo de morte neuronal a partir de uma crise epilética ainda não foram completamente esclarecidos, mas acredita-se que a liberação de substâncias excitotóxicas - como o glutamato - em grande quantidade na fenda sináptica estaria relacionada ao aumento da hiperexcitabilidade neuronal com

consequente morte celular.⁽³⁴⁾

1.4 Modelos Experimentais de ELT

Estudos sobre a epilepsia visam poder reproduzir em animais as principais características encontradas nos pacientes com ELT, com o objetivo de proporcionar conhecimento sobre fisiopatologia da doença. Estudar o desenvolvimento e curso de uma doença em um modelo é uma forma de entender como ela se manifesta nos seres humanos, e isto contribui para o desenvolvimento de métodos e estudos que visam a melhora da qualidade de vida dos pacientes – incluindo o desenvolvimento de novos fármacos. No caso da ELT, este conceito se fortalece ainda mais no sentido de definir os mecanismos responsáveis por sua gênese e progressão, que ainda não são totalmente compreendidos. Além disso, o modelo pode demonstrar com uma visão mais ampla fenômenos de plasticidade neuronal decorrentes da lesão em questão. As principais características investigadas nos modelos experimentais de ELT são os focos epiléticos no sistema límbico, a esclerose hipocampal, o período latente para o desencadeamento de crises espontâneas, a LPI, dentre outros.⁽³⁵⁾

Várias espécies e gêneros de animais, incluindo roedores (rato, camundongo, cobaia, gerbilo), insetos (gênero *drosófila*), primatas (gênero *Papio*, *macaca*, *saguís*), aves (gênero *Gallus*), dentre outros, já foram empregados em estudos para modelar epilepsia.⁽³⁶⁾ No entanto, os camundongos e ratos são mais utilizados pelo baixo custo, fácil manuseio e facilidade para se criar em laboratório, além do conhecimento neuroanatômico e comportamental já adquirido nessas espécies. Os modelos experimentais de epilepsia podem ser realizados tanto *in vivo*, quando o animal é submetido a um protocolo de indução de crises por agente químico, físico (criogenia) ou

elétrico, e mantido vivo para acompanhamento do curso e desenvolvimento da doença crônica, ou *in vitro*, quando se empregam fatias de tecido, cultura de células ou células dispersas para estudar substâncias ou procedimentos convulsivantes.⁽³⁷⁾

No caso dos modelos experimentais *in vivo*, mais comumente utilizados, o SE é induzido e correspondente à LPI a fim de reproduzir algumas das características histopatológicas e comportamentais observadas na ELT humana, incluindo a ocorrência de crises recorrentes e espontâneas (CRE). Os modelos de SE podem ser induzidos por injeção sistêmica ou intracerebral de substâncias geradoras de crises como, por exemplo, a pilocarpina e o ácido caínico ou por estimulação elétrica prolongada de estruturas límbicas. Os modelos de abrasamento (denominados *kindling*) são desencadeados por estímulos elétricos curtos - de poucos segundos - e repetidos, portanto não induzem SE. Contudo, ao contrário dos demais, são importantes para se conhecer o efeito de crises epiléticas de curta duração na fisiopatologia da ELT.⁽¹²⁾

O modelo da pilocarpina, descrito por Turski et al, em 1983, é capaz de reproduzir em roedores as características típicas da ETLM de humanos. A pilocarpina é um agonista muscarínico retirado da planta *Pilocarpus jaborandi* e causa crises epiléticas quando administrada por via sistêmica (intraperitoneal ou subcutânea) ou intracerebral. Já foi demonstrado em estudos experimentais que a pilocarpina induz o SE nos animais, o que representa a LPI observada frequentemente nos pacientes com ETLM. Além disso, os animais apresentam lesão neuronal hipocampal similar à observada nestes pacientes.^(38,39) Após um período de latência, que varia entre 14 e 15 dias, os animais passam a desenvolver crises espontâneas recorrentes (fase da epilepsia).⁽⁴⁰⁾

A lesão neuronal resultante após indução de SE por pilocarpina não é devida ao

efeito tóxico da pilocarpina, mas do efeito excitotóxico que envolve receptores de glutamato e influxo de íons cálcio ativados durante o estímulo. As crises que ocorrem durante o SE na fase aguda são diferentes das CRE na fase crônica da doença, pois há uma mudança e reorganização dos circuitos neuronais a partir do estímulo inicial – o SE.⁽³⁶⁾

Até o momento, foram publicados cerca de 1.300 estudos sobre o modelo da pilocarpina e, destes, mais de 95% referem-se a sua aplicação por via sistêmica para a indução do SE (extraído de “PubMed” utilizando os unitermos “*pilocarpine and status epilepticus*” em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, em 01/08/2016). Quando a pilocarpina é aplicada dessa forma, a latência entre o início do SE e a aplicação do tratamento com anticonvulsivantes, como diazepam ou barbitúricos, é diretamente proporcional a gravidade da lesão neuronal. Além disso, foi observado que na aplicação por via sistêmica da pilocarpina apenas 60% dos animais entram em SE, sendo que destes, aproximadamente 70% vão a óbito.⁽⁴⁰⁾

No presente estudo, utilizamos o modelo de pilocarpina intracerebral. Estudos recentes demonstraram que a aplicação de pilocarpina por via intra-hipocampal (intracerebral) diminui consideravelmente a mortalidade dos animais e representa de forma eficaz as características neuropatológicas da ELT nos modelos animais. Portanto, o uso de um modelo experimental com baixa mortalidade facilitaria, de forma significativa, o desenvolvimento de estudos sobre a fisiopatologia da ELTM e, portanto, de estratégias para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que sofrem da doença.

1.5 A Amígdala

A amígdala é uma estrutura do lobo temporal que, juntamente com outras regiões, forma um sistema envolvido no processamento de memória emocional, formação de memória a longo prazo e no comportamento afetivo. Estes circuitos neuronais responsáveis por tais comportamentos também estão diretamente relacionados com a fisiopatologia de transtornos psiquiátricos.⁽⁴¹⁾

A amígdala, ou complexo amigdalóide, é formada por 13 núcleos, com amplas conexões internucleares e intranucleares, divididos, basicamente, em três grupos: 1) o grupo basolateral (profundo), abrangendo o núcleo lateral, núcleo basal e núcleo lateral secundário; 2) o grupo cortical (superficial), abrangendo os núcleos corticais e o núcleo do trato olfatório lateral; e 3) grupo centromedial, compreendendo os núcleos medial e central.^(42,43)

Os núcleos basolaterais, associados às conexões neuronais, recebem informações de todo o sistema sensorial e auditivo. Além disso, os núcleos basolateral e basomedial recebem projeções do córtex, tálamo auditivo e áreas ventrais do hipotálamo.⁽⁴⁴⁾ Estas conexões entre as diversas estruturas do sistema límbico e o complexo amigdalóide podem ser excitatórias e inibitórias, ocorrendo a partir de vias corticais e subcorticais.⁽⁴⁵⁾ Sua atividade é, sobretudo, mediada por sinalização glutamatérgica, podendo ser aumentada em diversas condições.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾

Pacientes com ELT comumente apresentam atrofia e lesão neuronal na amígdala.⁽⁴⁹⁾ Estudos recentes em diversos modelos experimentais de epilepsia sugerem que a amígdala pode apresentar papel importante no processo de epileptogênese, apresentando maior susceptibilidade a gerar crises epiléticas do que o hipocampo.^(50,51)

Alguns destes incluem a exposição sistêmica ao Soman, modelos de estimulação elétrica e abrasamento de estruturas límbicas e injeção de ácido caínico intra-amigdalar.

Modelos experimentais de exposição por via sistêmica de ratos ao Soman, um inibidor da acetilcolinesterase utilizado como arma química, sugerem que o aumento da atividade colinérgica na amígdala tem papel fundamental na geração das crises epilépticas e da lesão neuropatológica subsequente.⁽⁵²⁾ Já em modelos experimentais de indução de crises epilépticas de curta duração (de um e dois minutos), a estimulação elétrica de diferentes estruturas límbicas gera crises convulsivas com características comportamentais similares. Nos modelos de indução de SE por estimulação elétrica da amígdala, o SE convulsivo ocorre associado à indução da epilepsia em cerca de 90% dos animais. Adicionalmente, esses animais apresentam lesão neuronal menos difusa do que a detectada nos modelos de aplicação sistêmica de pilocarpina.^(53,54) Os modelos de indução de SE por aplicação de ácido caínico na amígdala são associados à lesão neuronal de estruturas límbicas, como amígdala e hipocampo, com predomínio no mesmo lado em que foi aplicado o ácido caínico.⁽⁵⁵⁾

Recentemente, Yi et al.,⁽⁵⁶⁾ utilizando registros de EEG, observaram que a aplicação de pilocarpina na amígdala de ratos induz SE. Contudo, até o momento, nas bases de dados disponíveis, não há dados sobre as características comportamentais do SE induzido por aplicação intra-amigdalar de pilocarpina nem sobre o efeito de esse SE no comportamento e na morfologia de estruturas límbicas.

No presente estudo, utilizamos o modelo de pilocarpina intra-amigdalar (que consiste na injeção da pilocarpina diretamente na amígdala), que ainda não foi caracterizado pelos estudos científicos atuais com relação às alterações histopatológicas e comportamentais a longo prazo. A caracterização e validação de um novo modelo

experimental de ELT utilizando a amígdala poderia contribuir com a compreensão do papel desta estrutura na ELT, da fisiopatologia e alterações comportamentais envolvidas, auxiliando no desenvolvimento de um estudo translacional, que culmine a médio ou longo prazo na melhora da qualidade de vida dos pacientes, como o desenvolvimento de novos fármacos.

1.6 Objetivos

❖ **Objetivos gerais**

Caracterizar alterações comportamentais e neuropatológicas, agudas e crônicas – em até 24 horas e 30 dias, respectivamente - que ocorrem após a indução de SE por aplicação de pilocarpina na amígdala de ratos *Wistar* adultos.

❖ **Objetivos Específicos**

1. Verificar se a injeção de pilocarpina na amígdala de ratos *Wistar* gera SE.
2. Verificar se, após o SE, são desencadeadas CRE – fase da epilepsia crônica – em até 30 dias após o SE e, se sim, verificar a frequência e gravidade destas crises;
3. Verificar se o modelo de injeção de pilocarpina na amígdala de ratos *Wistar* gera lesão neuronal – perda e degeneração – em até 24 horas e 30 dias após o SE, bem como a gravidade destas lesões.
4. Verificar se há relação entre a gravidade do SE e das CRE com a lesão neuronal.

1.7 Hipótese

Espera-se que o modelo de indução de SE por injeção de pilocarpina na amígdala possa reproduzir nos animais características típicas da ELT em humanos, com lesão neuronal da amígdala e outras estruturas límbicas e desencadeando a epilepsia nos animais, confirmando, portanto, o papel da amígdala na ELT.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Todos os procedimentos foram realizados conforme as normas de ética na experimentação com animais. O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (Protocolo nº: 001-0032589/2014; Anexo 1).

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (N total = 38), adultos, com 70 dias de idade e 200 a 250 g de peso no início dos experimentos. Os animais, provindos do biotério de criação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, foram alojados em caixas contendo maravalha no biotério de experimentação do Laboratório de Fisiologia Experimental- FAMERP, com temperatura controlada (de $24^{\circ}\pm 2C$), com ciclos de 12/12 horas de luz acesa e apagada e livre acesso à água e alimentação.

Inicialmente, os animais foram mantidos em grupos e, após o início dos experimentos, mantidos em caixas de acrílico individuais. Todos os animais foram monitorados e manuseados diariamente durante o período do experimento e, fatores como ventilação, umidade, ruído e qualidade do ar foram controlados o máximo possível, bem como as condições de alojamento e alimentação. Além disso, diariamente os animais foram colocados para interagir com os demais, no período da manhã, durante pelo menos 30 minutos. Isto garantiu que eles se mantivessem dóceis e proporcionou uma boa adaptação e relacionamento entre si e com os experimentadores. Adicionalmente, foi implantado enriquecimento ambiental das caixas (um tubo de PVC por animal). Em dias alternados os ratos foram pesados durante o tempo de experimento.

2.2 Protocolo Experimental

No início dos experimentos, todos os animais (N=38) foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de uma cânula na amígdala direita. Após um período de recuperação de 7 dias, os animais foram distribuídos ao acaso nos grupos SE (N=18) e controle (Ctrl, N=14), que foram injetados respectivamente com pilocarpina (para indução do SE) ou solução salina, ambos via intra-amígdalar. O SE foi tratado 4 horas após seu início com diazepam (DZP). O grupo controle recebeu o mesmo tratamento (Figura 1). Posteriormente, os animais foram distribuídos ao acaso em dois grupos caracterizados de acordo com o tempo de estudo desde o início do SE até a eutanásia: grupos 24h (N=18) e 30 dias (N=20), para estudo agudo e crônico, respectivamente.

O comportamento de todos os animais foi registrado por vídeo a partir das injeções na amígdala até 24 horas (grupo 24h) e 30 dias (grupo 30d) após o SE (Figura 2). Após a eutanásia, os cérebros foram processados em parafina e cortados em seções coronais coradas por hematoxilina-eosina (HE) e fluoro-jade C (FJC) para contagem de neurônios normais e em degeneração, respectivamente. A contagem neuronal foi realizada nas regiões da amígdala, hipocampo, tálamo, hipotálamo, córtex perirrinal e piriforme.

As variáveis registradas foram: a) latência para início do SE; b) duração das crises parciais e generalizadas no SE, antes e após a aplicação de diazepam no dia do SE; c) gravidade, frequência e horário do dia das crises recorrentes espontâneas (CRE); d) número de neurônios em degeneração (células FJC+) e número de neurônios normais remanescentes (células coradas por HE); e) correlação entre a duração do SE e a lesão

neuronal aguda e crônica; f) correlação entre a duração do SE e o número de CRE; g) correlação entre o número de CRE e a lesão neuronal crônica.

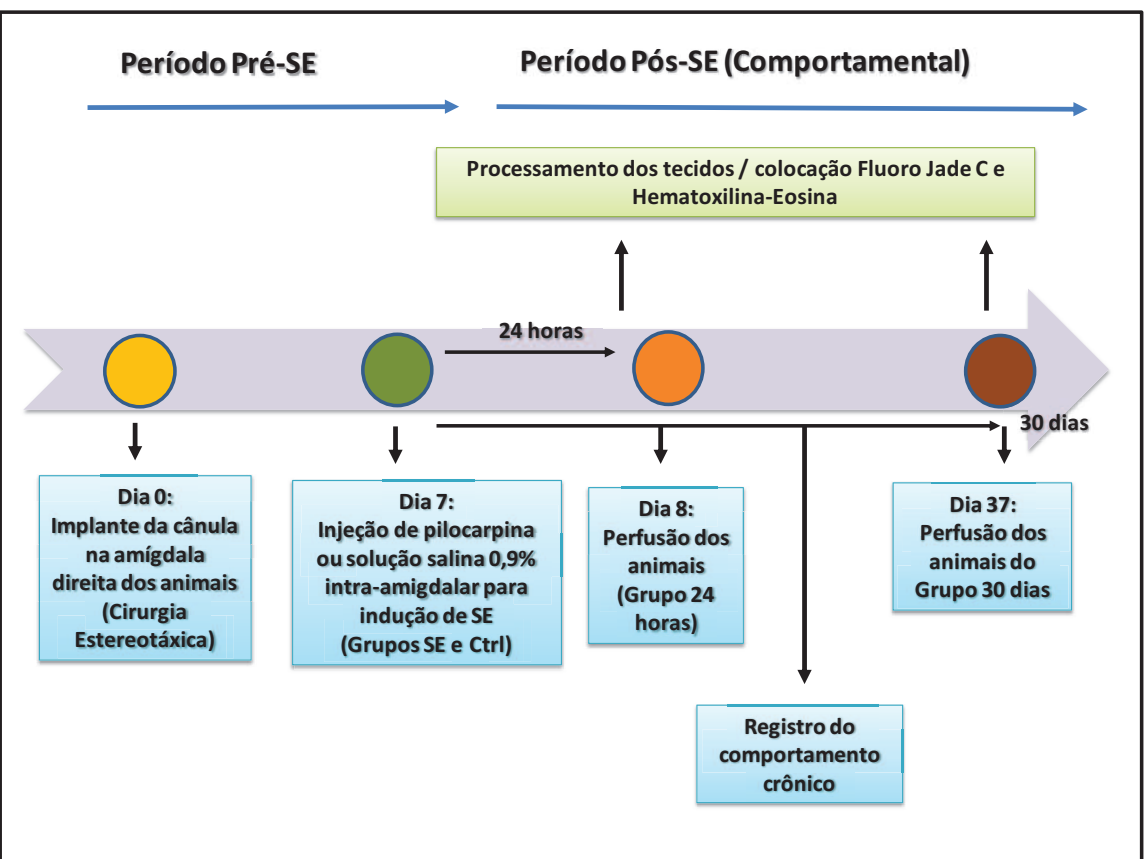


Figura 1. Linha temporal dos procedimentos experimentais.

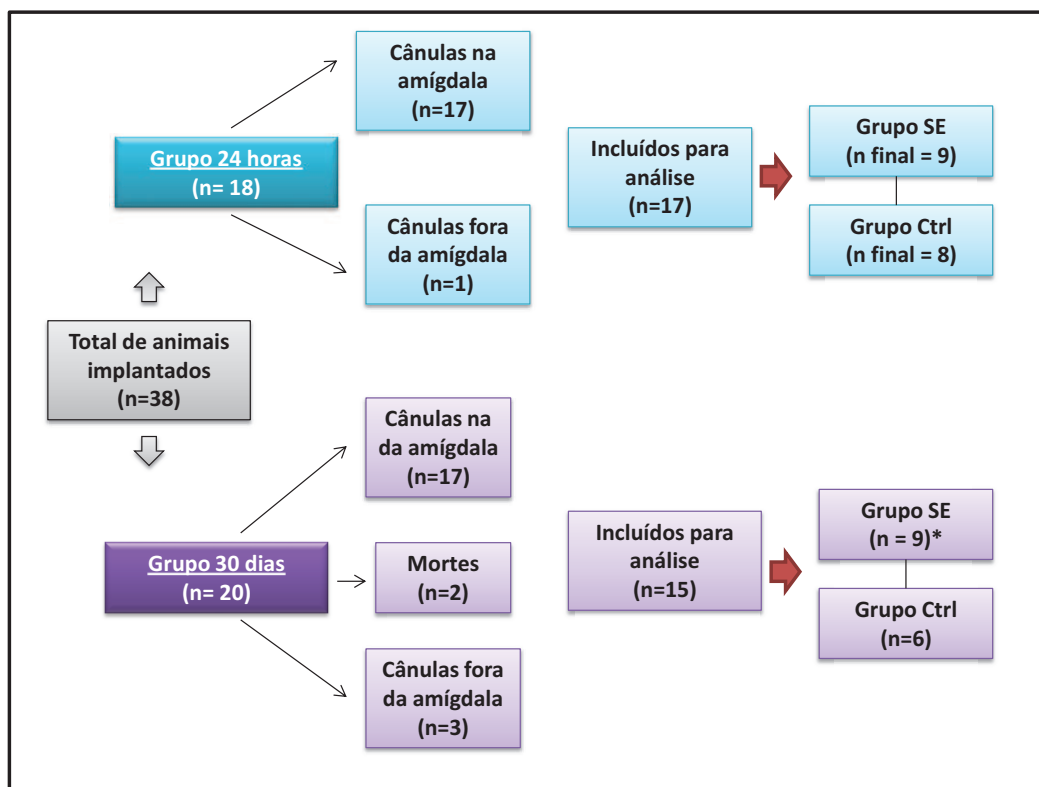


Figura 2. Grupos experimentais. Dos 17 animais com cânulas na amígdala do grupo 30 dias, dois foram a óbito, após a anestesia cirúrgica e durante o SE. (*) A análise comportamental crônica foi realizada em 7 animais do grupo SE. As abreviações indicam: SE (Status Epiléptico) e Ctrl (Controle).

2.3 Técnicas

2.3.1 Cirurgia estereotáxica

A cirurgia estereotáxica teve por finalidade a implantação de uma cânula intracerebral, como via de acesso para administração da pilocarpina na amígdala para indução do SE. Primeiramente, todos os ratos foram tricotomizados nas regiões de injeções farmacológicas (região abdominal, dorso, patas posteriores e cabeça). Foram administrados os seguintes medicamentos: Acepromazina (para pré-anestesia, 1 mg/kg,

subcutâneo; s.c) e, após 10 minutos, a associação Ketamina (50 mg/kg, intramuscular, i.m) e Xilazina (10 mg/kg, i.m) no membro posterior esquerdo para anestesia geral. A Ketamina é um anestésico dissociativo e a Xilazina, além de propriedade anestésica, atua como relaxante muscular. Adicionalmente, foi administrado Pentabiótico (100.000 U.I/kg; i.m; Benzilpenicilina benzatina 3.000.000 UI; Benzilpenicilina procaína 1.500.000 UI; Benzilpenicilina potássica 1.500.000 UI, Dihidroestreptomicina base 1.250 mg; Estreptomicina base 1.250 mg) – no membro posterior direito.

O estereotáxico comporta o rato anestesiado, em decúbito ventral, e sua cabeça foi imobilizada adequando-a as barras auriculares. Foi utilizado um campo cirúrgico por animal, deixando-se à mostra somente a região de resseção. A assepsia da cabeça foi realizada com álcool iodado e a anestesia local com Cloridrato de prilocaína com felipressina (Cloridrato de Prilocaína – 30 mg/ml; Felipressina – 0,03 UI/ml). A dissecação da pele foi realizada retirando-se o tecido subcutâneo e na sequência foi realizada limpeza do osso com algodão seco, com o auxílio de uma pinça cirúrgica.

Antes da implantação, o crânio foi horizontalizado com relação às suturas *bregma* e *lambda*. A coordenada estereotáxica da localização da amígdala foi baseada no Atlas de *Paxinos e Watson* (2007), que usou como referência o ponto *bregma*: AP= - 2,0 mm; Lat = - 4,8 mm; Vertical = - 7,2 mm. Uma furadeira com broca limpa e esterilizada foi usada para furar a superfície do osso do crânio. Além da cânula, um pequeno parafuso foi implantado na superfície do osso de forma a garantir a fixação do capacete, confeccionado com acrílico autopolimerizante, ao final da cirurgia para aderir-se à cânula permanentemente. Após a confecção do capacete, foi instalado um mandril na cânula para evitar contaminação (Figura 3).

Os animais ficaram em observação e foram tratados com o analgésico Flunixinina

Meglumine (1 mg/kg, s.c) – aplicada a cada 24 horas, no total de 3 doses e tiveram período de recuperação cirúrgica de sete dias.

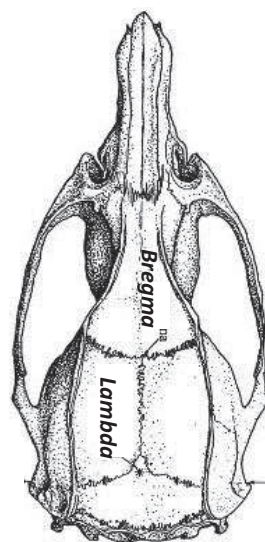
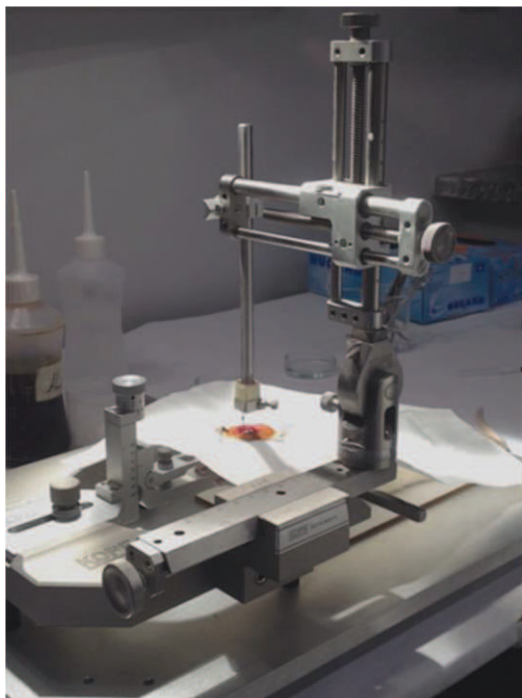


Figura 3. Rato fixado no estereotáxico durante cirurgia para implante de cânula intracerebral, na amígdala (*Acervo pessoal*). A figura à direita mostra o crânio do rato com as suturas e os referenciais para localização da coordenada de implante da cânula (*Modificado de Paxinos e Watson, 2007*).

2.3.2 Indução do status epilepticus

Sete dias após a cirurgia estereotáxica, foi preparado o sistema de injeção de pilocarpina para indução do SE. O sistema de injeção é composto por um microtubo contendo pilocarpina, microseringa conectada a um cateter de polietileno e a uma microagulha na extremidade (Figura 4-A). A microagulha conectada ao cateter e à microseringa foi introduzida na cânula, através da qual foi aplicado 0,9 mg/ μ L de solução de pilocarpina para a indução do SE, em um total de 1 μ L por animal. A

pilocarpina foi injetada a uma velocidade de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, no período de 1 minuto e 40 segundos para aplicação total. Para o grupo controle ou Ctrl, 1 μL de solução salina 0,9% foi injetada ao invés da pilocarpina, pela mesma via de administração. Uma vez que a pilocarpina é fotosensível, todo o processo foi realizado em ambiente escuro sob luz vermelha.

Após a aplicação de pilocarpina, todos os animais foram colocados em caixas de acrílico transparentes e individuais para observação e verificação da ocorrência de SE, que foi monitorado por vídeo e por observação direta (Figura 4-B-C). Geralmente, os animais apresentam as primeiras crises epiléticas entre 30 segundos e 5 minutos após a administração de pilocarpina. Quatro horas após o início do SE, foi aplicado DZP (10 mg/kg, intraperitoneal, i.p) para atenuação das crises. Os animais Ctrl receberam o mesmo tratamento 4 horas após a injeção de solução salina. Desde o momento após a injeção intra-amigdalár e durante as seguintes 20 horas o comportamento de todos os animais foi registrado utilizando câmara de vídeo e quaisquer eventos durante o experimento foram registrados em ficha individual.

Todos os animais foram hidratados com 2,5 mL solução salina 0,9% via s.c a cada 3 horas, durante o dia e a noite, até cerca de 24 horas após a injeção de pilocarpina. A hidratação é importante, pois os animais ficam incapacitados de beberem água em decorrência das crises. Além disso, a hidratação constante previne a rabdomiólise. Foi colocada ração nas caixas de acrílico durante a noite. Em alguns casos, no período em que as crises amenizam ou param, os ratos conseguem se alimentar sozinhos. No início da manhã seguinte, o registro por vídeo pós-SE foi interrompido e os animais receberam banho com água morna e sabão neutro.

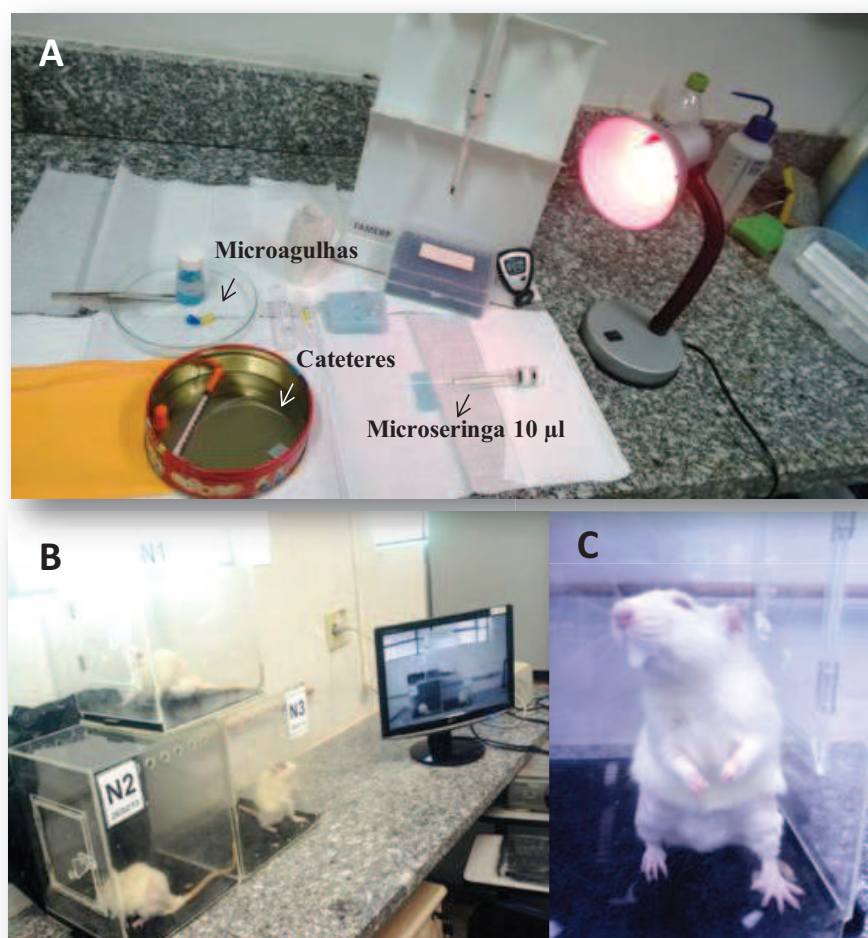


Figura 4. Sistema utilizado para indução de *Status Epilepticus* (SE). A) Material utilizado na aplicação intracerebral de pilocarpina ou solução salina; B) Sistema de registro de vídeo; C) Rato apresentando crises generalizadas de Racine 4 após injeção de pilocarpina. *Acervo pessoal.*

2.3.3 Avaliação comportamental

Em 1972, Ronald J. Racine ⁽⁵⁷⁾ caracterizou, em ratos, crises epilépticas em cinco categorias: 1) ocorrência de automatismos faciais – olhos, orelhas, bochechas; 2) mioclônias da cabeça; 3) mioclônias dos membros anteriores e/ou posteriores, unilateral ou bilateral (com aumento ou não da base de sustentação); 4) elevação corporal com ou sem mioclônias da cabeça e membros anteriores; e 5) elevação seguida por queda e

perda de postura corporal (Racine, R., 1972). As categorias 1 e 2 caracterizam crises parciais e as categorias 3, 4 e 5, generalizadas.

Para as análises, o SE foi classificado em: 1) SE parcial ou generalizado: tempo de SE com predomínio de crises parciais ou generalizadas (≥ 2 horas) durante as 4 horas antes do DZP; 2) SE parcial ou generalizado total: tempo de SE com predomínio de crises parciais ou generalizadas, em até 20 horas; e, 3) SE total: tempo total do SE, em até 20 horas, somando-se crises parciais e generalizadas.

Para a avaliação da ocorrência de Crises Espontâneas Recorrentes (CRE), o comportamento dos animais foi filmado em caixas de acrílico individuais durante 24 horas por dia, diariamente, em até 30 dias a partir do dia do SE (Figura 5).

As análises dos registros comportamentais crônicos foram realizadas a partir do 8º dia após o SE até o 30º, em um período de análise de 22 dias. Para a análise, as seguintes variáveis foram registradas: frequência e gravidade das CRE em cada animal e hora do dia de ocorrência.

As análises dos registros por vídeo das quatro horas do SE foram realizadas utilizando o software desenvolvido por Mejia J (2015), que permite quantificar o tempo e a sequência das crises por comandos computacionais. As análises do comportamento do SE após a aplicação do DZP e registros crônicos foram realizadas manualmente utilizando o programa *Nero ShowTime Essencial 9*. Todos os dados contendo a frequência e duração das crises foram armazenados utilizando planilhas do programa Microsoft Office Excel – 2010.

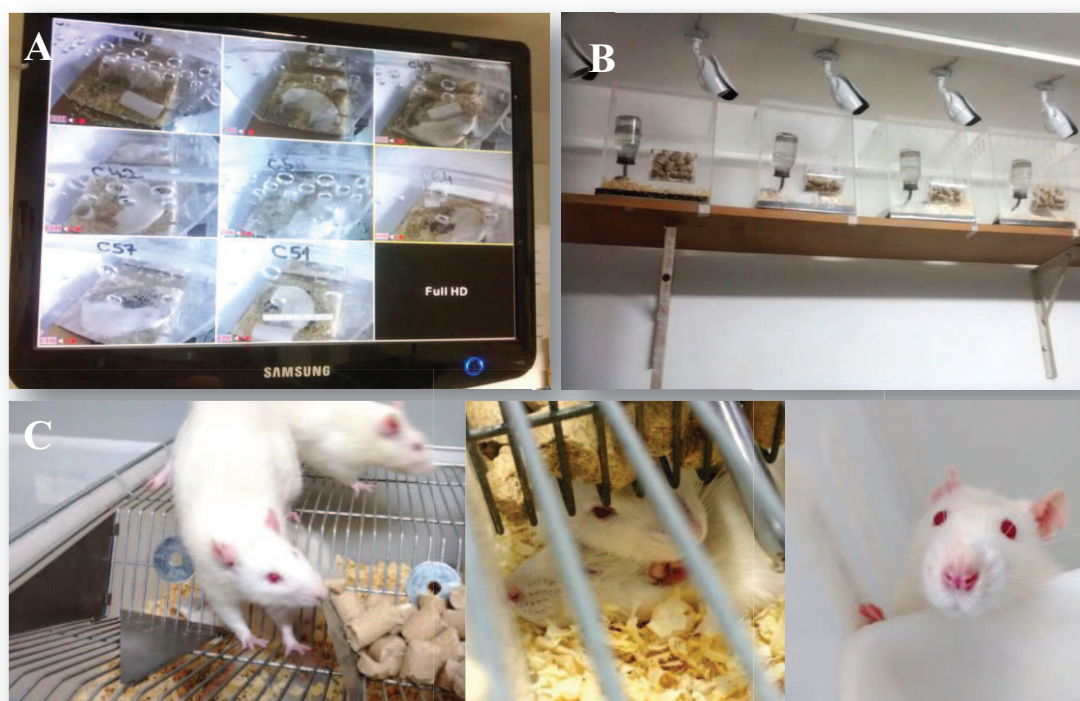


Figura 5. A e B) Sistema de monitoramento por vídeo das CRE; C) Ratos *Wistar* utilizados no experimento; imagens mostram o momento da recreação, onde ocorreu a interação social entre os animais e com os pesquisadores. *Acervo pessoal.*

2.3.4 Perfusão cerebral

A perfusão cerebral tem como finalidade fixar o tecido cerebral para processamento e inclusão em parafina. No dia do experimento, heparina (5000 UI/ml; s.c) foi administrado via subcutânea e, após 20 minutos, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg; i.m). Foi realizada esternotomia, e por meio de canulação do ventrículo esquerdo, foram injetados 50 ml de solução salina 0,9% seguida de 250 ml de paraformaldeído (PFA) 4% (durante cerca de 20 minutos). A solução fisiológica tem por finalidade limpar o conteúdo sanguíneo para boa fixação, uma vez que as hemácias geram artefatos na análise histológica. O PFA 4%

promove a fixação do tecido. Após o fim do procedimento, os cérebros foram extraídos cuidadosamente (utilizando-se alicate e tesoura) e colocados em cassetes histológicos para o processamento (Figura 6).



Figura 6. Cérebros após perfusão e processamento em PFA 4%. A) vista dorsal; B) vista ventral. *Acervo pessoal.*

2.3.5 Processamento dos cérebros

Após a perfusão, os cérebros foram imersos em PFA 4%, para pós-fixação durante 4 horas. No processamento histológico, os tecidos foram desidratados com soluções alcoólicas, pois a água presente neste não é miscível em substâncias polares como a parafina, meio utilizado para a inclusão. Soluções contendo xilol agem como solvente específico da parafina para a retirada do álcool dos tecidos. Ao final do processo, os tecidos foram incluídos em parafina. A sequência de soluções de processamento foi a seguinte: etanol 70% (40 min. a 2 h), etanol 80% (40 min), etanol 90% (40 min), etanol 95% (40 min), etanol absoluto I (90 min), etanol absoluto II (90

min), etanol absoluto III (1 h), etanol absoluto IV (1 h), etanol 50% - etileno 50% (1 h); xileno I (1 h), xileno II (1 h), xileno III (1 h), xileno IV (1 h); parafina I (1h30min), parafina II (2h), parafina III (2h).

Os blocos de parafina contendo os cérebros foram cortados, usando micrótomo (*Leica*, RM 2245), em secções coronais de 8,0 μ m de espessura, que foram colocadas em lâminas previamente gelatinizadas. As lâminas foram confeccionadas e montadas com secções em níveis cerebrais, de acordo com o plano anteroposterior (AP) com referência ao ponto *Bregma*: Nível anterior (coordenada – 2,92 mm) e Nível posterior (coordenada – 3,72, para amígdala, tálamo, hipotálamo e córtices perirrinal e piriforme e – 5,04 , para hipocampo) (Figura 7).

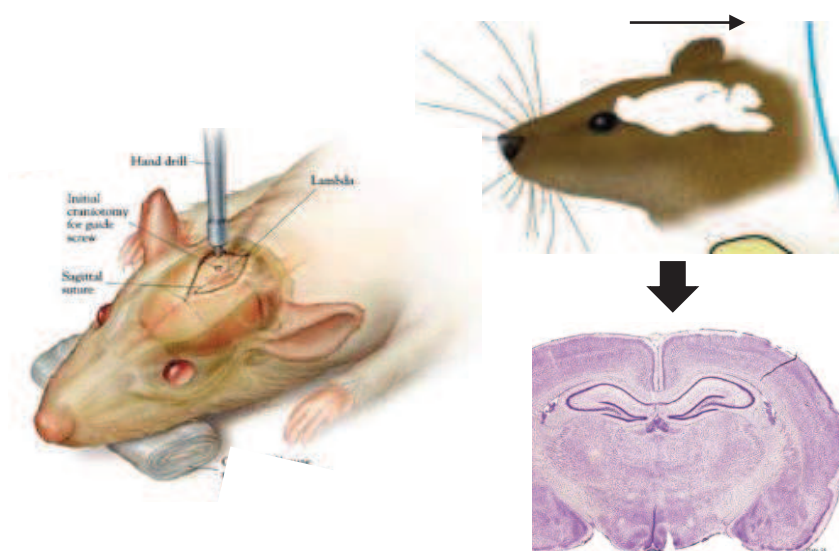


Figura 7. Imagens representativas da orientação de corte – coronal - das secções cerebrais cortadas em micrótomo para confecção das lâminas para análise neuropatológica. Fonte: www.medscape.com e acervo pessoal.

2.3.6 Histoquímica de Fluoro-Jade C

O fluoro jade é um fluorocromo derivado de fluoresceína que permite identificar neurônios em processo de degeneração. Existem as colorações Fluoro Jade[®], Fluoro Jade[®] B e Fluoro Jade[®] C. Para o presente estudo foi utilizada a coloração de Fluoro Jade[®] C (FJC), pois apresenta elevada relação entre marcação da degeneração e o fundo, alta definição e bom contraste. Além disso, o FJC é altamente resistente ao desgaste e compatível com quase todos os processos histológicos e protocolos de coloração.⁽⁵⁸⁾

Os neurônios em degeneração corados por FJC apresentam-se fluorescentes com relação ao fundo e possuem morfologia anormal, com citoplasma tipicamente irregular, ao passo que neurônios normais não apresentam fluorescência e mantêm a morfologia normal e regular do núcleo e citoplasma (Figura 8).

As lâminas contendo as secções primeiramente foram colocadas em estufa por 15 minutos à 50° C. Em seguida, passaram por um processo de desparafinização e hidratação. A desparafinização é necessária para retirada total da parafina remanescente, e a hidratação para a coloração se aderir adequadamente ao tecido.

A sequência de soluções utilizadas para colocação de FJ-C foi a seguinte: xilol I (10 minutos); xilol II (10 minutos); xilol III (10 minutos); xilol 50%: álcool 50% (5 minutos); álcool absoluto (5 minutos); lavagem em água destilada; álcool básico (5 minutos); etanol 70% (2 minutos); água destilada (2 minutos); permanganato de potássio 0,006% (10 minutos); água destilada (2 minutos); imersão em solução de FJ-C 0,0001% dissolvido em ácido acético 0,1% (10 minutos) e 3 lavagens em água destilada (1 minuto cada uma). No final, as secções foram secadas em estufa – 50° C a 60°C (5 minutos) e imersas em xilol (1 a 5 minutos) para montagem com lamínulas com DPX.

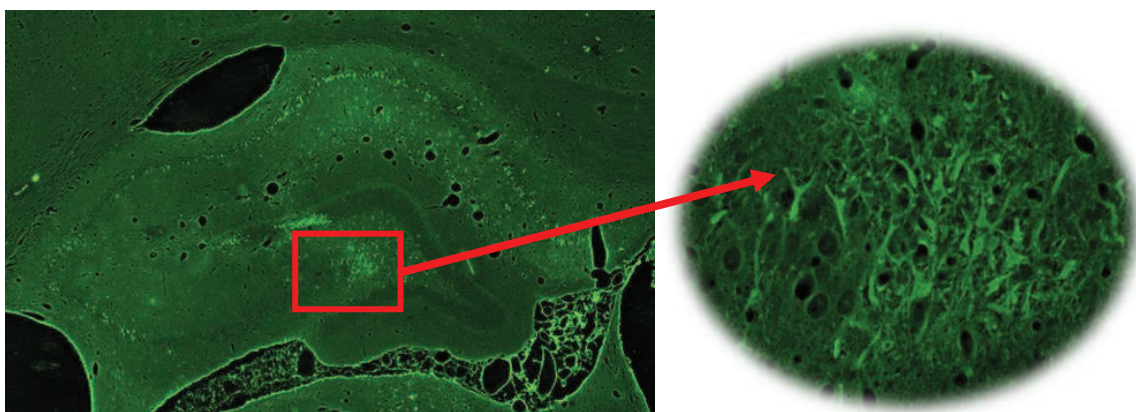


Figura 8. Imagem de secção panorâmica do hipocampo de um rato corada por FJC, destacando a região do Corno de Amon 4 (CA4), mostrando neurónios em processo de degeneração em fluorescência. Fonte: *Acervo pessoal.*

A coloração de HE é a mais comum técnica de coloração utilizada em âmbito geral na histologia. Este tipo de coloração associa dois corantes clássicos, a hematoxilina e a eosina. A hematoxilina é um corante de carácter básico, que cora estruturas ácidas da célula, como os ácidos nucleicos contidos no núcleo, conferindo coloração azulada (basófila) a estas estruturas (Figura 9). O corante eosina possui carácter ácido, portanto cora componentes básicos, normalmente contidos no citoplasma da célula, conferindo-lhes coloração rosada (acidófilo). Em nosso trabalho, utilizamos o HE com a finalidade de identificar e caracterizar neurónios normais, ou seja, que não sofreram morte celular ou não entraram em degeneração.

O procedimento de coloração seguiu as seguintes etapas: Após a desparafinização e hidratação dos tecidos, as lâminas contendo as secções passaram por soluções de Xilol I (15 min), Xilol II (15 min), Xilol III (15 min), Álcool Abs. I (6 mergulhos), Álcool Abs. II (6 mergulhos), Álcool 50% (6 mergulhos), água (6 mergulhos), Hematoxilina durante 1 minuto, água (6 mergulhos), Álcool 70% 1% HCl

(mergulho rápido), Álcool 80% (6 mergulhos) e Eosina, por 5 segundos. Posteriormente os tecidos foram desidratados: Álcool Abs. I (6 mergulhos), Álcool Abs. II (6 mergulhos), Álcool Abs. III (6 mergulhos), Xilol I (6 mergulhos), Xilol II (6 mergulhos), Xilol III (6 mergulhos). Ao final do processo, as lâminas foram montadas, com a fixação das lamínulas utilizando verniz transparente.

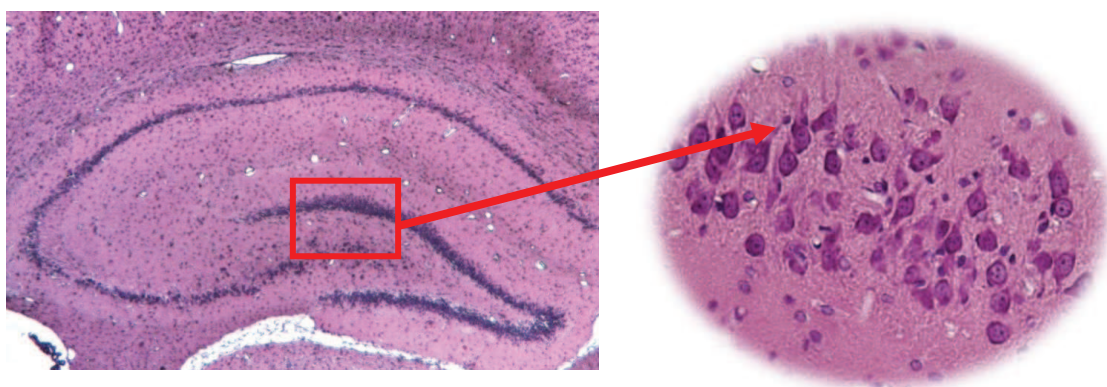


Figura 9. Imagem de secção panorâmica do hipocampo de um rato corada por HE, destacando a região do Corno de Amon 4 (CA4), mostrando neurônios em normais remanescentes. Fonte: *Acervo pessoal*.

2.3.8 Contagem neuronal

As imagens das secções coradas por FJ-C e HE foram capturadas e digitalizadas utilizando um sistema formado por microscópio *OLYMPUS - BX53* de fluorescência e campo claro, acoplado a uma câmara *Retiga 4000R* de alta resolução. Foram adquiridas imagens das seguintes estruturas: hipocampo, núcleos da amígdala, núcleos do tálamo e hipotálamo, córtex perirrinal e córtex piriforme. As imagens do hipocampo foram adquiridas com a objetiva de 40x e das demais estruturas em objetiva de 20x.

Foram analisadas a degeneração e a perda neuronal. A degeneração neuronal foi realizada pela contagem dos neurônios em processo de degeneração, corados por FJC. Para quantificar a perda neuronal foram contados os neurônios normais (remanescentes) em secções coradas por HE. A contagem de neurônios foi realizada utilizando-se o

software *Image J* 1.46 r (*National Institute of Health*).

Foi contado o número de células por mm² de cada uma das regiões do hipocampo, amígdala e demais estruturas límbicas. Os neurônios de todas as estruturas foram analisados em dois níveis cerebrais, um mais anterior e outro posterior. Adicionalmente, foi comparado se houve diferença no número de células no lado direito com relação ao lado esquerdo, no nível anterior com relação ao posterior e, dentro do nível posterior, no caso do hipocampo, diferenças entre as porções dorso-ventrais de cada subcampo analisado. Em estruturas límbicas como a amígdala, tálamo e hipotálamo e córtices perririnal e piriforme, a contagem de células foi realizada nos níveis com coordenadas AP anteriores e posteriores de aproximadamente -2,76 mm e -3,60 mm, respectivamente (Figura 10 e 11). Para o hipocampo, a contagem de células foi realizada nos níveis com coordenadas anteriores e posteriores com AP de aproximadamente -2,76 mm e 5,04 mm, respectivamente (Figura 11 e 12).

Na análise, foram considerados como neurônios em degeneração as células com formato e tamanho de neurônios piramidais marcados com o FJC, e neurônios normais células com formato e tamanho de neurônios piramidais marcados com o HE. As regiões analisadas foram: 1) núcleos da amígdala: BLA – núcleo amígdaloide basolateral anterior; BLP – núcleo amígdaloide basolateral posterior; BMP – núcleo amígdaloide basomedial posterior; LaVM – núcleo amígdaloide lateral ventromedial; MePV – núcleo amígdaloide medial posterodorsal; PMCo – núcleo amígdaloide pósteromedial cortical; 2) DEn – núcleo dorsal endopiriforme; 3) núcleos do tálamo: MDM – núcleo talâmico mediodorsal medial; PVP – núcleo talâmico paraventricular posterior; LDVL – núcleo talâmico laterodorsal ventrolateral; LPLR – núcleo talâmico laterodorsal posterior; LDDM – núcleo talâmico laterodorsal dorsomedial; LPMR –

núcleo talâmico mediorostral posterior; VM – núcleo talâmico ventromedial; VPPC – núcleo talâmico ventral parvicelular posterior; Po – grupo nuclear talâmico posterior; 4) hipotálamo – núcleo PMV – núcleo premamilar ventral; 5) córtices perirrinal (porção dorsal e ventral) e piriforme (porção medial e lateral).⁽⁵⁹⁾

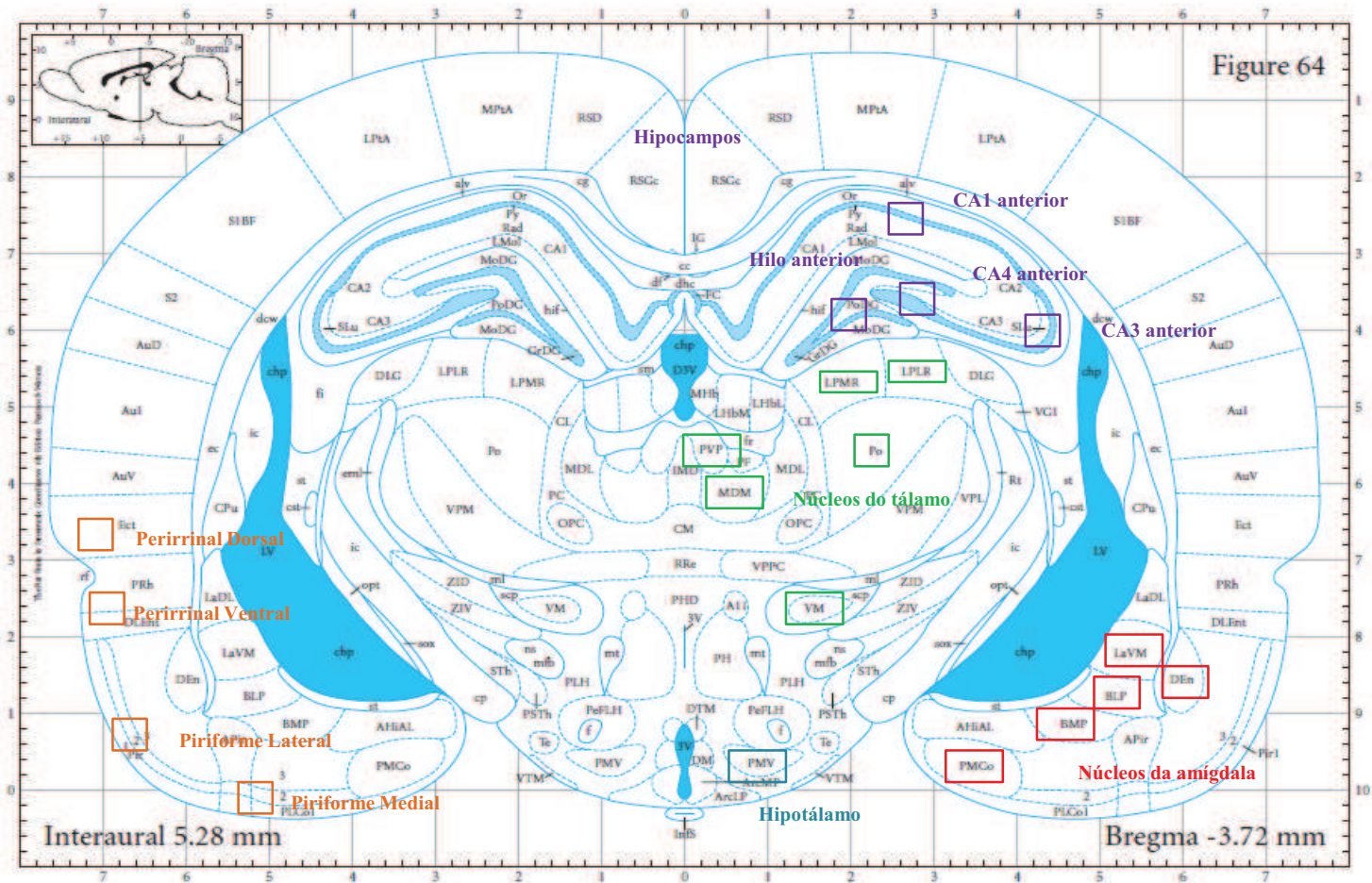


Figura 11. Imagem coronal do cérebro do rato, representativa das regiões cerebrais do nível posterior do tálamo e hipotálamo, amígdala e córtices perirhinal e piriforme, e nível anterior do hipocampo, analisadas quantitativamente. As abreviações indicam: **Hipocampo:** CA1: Corno de Amon 1; CA3: Corno de Amon 3; CA4: Corno de Amon 4. **Núcleos da amígdala:** BLA – núcleo amígdaloide basolateral anterior; BLP – núcleo amígdaloide basolateral posterior; BMP – núcleo amígdaloide basomedial posterior; LaVM – núcleo amígdaloide lateral ventromedial; MePV – núcleo amígdaloide medial posterodorsal; PMCo – Núcleo amígdaloide póstero-medial cortical; DEn – núcleo dorsal endopiriforme. **Núcleos do tálamo:** MDM – núcleo talâmico mediodorsal medial; PVP – núcleo talâmico paraventricular posterior; LDVL – núcleo talâmico laterodorsal ventrolateral; LPLR – núcleo talâmico laterodorsal posterior; LDDM – núcleo talâmico laterodorsal dorsomedial; LPMR – núcleo talâmico mediorostral posterior; VM – núcleo talâmico ventromedial; VPPC – núcleo talâmico ventral parvicelular posterior; Po – grupo nuclear talâmico posterior; Hipotálamo – núcleo PMV – núcleo premamilar ventral. Modificado de: Paxinos and Watson, 2007.

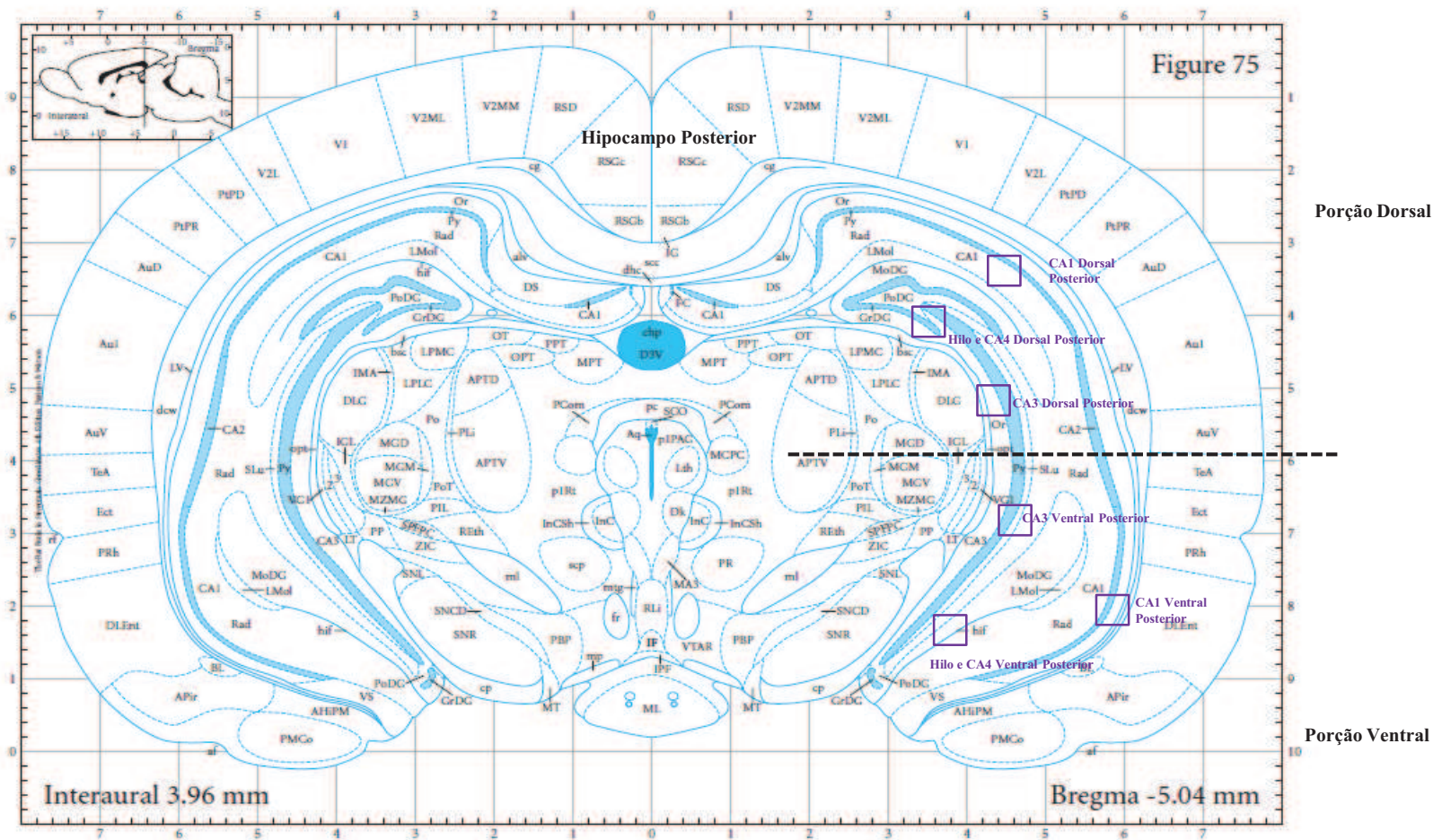


Figura 12. Imagem coronal do cérebro do rato, representativa das regiões cerebrais do nível posterior do hipocampo, dividida em porções dorsal e ventral, analisadas quantitativamente. As abreviações indicam: CA1: Corno de Amon 1; CA3: Corno de Amon 3; CA4: Corno de Amon 4. Modificado de: Paxinos and Watson, 2007.

2.3.9 Análise estatística

Para avaliar se houve diferenças, ao longo do tempo, na evolução do peso dos animais foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas. A comparação do peso, entre os grupos controle e SE, foi realizada usando o teste de *Mann-Whitney Rank Sum*. Para os testes de normalidade, utilizamos *D'Agostino e Person*, e teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Se as variáveis apresentaram distribuição normal, realizamos *teste t Student*, caso contrário, *Mann Whitney Rank Sum*. O nível de significância foi estabelecido em 5% e valores com $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os dados foram apresentados como medida \pm EPM e proporções.

3. RESULTADOS

Resumidamente, os principais resultados de nosso trabalho são: 1) A aplicação de pilocarpina na amígdala de ratos *Wistar* induziu SE em 100% dos animais com cânula localizada na amígdala/complexo amígdalo-piriforme, sendo que a maioria dos animais apresentaram SE com crises predominantemente generalizadas; 2) Todos os animais do grupo crônico apresentaram CRE, predominantemente parciais, que sofreram picos de aumento em até 30 dias; 3) A duração do SE foi associada com o grau de degeneração e perda neuronal de maneira geral, sendo significativa em diversas estruturas límbicas; 4) O número de CRE generalizadas foi associado à gravidade e duração do SE, ocorrendo com alta frequência em quatro dos sete animais avaliados; 4) O número de CRE – parciais e generalizadas – foi diretamente associado ao grau de lesão neuronal de maneira geral; 5) Encontramos lesão neuronal – incluindo degeneração e perda neuronal – no hipocampo (regiões de CA1, CA3, CA4, Hilo e células granulares do giro denteado – este último apenas no grupo 30 dias), núcleos da amígdala (laterais mediais e mediais corticais, predominantemente – LaVM, MePV e PMCo), núcleo endopiriforme dorsal (Den), núcleos do tálamo (predominantemente núcleos mediais, paraventriculares e parvicellulares – PVP, MDM, VM e VPPC) e hipotálamo (apenas posterior, núcleo ventral pré-mamilar – PMV) e córtices perirrinal (porções dorsais e ventrais) e piriforme (porções laterais e mediais).

Com relação aos animais incluídos para as análises, no grupo 24 horas, dos 18 ratos implantados, 17 apresentaram as pontas das cânulas no complexo amigdalar, compreendendo os núcleos basolateral (BLA) e dorso-lateral (LaDL) da amígdala. A cânula de um dos animais, que recebeu injeção de pilocarpina, ficou localizada na cápsula interna, fora da amígdala. Este animal não desenvolveu SE e foi excluído das análises. Dessa forma, no grupo 24 horas, foram incluídos para a análise 17 animais, sendo 8 para o grupo Ctrl e 9 para o grupo SE.

No grupo 30 dias, foram implantados 20 animais. Houve duas mortes (uma após a cirurgia e outra durante o SE) e, dos 18 animais remanescentes, 3 foram excluídos devido à localização da cânula, que estava fora da amígdala. Nos 15 animais incluídos na análise, as cânulas foram detectadas no complexo amigdalopiriforme, incluindo os núcleos lateral, basolateral e ventro-medial da amígdala, até a camada III do córtex piriforme. Para todas as análises, 6 animais compreenderam o grupo SE e 9 animais o grupo Ctrl. Nas análises que envolveram comportamento crônico, foi realizada a avaliação apenas no grupo SE, em 7 animais.

A curva de peso dos animais dos grupos Ctrl e SE, durante o período de avaliação crônica (grupos 30d dias) foi similar. O grupo controle apresentou aumento de peso em função do tempo (ANOVA de medidas repetidas de uma via; $p < 0,001$). O peso dos animais do grupo SE aumentou no período entre a cirurgia e a indução de SE, se manteve estável nos próximos 7 dias, e voltou a aumentar até o final do experimento (ANOVA de medidas repetidas de uma via; $p < 0,001$, Figura 13).

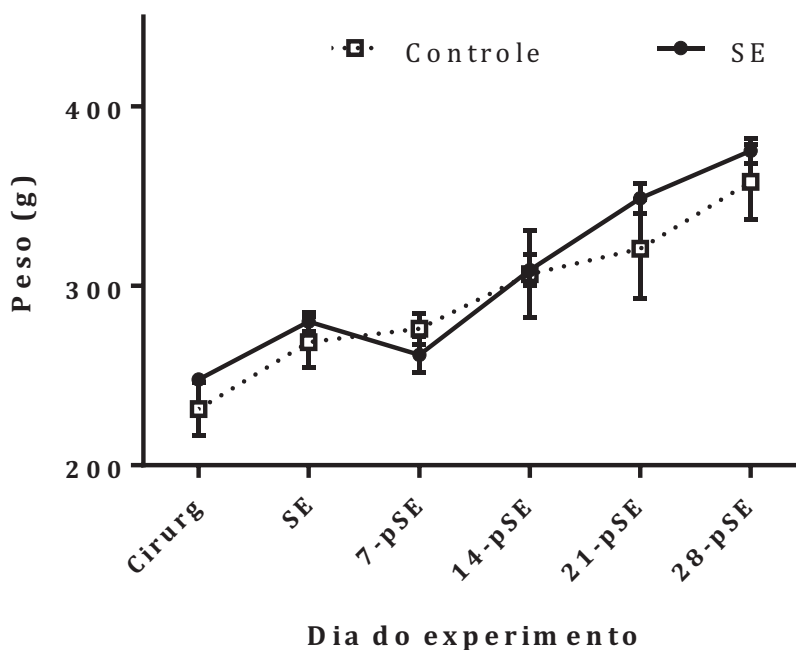


Figura 13. Curva de peso dos grupos controle e SE durante o experimento. Os valores representam a $\text{media} \pm \text{EPM}$, onde pSE indica dia pós-SE. As abreviações indicam: EPM: Erro Padrão da Média; SE: *status epilepticus* e pSE: pós-*status epilepticus*.

3.1 *Status Epilepticus*

Após a aplicação de solução salina intra-amigdalar e durante todo o experimento, os grupos Ctrl apresentaram comportamento normal, sem a presença de crises epiléticas. Do total de animais com cânula localizada no complexo amigdalar/amígdalo-piriforme, de ambos os grupos e injetados com pilocarpina, 100% desenvolveu SE e 83,3% com SE predominantemente generalizado, ou seja, com duração igual ou maior que 2 horas.

Após a injeção de pilocarpina, a latência média para início do SE em todos os animais foi de 20 ± 2 minutos. Após o início do SE, os animais apresentaram crises parciais e generalizadas durante 117 ± 15 e 86 ± 17 minutos, respectivamente

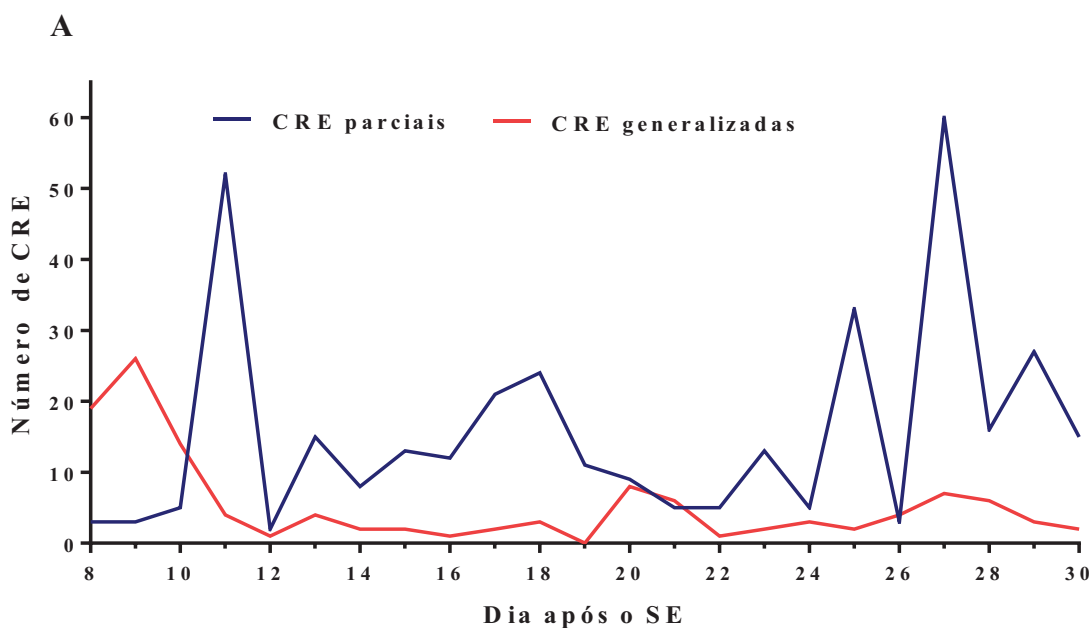
(média±EPM). Após a aplicação do DZP, as crises pararam temporariamente e reincidiram durante aproximadas 20 horas seguintes, de forma intermitente, com duração total de crises parciais e generalizadas, neste período, de 201±40 e 27±11 minutos, respectivamente (média±EPM). Quando os grupos 24 h e 30d foram comparados, não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados. No grupo 24 horas, 100% dos animais apresentou SE generalizado por mais de duas horas, ao passo que no grupo 30 dias, 55,5%. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de os animais do grupo 30 dias terem apresentado pequena variabilidade na localização das cânulas na amígdala, com alguns deles apresentando-a no próximo ao córtex piriforme.

3.2 Crises Recorrentes Espontâneas

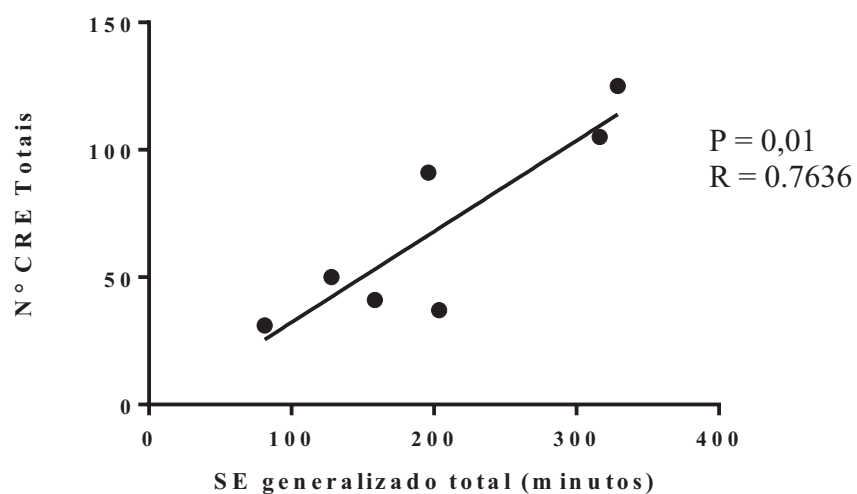
Durante o período de registro crônico de 22 dias, com análise iniciando-se a partir do 8º dia após o SE, foram detectadas CRE em todos os animais, em uma média de 51±9 e 17±5 crises parciais e generalizadas, respectivamente (média±EPM). No 8º dia após o SE, três dos sete animais analisados já apresentavam CRE generalizadas (entre 7 e 15 crises generalizadas neste dia) e, a partir do 13º dia todos os animais já haviam apresentado pelo menos duas CRE. Três animais apresentaram alto número de CRE ao longo do tempo, um animal número moderado e outros três animais baixo número de CRE. Estes três dos sete animais analisados apresentaram maior frequência e gravidade de CRE, tanto parciais quanto generalizadas, com relação aos demais. Destes, um teve a cânula localizada na amígdala basolateral e os outros dois no complexo amígdalo-piriforme. Além disso, a frequência das crises oscilou ao longo do período e ocorreu de forma não periódica, com picos no 9º, 10º, 11º, 13º, 18º, 25º e 27º dias

(Figura 14A). O número de crises parciais foi maior que o número de crises generalizadas durante o período analisado (teste *t de Student*, $p=0,007$). O número médio de crises generalizadas nestes animais foi de 31, enquanto que nos demais animais foi de 7. Estas variáveis foram associadas positivamente com a o SE destes animais, que teve alta gravidade, havendo, portanto, correlação positiva entre a duração do SE generalizado total (antes e após o DZP) e o número de CRE parciais, generalizadas e totais (Figura 14B).

Com relação ao ciclo circadiano, no período analisado, CRE ocorreram em todas as horas do dia e foram mais frequentes no período noturno do que no diurno (teste *t Student*, $p=0,002$) (Figura 14C).



B



C

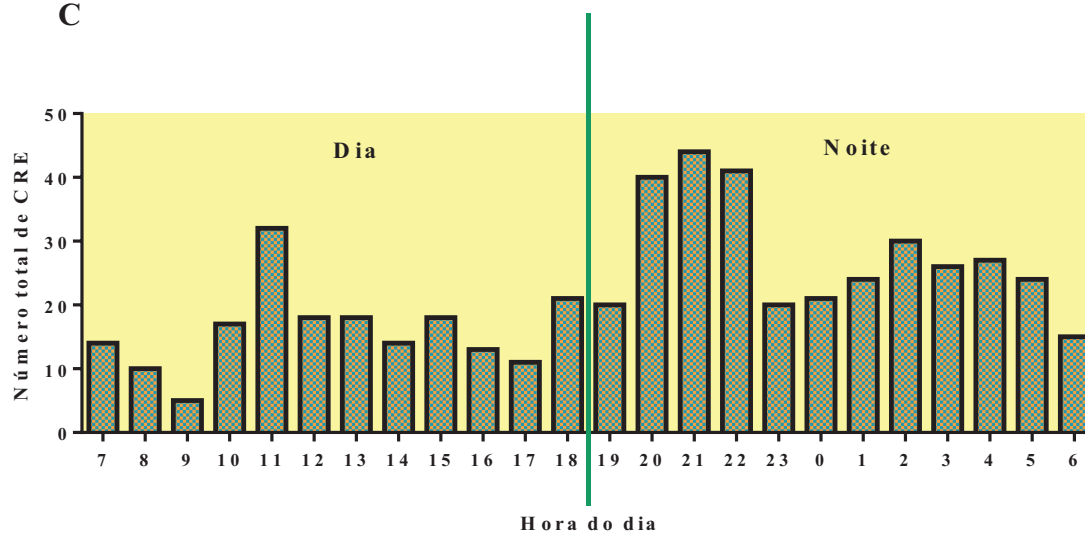


Figura 14. A) Regressão linear entre a duração do SE generalizado total (antes e após o DZP) e o número total de CRE registradas entre os dias 8 e 30 após o SE ($n=7$). B) Gráfico da evolução do número de CRE parciais e generalizadas ao longo dos 22 dias ($n = 7$). C) Número total de CRE (parciais e generalizadas), no período do dia (7h às 18h) e da noite (19h às 6h) detectadas entre os dias 8 e 30 após o SE.

3.3 Lesão Neuronal de Estruturas Límbicas

3.3.1 Degeneração e Perda Neuronal Hipocampal

3.3.1.1 Grupo 24 horas

Com relação à degeneração hipocampal, os animais do grupo controle não apresentaram neurônios em processo de degeneração (células FJC+) nas regiões hipocâmpais avaliadas. No grupo SE, foi detectada degeneração hipocampal em poucos animais, principalmente no hipocampo anterior que, no entanto, apresentou maior degeneração do hilo do giro denteado. O hipocampo posterior apresentou as regiões com maior degeneração e maior número de animais afetados. No entanto, esta comparação não alcançou o nível de significância estatística devido ao pequeno número de animais com degeneração hipocampal. No hipocampo posterior, as regiões de CA1, CA4 e hilo do giro denteado foram mais afetadas, com maior degeneração na porção ventral. No entanto, constatamos que a densidade neuronal da porção ventral de CA4 e Hilo no hipocampo de um rato normal é maior se comparada à dorsal, o que também poderia explicar esta diferença (Figura 16).

A degeneração neuronal foi similar nos lados direito e do lado esquerdo, do nível anterior para o posterior, com exceção da degeneração do hilo dorsal posterior, que foi maior no nível anterior e do lado direito e no hilo ventral do hipocampo posterior, que foi maior que o hilo dorsal (*Mann Whitney Rank Sum*, $p < 0,02$) (Figura 16). Houve correlação positiva entre a duração do SE total (duração total de todas as crises antes e após o DZP) e a degeneração neuronal em CA1 dorsal posterior direito, CA1 dorsal posterior esquerdo e CA1 ventral posterior direito (Figura 15).

Com relação à perda neuronal hipocampal, quantificada pelo número de neurônios normais remanescentes, os animais do grupo controle apresentaram todos os neurônios com morfologia normal nas camadas das regiões hipocâmpais avaliadas. De maneira geral, o grupo SE apresentou diminuição da densidade de neurônios normais com relação ao controle (*Teste t Student*, $p < 0,05$, Figura 17 e 18).

Na análise comparativa dentro do grupo SE, a densidade neuronal entre os lados direito e esquerdo nas regiões do hipocampo foi similar, com exceção da região de CA4 ventral, onde foi observada maior diminuição da densidade neuronal (perda neuronal) do lado direito do que no lado esquerdo (Mann Whitney Rank Sum, $p = 0,03$, Fig 17).

A densidade neuronal entre os níveis anteriores e posteriores também foi similar entre os animais do grupo SE, com exceção de CA3 dorsal, que apresentou menor densidade neuronal (maior perda) no nível posterior e lado esquerdo (*Teste t Student*, $p = 0,009$). A densidade neuronal do hilo posterior esquerdo foi maior no nível posterior (*Teste t Student*, $p = 0,003$ Figura 17).

Na comparação entre as regiões dorsais-ventrais no hipocampo posterior, houve maior perda neuronal na região de CA1 ventral, do lado direito, se comparada com a região dorsal (*Teste t Student*, $p = 0,02$) e CA4 dorsal do lado esquerdo, com relação à ventral (Mann Whitney Rank Sum, $p = 0,005$, Figura 17).

A duração do SE (SE parcial total – soma das crises parciais antes e após o DZP – e SE total) foi correlacionada negativamente com o número de neurônios normais nas regiões de CA1 dorsal posterior direito, CA1 ventral posterior direito e CA3 ventral posterior direito e esquerdo (Figura 19), indicando que a maior perda neuronal está associada à maior duração do SE.

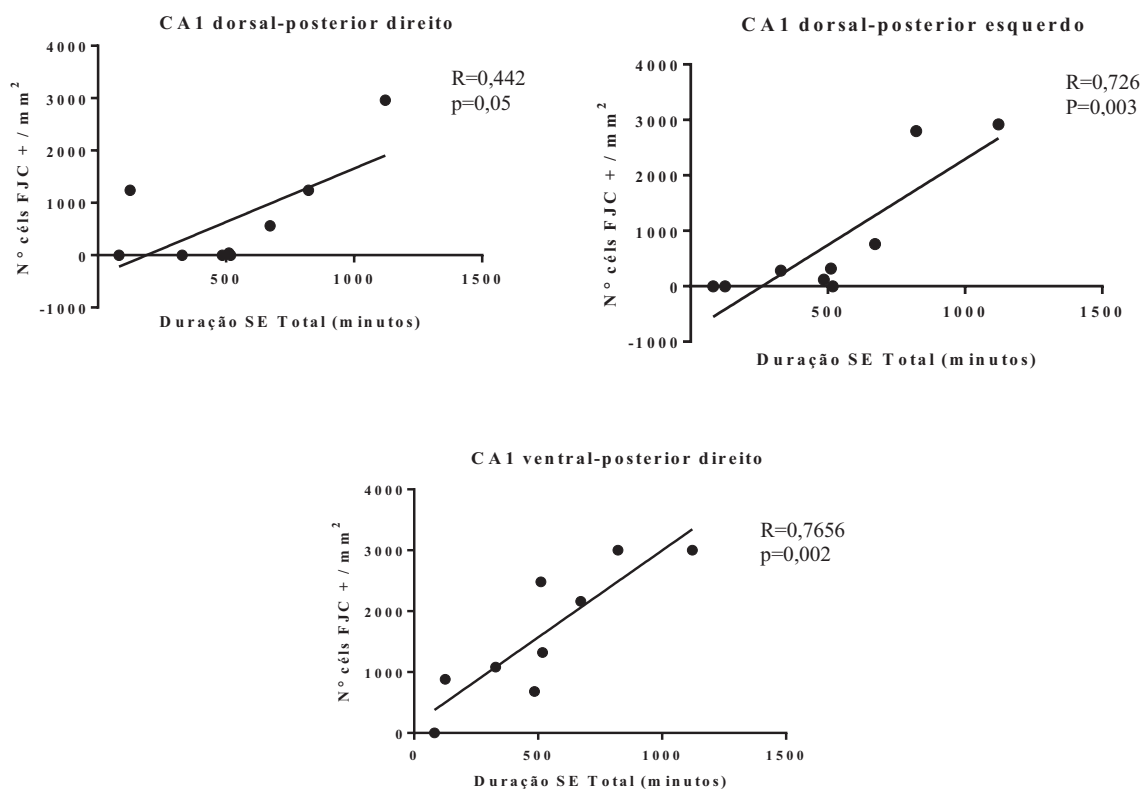


Figura 15. Regressão linear mostrando correlação positiva entre a duração do SE total (em minutos) e número de neurônios em degeneração de CA1 do hipocampo nos animais do grupo 24 horas, em CA1 dorsal posterior direito (Pearson, $R = 0,442$ e $p = 0,05$), CA1 dorsal posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,726$ e $p = 0,003$) e CA1 ventral posterior direito (Pearson, $R = 0,756$ e $p = 0,002$), indicando que a maior duração do SE aumenta a degeneração neuronal.

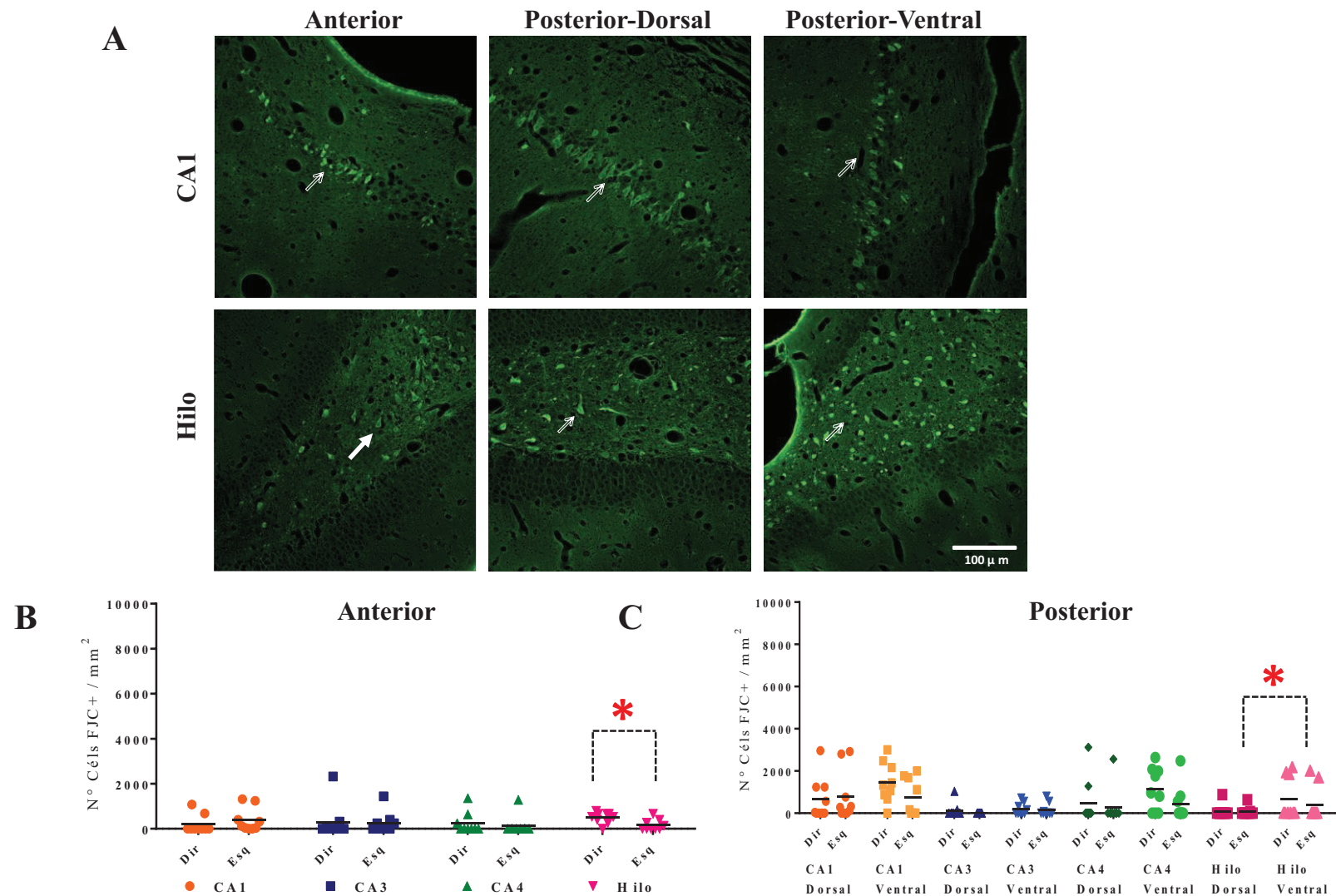


Figura 16. A) Seções coradas por FJC representativas das regiões de CA1 e hilo, do hipocampo, mostrando as diferenças entre a degeneração neuronal entre os níveis anterior e posterior/ dorsal e ventral. As setas indicam neurônios em degeneração. Imagens do hipocampo foram adquiridas em aumento de 40x ao microscópio de fluorescência. B e C) Número de neurônios em degeneração do hipocampo por mm^2 , 24 horas após a injeção de pilocarpina na amígdala, na porção anterior (B) e posterior (C) do hipocampo. Todos os animais do grupo controle apresentaram a contagem de neurônios em degeneração igual a zero. As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; CA1: Corno de Amon 1; CA3: Corno de Amon 3; CA4: Corno de Amon 4. Asteriscos vermelhos indicam diferenças que foram estatisticamente significantes entre o grupo SE.

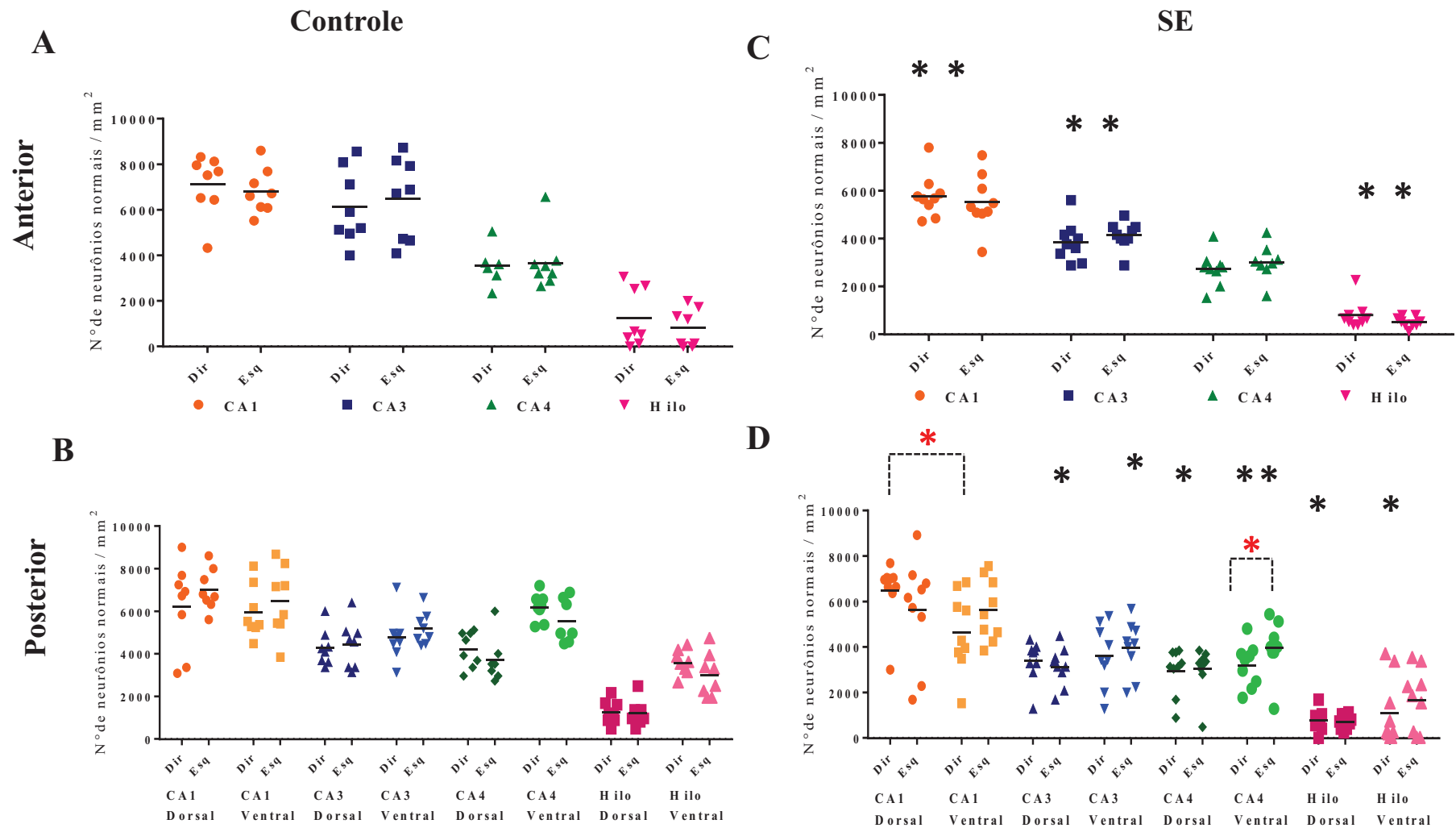


Figura 17. Contagem de neurônios normais remanescentes do hipocampo dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 24 horas após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; CA1: Corno de Amon 1; CA3: Corno de Amon 3; CA4: Corno de Amon 4. Asteriscos pretos indicam diminuição da densidade neuronal que foi significativa com relação ao controle; asteriscos vermelhos indicam diferenças que foram estatisticamente significantes dentro do grupo SE.

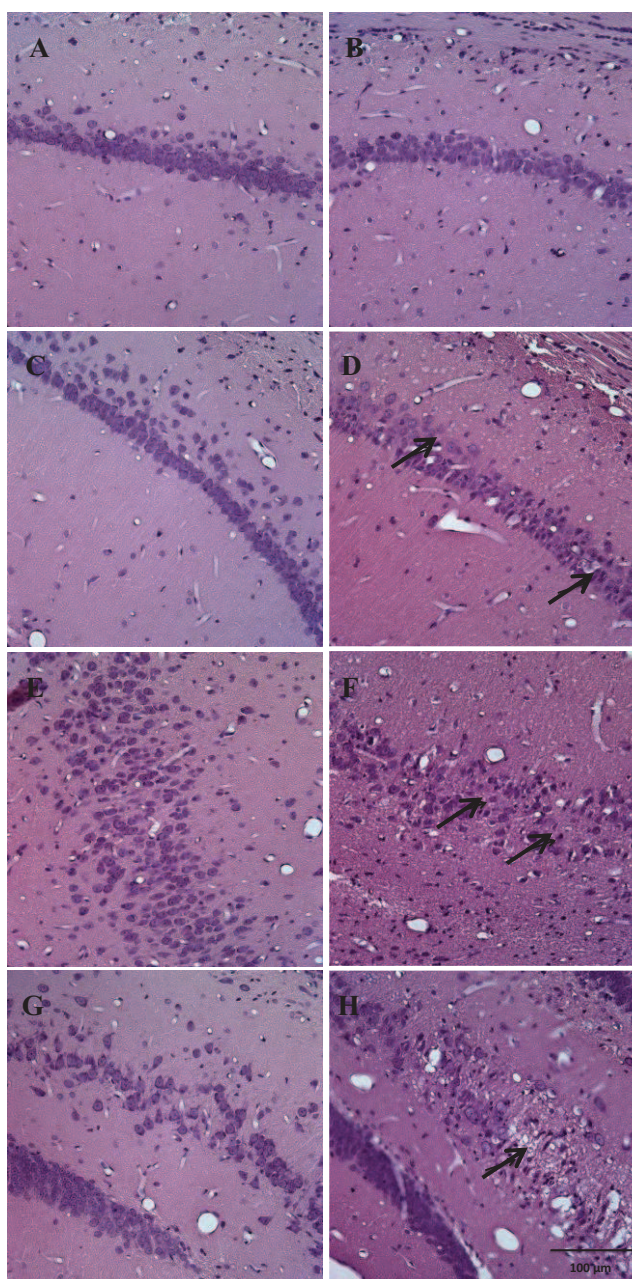


Figura 18. Secções coradas por HE do hipocampo de animais do grupo 24 horas, comparando-se Ctrl (à esquerda) e SE (à direita). A e B) CA1 anterior; C e D) CA1 dorsal posterior; E e F) CA1 ventral posterior; G e H) CA4 dorsal posterior. As setas pretas indicam neurônios em processo de morte neuronal. Imagens obtidas em aumento de 40x ao microscópio óptico.

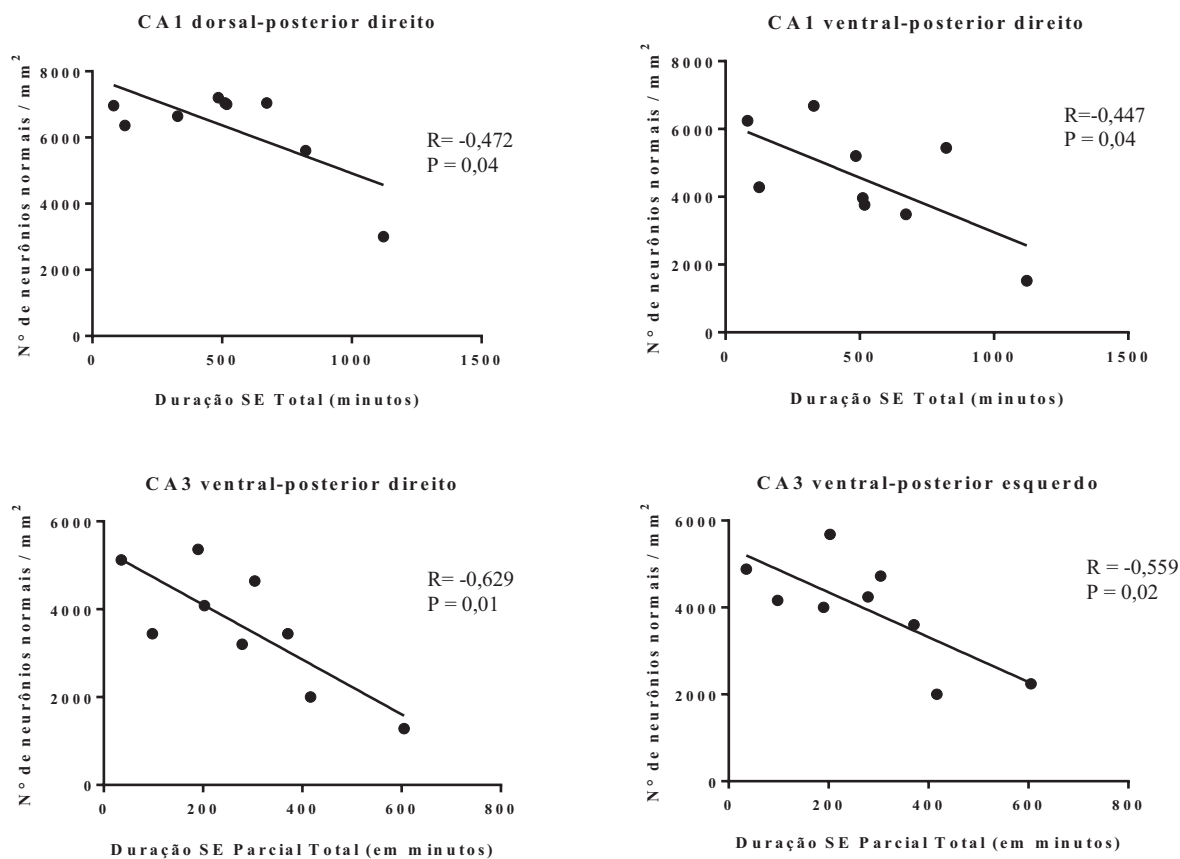


Figura 19. Regressão linear mostrando correlação negativa entre a duração do SE (total e parcial total, antes e após o DZP) e o número de neurônios normais nas regiões em CA1 dorsal posterior direito (Pearson, $R = -0,472$ e $p = 0,04$), CA1 ventral posterior direito (Pearson, $R = -0,447$ e $p = 0,04$), CA3 ventral posterior direito (Pearson, $R = -0,629$ e $p = 0,01$) e CA3 ventral posterior esquerdo (Pearson, $R = -0,559$ e $p = 0,02$), indicando que a maior perda neuronal está associada à maior duração do SE.

3.3.1.2 Grupo 30 dias

Os animais do grupo controle não apresentaram neurônios em processo de degeneração (células FJC+) nas regiões hipocâmpais avaliadas. Em geral, a degeneração neuronal do hipocampo foi maior no grupo 30 dias que no grupo 24 horas. Assim como no grupo 24 horas, os animais do grupo SE apresentaram degeneração neuronal em todas as estruturas analisadas, mas também de forma heterogênea, com cinco animais apresentando um alto padrão de degeneração neuronal (que também apresentaram maior frequência de CRE) e outros com pouca degeneração. Nos animais com maior degeneração neuronal, todas as regiões foram afetadas, principalmente CA1. A degeneração hipocâmpal das regiões entre o lado direito e esquerdo, entre os níveis anterior e posterior e entre as regiões dorso-ventrais posteriores foram similares, apresentando intensa degeneração neuronal (*Teste t Student*, $p > 0,05$), especialmente nos animais com maior número de CRE (Figura 20). Estes animais também apresentaram padrão de degeneração bilateral na maioria das regiões analisadas. Interessantemente, foi observado alto padrão de degeneração neuronal na camada de células granulares do giro denteado, geralmente resistente à degeneração neuronal, em três animais que apresentaram SE grave e alto número de CRE (dados não mostrados).

Neste grupo, não houve correlação entre a degeneração neuronal e a gravidade do SE. No entanto, a degeneração neuronal foi correlacionada com o número e gravidade das CRE, nas regiões de CA1 anterior e CA1 posterior-ventral, ambos nos lados direito e esquerdo (Figura 23).

Com relação a perda neuronal, os animais do grupo controle apresentaram todos os neurônios de morfologia normal nas camadas de regiões hipocâmpais avaliadas. O grupo SE apresentou menor densidade de neurônios normais do que o grupo Ctrl nas regiões analisadas, que foi significativa na maioria das regiões (*Teste t student*, $p < 0,05$, Figura 21). No grupo SE, a perda neuronal foi similar, nos lados direito e esquerdo, com exceção do hilo anterior, que apresentou maior perda neuronal do lado direito (*Mann Whitney Rank Sum*, $p = 0,02$). Comparando-se a densidade neuronal entre os níveis anterior e posterior, houve maior perda neuronal no nível posterior do hipocampo em CA3 (*Teste t Student*, $p = 0,04$) e na lâmina inferior do giro denteado (*Teste t Student*, $p = 0,03$, dados não mostrados), ambos do lado direito. No hipocampo posterior, o hilo direito e esquerdo ventrais apresentaram maior densidade neuronal se comparado aos dorsais (*Teste t Student*, $p < 0,03$) (Figura 28). No entanto, constatamos que há diferenças na densidade neuronal normal entre os níveis dorsal e ventral do hilo e CA4 do hipocampo posterior. Adicionalmente, apenas cinco animais do grupo SE apresentaram maior perda neuronal nas porções póstero-ventrais do hipocampo posterior, que foi associado a alta frequência de CRE (Figura 21).

A duração do SE generalizado foi correlacionada negativamente com o número de neurônios normais do hilo anterior direito, e a duração do SE parcial total teve correlação negativa com o número de neurônios normais em CA1 ventral esquerdo (Figura 24). Assim como na degeneração neuronal, a perda neuronal no grupo 30 dias também foi estatisticamente associada com a frequência de CRE em CA1 anterior esquerdo, CA1 dorsal posterior esquerdo, CA1 ventral posterior direito e Hilo ventral esquerdo, indicando que o maior número de CRE está associado à maior perda neuronal nessas estruturas (Figura 25).

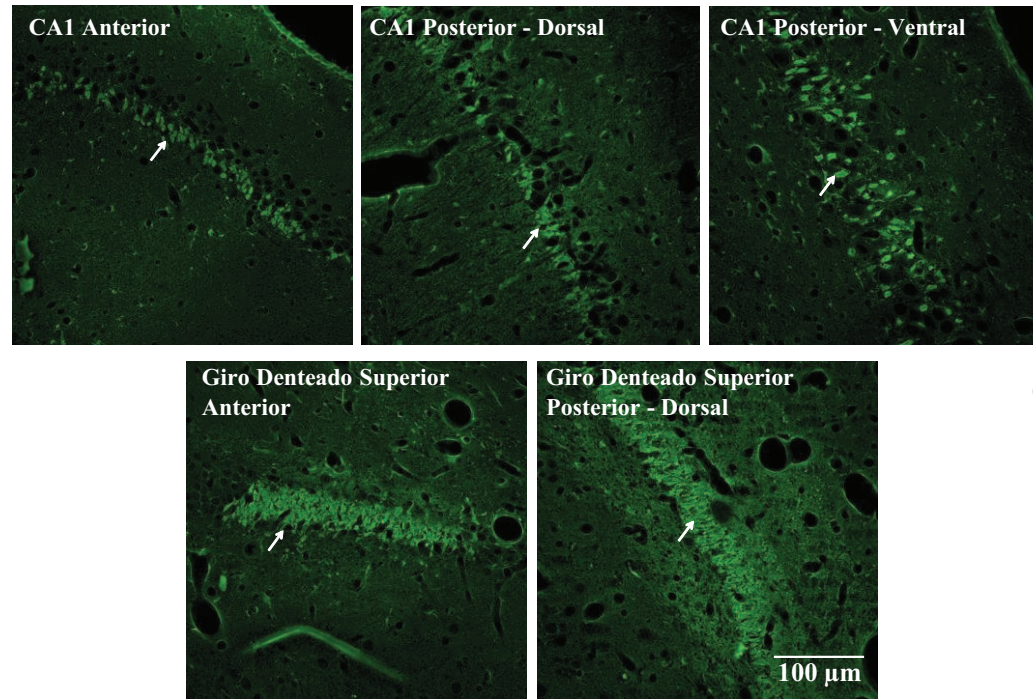
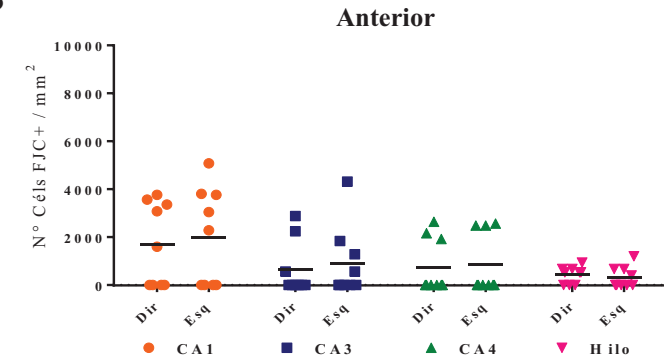
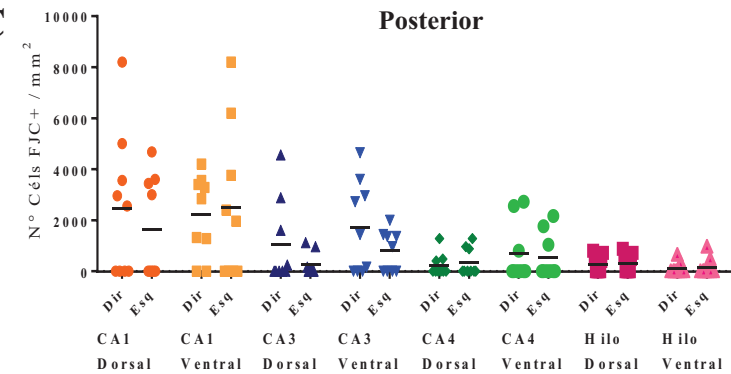
A**B****C**

Figura 20. A) Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal do hipocampo de um rato do grupo 30 dias que apresentou alta frequência de CRE, mostrando as regiões de CA1 do hipocampo anterior e posterior (dorsal e ventral) e a degeneração das células granulares do giro denteado do hipocampo anterior e posterior. A degeneração neuronal entre o hipocampo anterior e posterior não apresentou diferenças significativas (teste *t Student*, $p < 0,05$). As setas indicam os neurônios em degeneração. Imagens do hipocampo foram adquiridas em aumento de 40x ao microscópio de fluorescência. **B e C)** Número de neurônios em degeneração do hipocampo por mm^2 , 30 dias após a injeção de pilocarpina na amígdala, no nível anterior (B) e posterior (C). Todos os animais do grupo controle apresentaram a contagem de neurônios em degeneração igual a zero. As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; CA1: Corno de Amon 1; CA3: Corno de Amon 3; CA4: Corno de Amon 4.

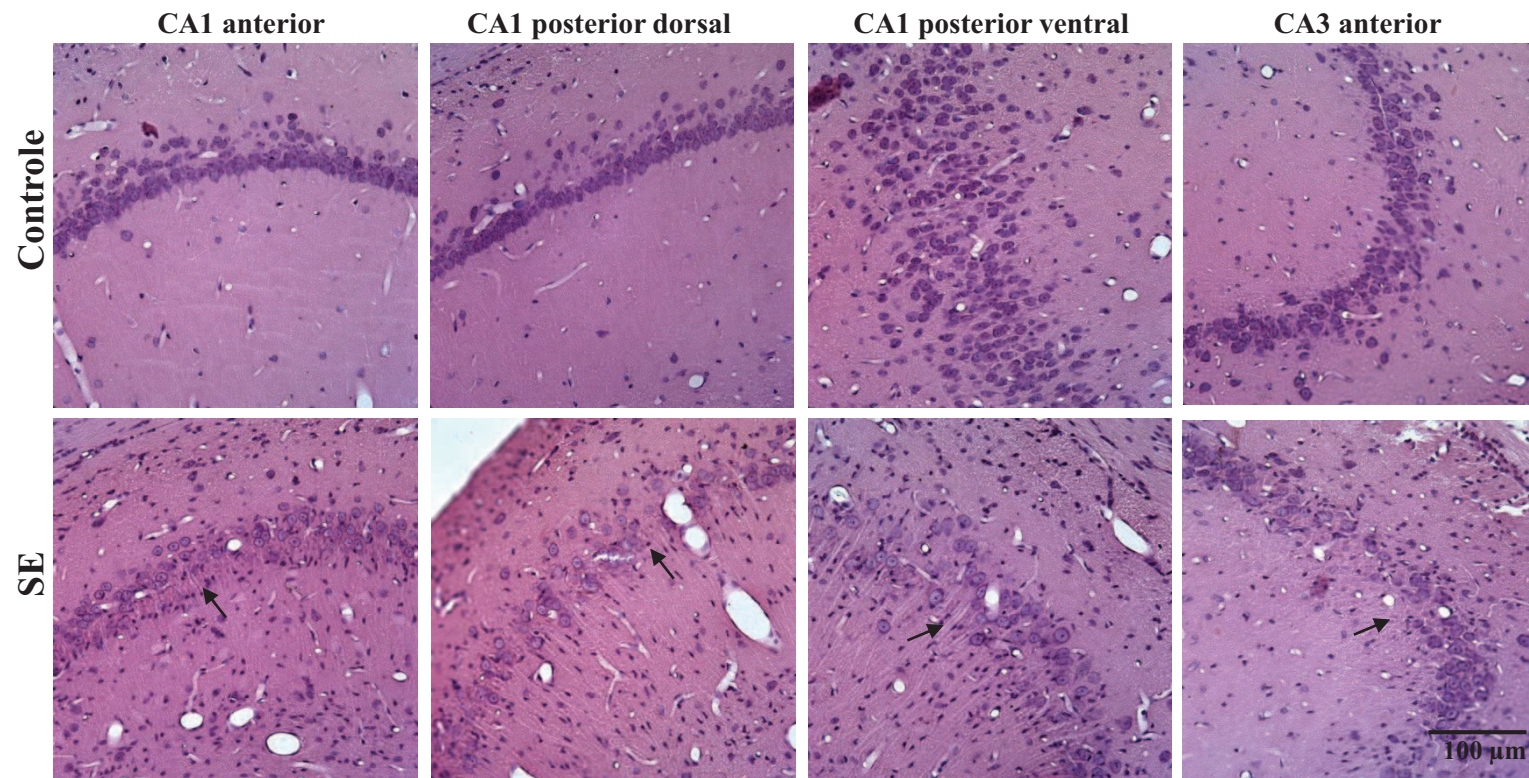


Figura 22. A) Secções coradas por HE representativas do hipocampo do grupo 30 dias, mostrando a perda neuronal comparando-se do grupo SE com relação ao Ctrl (*Teste t student*, $p < 0,05$). As setas pretas indicam perda neuronal. Imagens obtidas em aumento de 40x ao microscópio óptico.

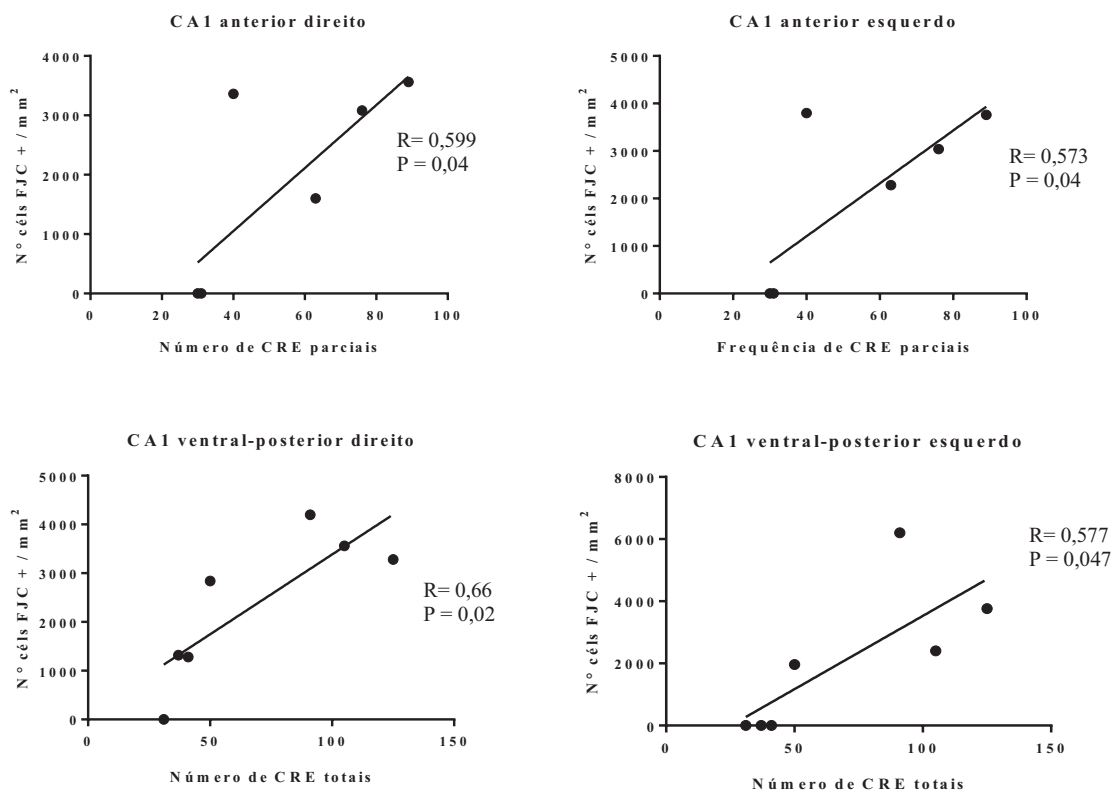


Figura 23. Regressão linear mostrando correlação positiva entre o número de CRE parciais e totais e a degeneração neuronal de CA1 anterior direito (Pearson, $R = 0,599$ e $p = 0,04$), CA1 anterior esquerdo (Pearson, $R = 0,573$ e $p = 0,04$), CA1 ventral posterior direito (Pearson, $R = 0,66$ e $p = 0,02$) e CA1 ventral posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,577$ e $p = 0,047$) e o número de CRE totais (parciais + generalizadas), indicando que o maior número de CRE está relacionada ao aumento da degeneração neuronal.

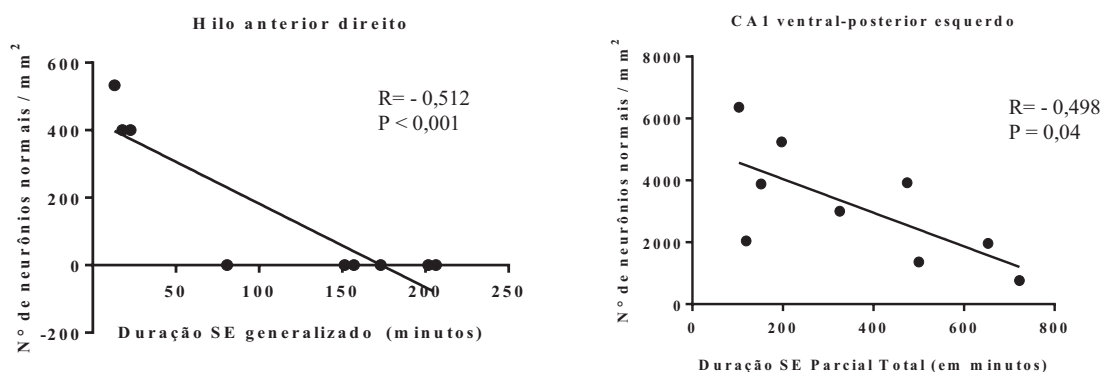


Figura 24. Regressão linear mostrando correlação negativa entre o número de neurônios normais e a duração do SE generalizado do hilo anterior direito (Pearson, $R = -0,512$ e $p < 0,001$) e do SE parcial total (crises parciais antes e após o DZP) com CA1 ventral posterior esquerdo (Pearson, $R = -0,498$ e $p = 0,04$) nos animais do grupo 30 dias, indicando que a maior perda neuronal está associada à maior duração do SE.

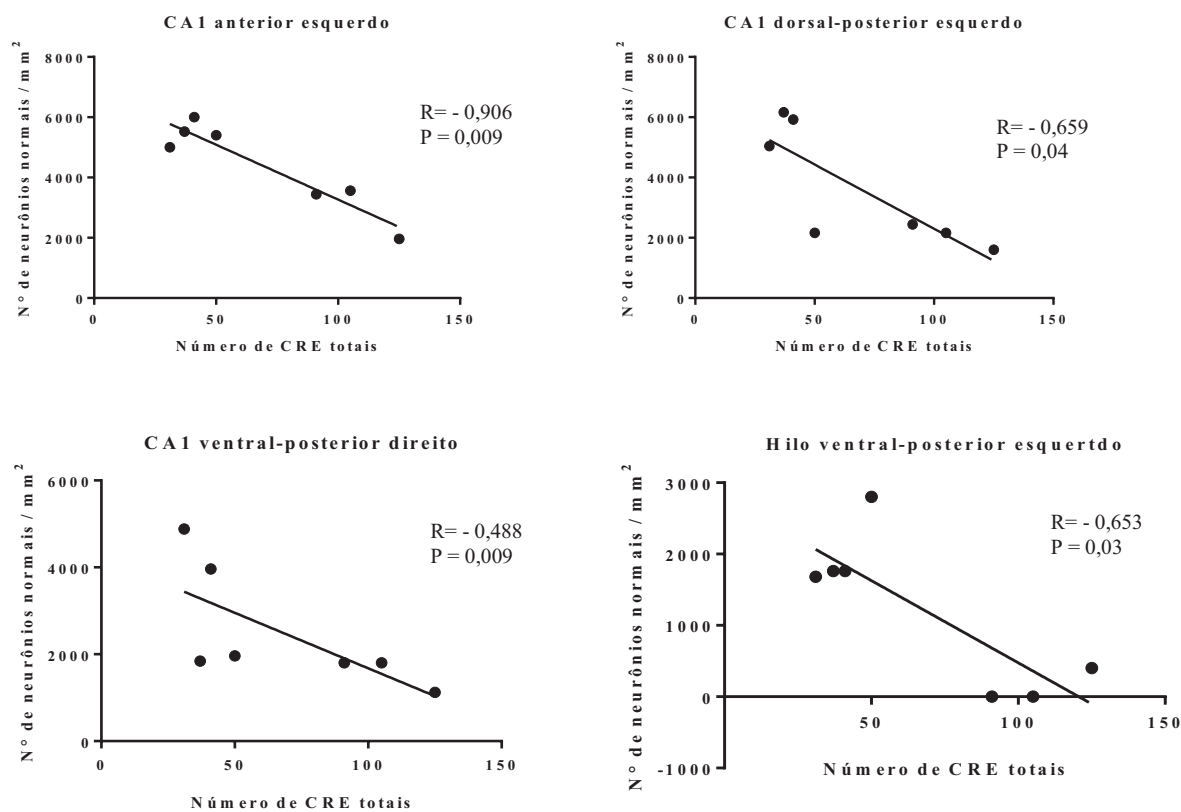


Figura 25. Regressão linear mostrando correlação negativa entre o número de neurônios normais do hipocampo e o número de CRE totais em CA1 anterior esquerdo (Pearson, $R = -0,906$ e $p = 0,009$), CA1 dorsal posterior esquerdo (Pearson, $R = -0,659$ e $p = 0,04$), CA1 ventral posterior direito (Pearson, $R = -0,488$ e $p = 0,009$) e Hilo ventral posterior esquerdo (Pearson, $R = -0,653$ e $p = 0,03$).

3.3.2 Degeneração e Perda Neuronal da Amígdala e Núcleo Dorsal Endopiriforme

3.3.2.1 Grupo 24 horas

Os animais do grupo controle não apresentaram neurônios em processo de degeneração (células FJC+) nos núcleos da amígdala avaliados. No grupo SE, os núcleos mais afetados foram os mediais e mediais corticais da amígdala (BMP, MePV, PMCo) e dorsal-endopiriforme (DEn). De maneira geral, a degeneração da amígdala foi significativamente maior do lado direito (ispilateral à cânula) do que no lado esquerdo, nas seguintes estruturas: BMP anterior e posterior, MePV (anterior) e PMCo (posterior), LaVM, BLA posterior e também DEn anterior e posterior (*Mann Whitney Rank Sum*, $p < 0,05$, Figura 26). Não encontramos diferenças na degeneração neuronal entre os níveis anterior e posterior, com exceção de LaVM direito, que apresentou maior degeneração no nível posterior na maioria dos animais (*teste t Student*, $p = 0,04$). Foi encontrada correlação entre a duração do SE (SE Parcial total e SE Total) e a degeneração neuronal de BMP posterior direito e esquerdo (Figura 28B).

Com relação a perda neuronal, os animais do grupo controle apresentaram todos os neurônios de morfologia normal nos núcleos amigdaloides analisados. Os animais do grupo SE apresentaram diminuição da densidade neuronal com relação aos controles (*Teste t student*, $p < 0,05$, Figura 27 e 28A). Todos os núcleos da amígdala apresentaram perda neuronal, que foi maior no lado direito do que no lado esquerdo (*teste t Student*, $p < 0,05$), com exceção do núcleo BLA, onde a diferença não foi significativa. A densidade neuronal, dos níveis anterior e posterior, nos núcleos avaliados nos dois grupos foi similar (*Teste t student*, $p > 0,05$, Fig. 27). Foi encontrada correlação entre a duração do SE parcial e a degeneração neuronal de DEn posterior esquerdo (Fig. 28C).

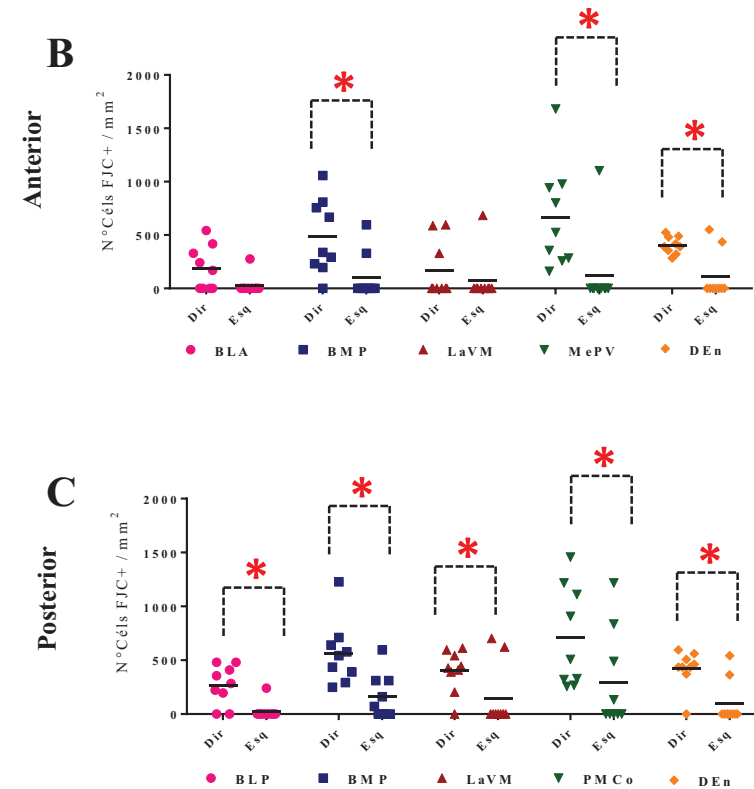
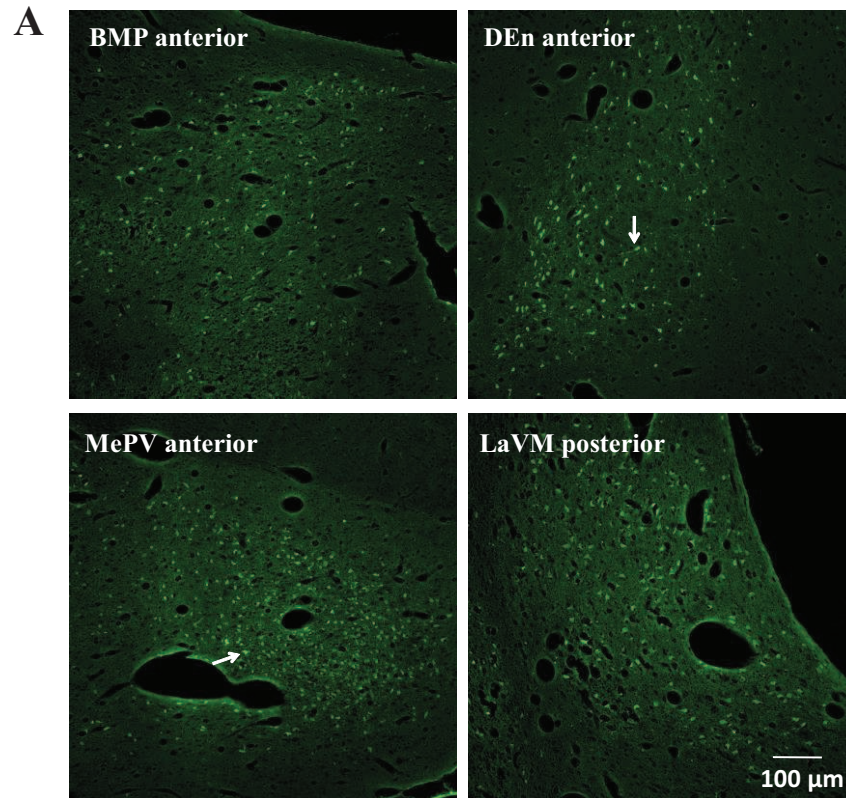


Figura 26. A) Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal dos núcleos da amígdala e núcleo dorsal endopiriforme. LaVM apresentou maior degeneração no nível posterior (teste *t Student*, $p < 0,04$). As setas indicam neurônios em degeneração. **B e C**) Número de neurônios em degeneração dos núcleos da amígdala por mm², 24 horas após a injeção de pilocarpina na amígdala, na porção anterior (B) e posterior (C). Todos os animais do grupo controle apresentaram a contagem de neurônios em degeneração igual a zero. As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; BLA – núcleo amígdaloide basolateral anterior; BLP – núcleo amígdaloide basolateral posterior; BMP – núcleo amígdaloide basomedial posterior; LaVM – núcleo amígdaloide lateral ventromedial; MePV – núcleo amígdaloide medial posterodorsal; PMCo – Núcleo amígdaloide pótero-medial cortical; DEn – núcleo dorsal endopiriforme. Asteriscos vermelhos indicam que a degeneração do lado direito foi significativamente maior do que o lado esquerdo (Mann Whitney Rank Sum, $p < 0,05$).

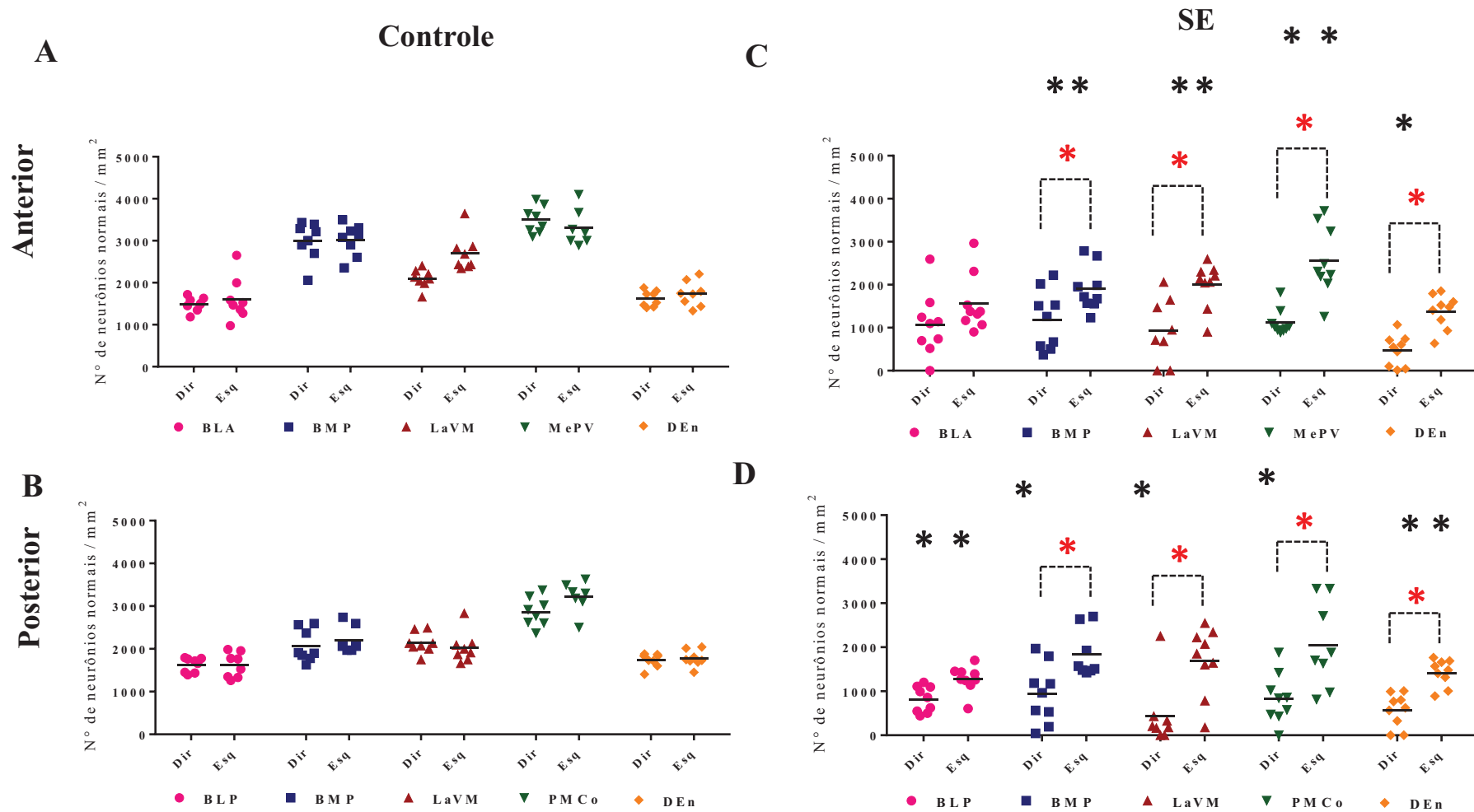


Figura 27. Contagem de neurônios normais remanescentes dos núcleos da amígdala dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 24 horas após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; BLA – núcleo amígdaloide basolateral anterior; BLP – núcleo amígdaloide basolateral posterior; BMP – núcleo amígdaloide basomedial posterior; LaVM – núcleo amígdaloide lateral ventromedial; MePV – núcleo amígdaloide medial posterodorsal; PMCo – Núcleo amígdaloide póstero-medial cortical; DEn – núcleo dorsal endopiriforme. Asteriscos pretos indicam diminuição da densidade neuronal que foi significativa com relação ao controle; Asteriscos vermelhos indicam que a perda neuronal do lado direito foi significativamente maior do que o lado esquerdo (Mann Whitney Rank Sum, $p < 0,05$).

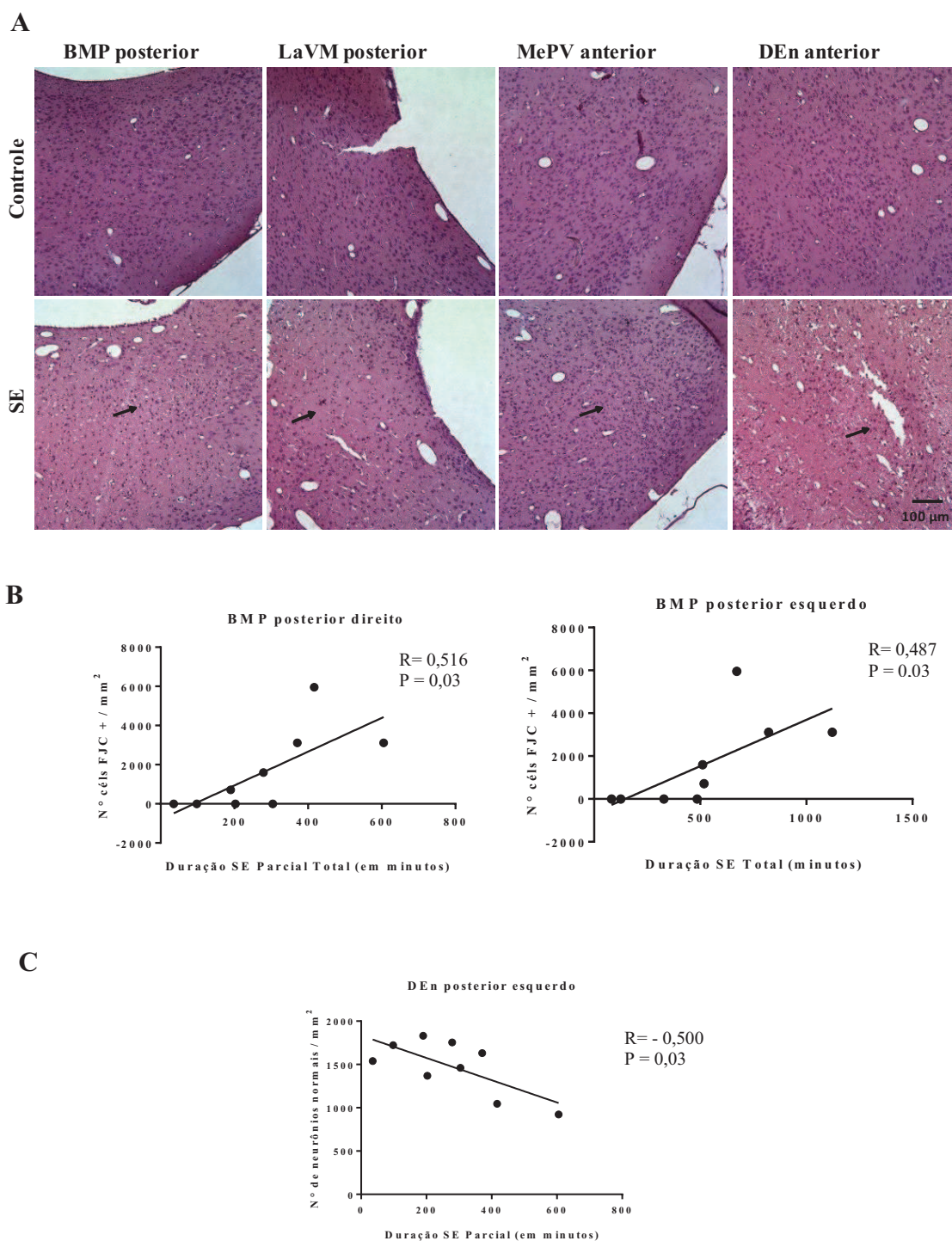


Figura 28. A) Secções coradas por HE dos núcleos da amígdala de animais do grupo 24 horas, comparando-se SE e Ctrl. B) Regressão linear mostrando correlação positiva entre a duração do SE parcial total (antes e após DZP) e SE total (todas as crises antes e após o DZP) com número de neurônios em degeneração de BMP posterior direito (Pearson, $R = 0,516$ e $p = 0,03$) e BMP posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,487$ e $p = 0,03$) nos animais do grupo 24 horas. C) Regressão linear mostrando correlação negativa entre a duração do SE parcial e número de neurônios normais de DEn posterior direito (Pearson, $R = -0,500$ e $p = 0,03$), em animal do grupo 24 horas, comparando-se SE e Ctrl. As setas pretas indicam perda neuronal.

3.3.2.2 Grupo 30 dias

Os animais do grupo controle não apresentaram neurônios em processo de degeneração (células FJC+) nos núcleos da amígdala avaliados (Figura 29). Neste grupo, os núcleos da amígdala que mais sofreram degeneração foram BMP posterior, LaVM posterior, PMCo posterior. O núcleo endopiriforme dorsal (DEn), anterior e posterior, também sofreu degeneração importante. De maneira geral, embora o nível posterior tenha apresentado maior degeneração com relação ao anterior, não houve diferença estatística devido a apenas 5 dos 9 animais terem apresentado degeneração neuronal na maioria dos núcleos, sendo que os demais não apresentaram nenhuma degeneração. Estes 5 animais apresentaram maior número de CRE. Como exceção, o núcleo LaVM, assim como no grupo 24 horas, apresentou degeneração significativamente maior no nível posterior (*Mann Whitney Rank Sum*, $p = 0,03$, Figura 29). Não houve correlação estatística entre a duração do SE ou número de CRE com a degeneração neuronal dos núcleos da amígdala.

Com relação a perda neuronal, os animais do grupo controle apresentaram todos os neurônios de morfologia normal nos núcleos amigdaloides analisados (Figura 30). O grupo SE apresentou menor densidade de neurônios normais com relação ao Ctrl (*Teste t student*, $p < 0,05$, Figura 30). Entre o grupo SE, assim como na degeneração neuronal, o número de neurônios normais foi bastante heterogêneo devido a poucos animais terem apresentado elevada perda neuronal com relação aos demais, que foi consequente do número de CRE apresentadas (Figura 30)

Com relação aos dados significativos, comparando-se nível anterior com posterior, encontramos que PMCo posterior direito e BLP esquerdo apresentaram maior

perda se comparados ao nível anterior (*Teste t Student*, $p < 0,03$) e, comparando-se lado direito e esquerdo, MePV apresentou maior perda do lado esquerdo (*Teste t Student*, $p < 0,03$, Figura 30).

Neste grupo, o número de neurônios normais foi correlacionado negativamente com a duração do SE nos núcleos LaVM posterior esquerdo e DEn anterior esquerdo (*Figura 31B-C*) e MePV anterior direito (*Pearson*, $p = 0,04$ e $R = - 0,4203$, SE generalizado total, dados não mostrados), indicando que a maior perda neuronal está associado à maior duração do SE.

Além disso, houve correlação entre a frequência de CRE e a perda neuronal da amígdala em BLP posterior direita (CRE parciais, generalizadas e totais), LaVM posterior esquerdo (CRE parciais e generalizadas e DEn anterior esquerdo (CRE parciais e totais) (*Figura 32*).

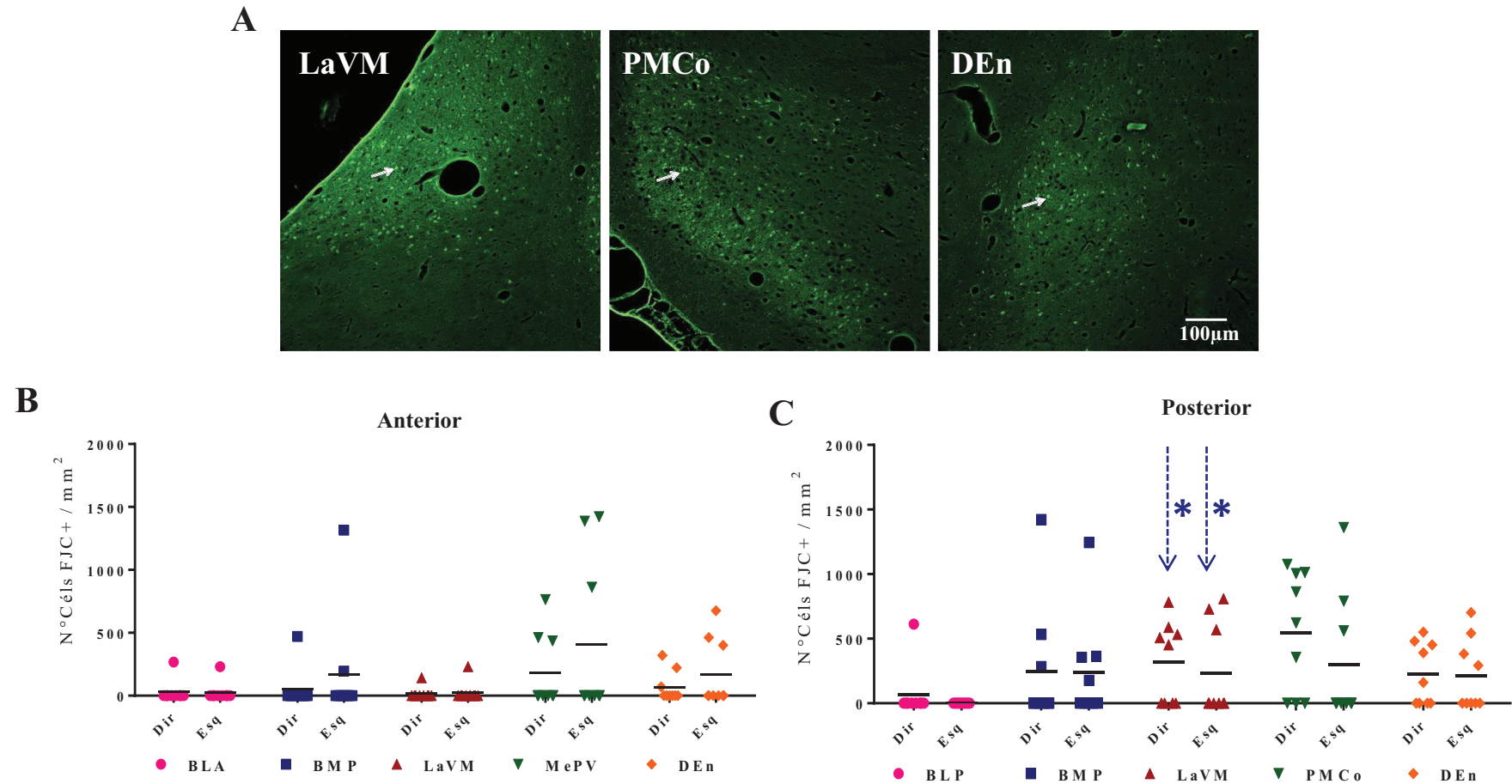


Figura 29. A) Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal dos núcleos da amígdala e núcleo endopiriforme dorsal de um rato que apresentou alta frequência de CRE, do grupo 30 dias. O núcleo LaVM posterior apresentou maior degeneração no nível posterior (teste *t Student*, $p < 0,03$). As setas indicam neurônios em degeneração. Imagens foram adquiridas em aumento de 20x ao microscópio de fluorescência. B e C) Número de neurônios em degeneração dos núcleos da amígdala por mm^2 , 30 dias após a injeção de pilocarpina na amígdala, mostrando o nível anterior (B) e posterior (C). Todos os animais do grupo controle apresentaram a contagem de neurônios em degeneração igual a zero. Setas azuis indicam que a degeneração foi significativamente maior no nível posterior com relação ao anterior.

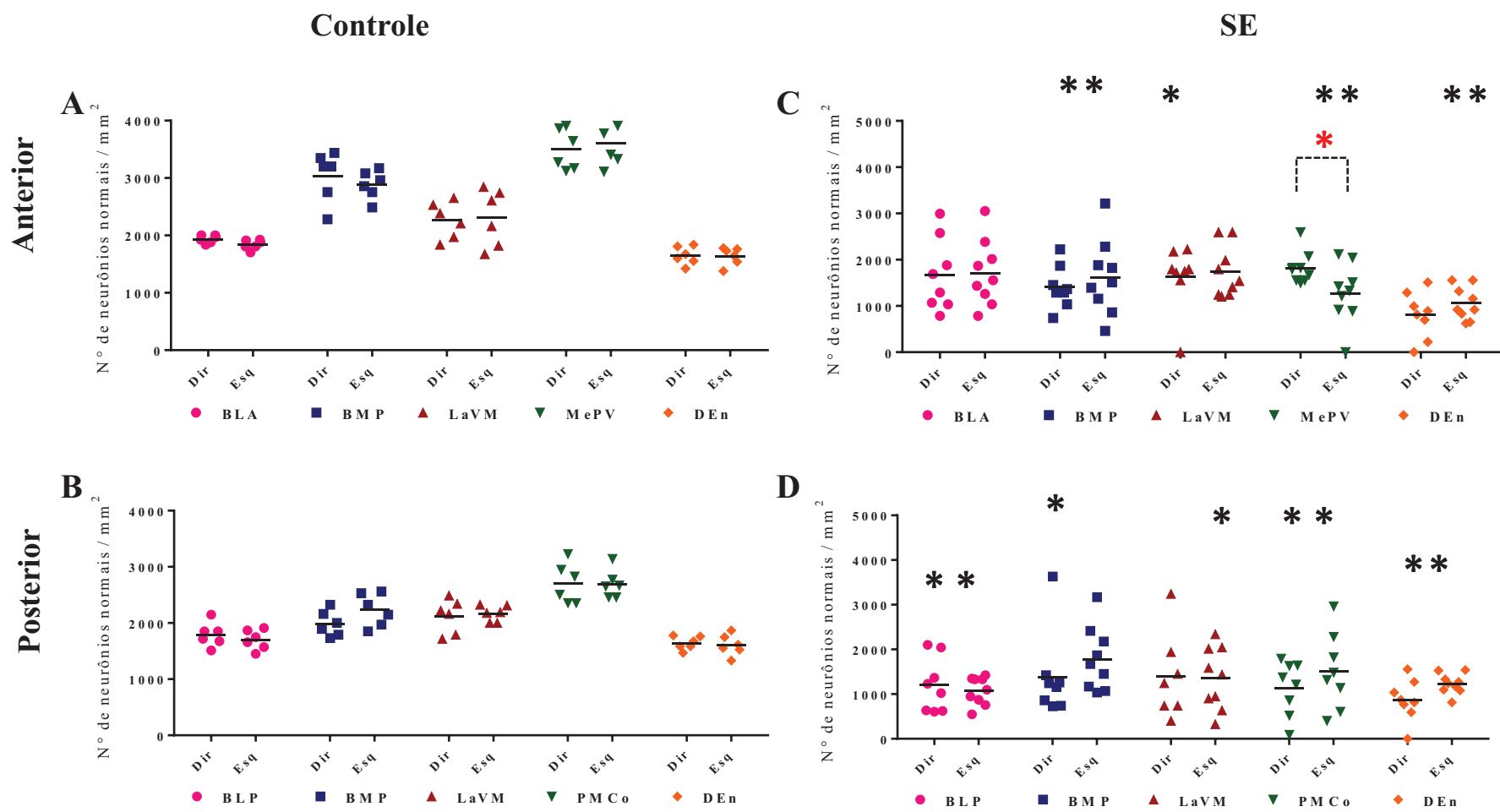


Figura 30. Contagem de neurônios normais remanescentes dos núcleos da amígdala dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 30 dias após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; BLA – núcleo amigdalóide basolateral anterior; BLP – núcleo amigdalóide basolateral posterior; BMP – núcleo amigdalóide basomedial posterior; LaVM – núcleo amigdalóide lateral ventromedial; MePV – núcleo amigdalóide medial posterodorsal; PMCo – Núcleo amigdalóide póstero-medial cortical; DEn – núcleo dorsal endopiriforme. Asteriscos pretos indicam diminuição da densidade neuronal que foi significativa com relação ao controle; asteriscos vermelhos indicam diferenças que foram estatisticamente significantes dentro do grupo SE.

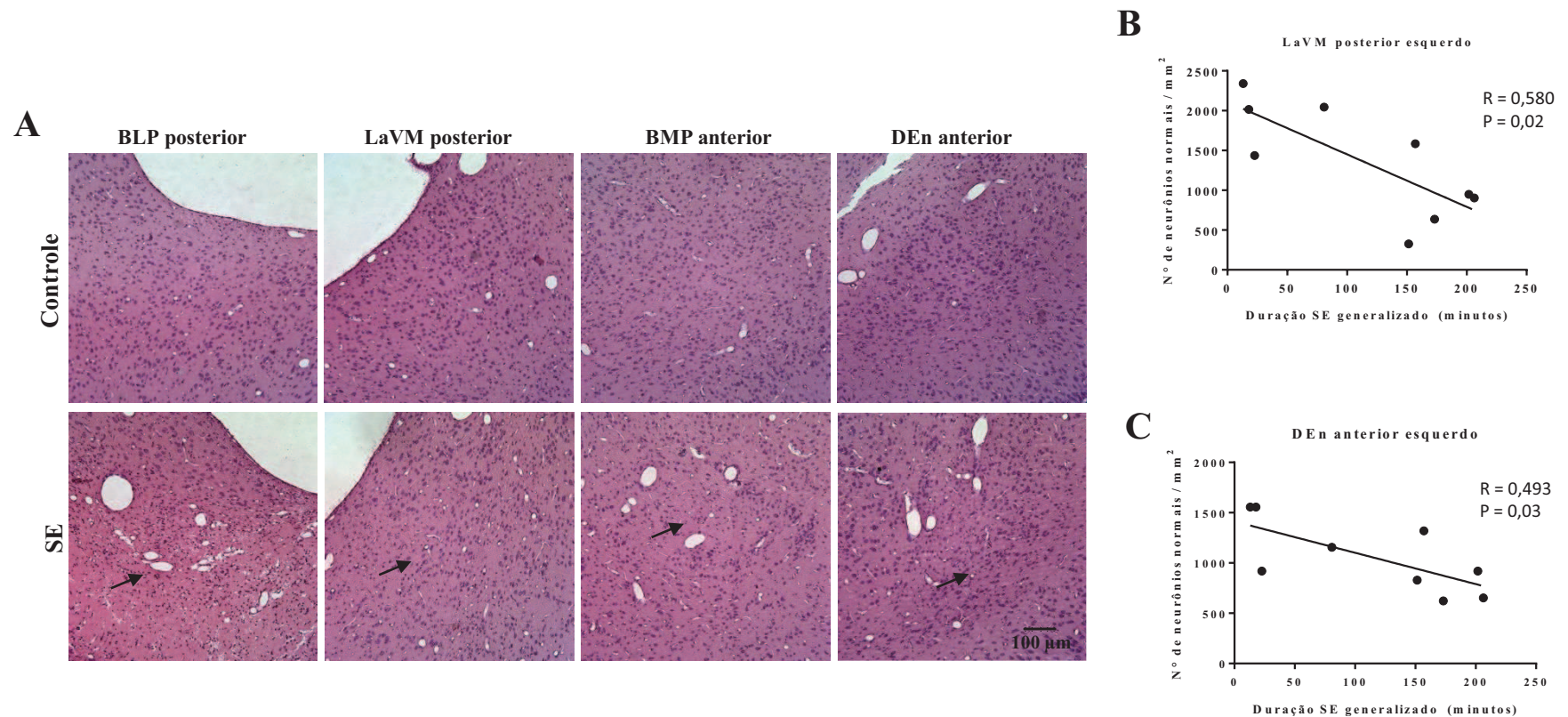


Figura 31. A) Secções coradas por HE representativas dos núcleos da amígdala e núcleo endopiriforme dorsal de animais do grupo 30 dias, comparando-se Ctrl e SE. As setas pretas indicam perda neuronal. Imagens obtidas em aumento de 20x ao microscópio óptico. **B e C)** Regressão linear mostrando correlação negativa entre a duração do SE generalizado e número de neurônios normais de LaVM posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,580$ e $p = 0,02$) e DEn anterior esquerdo (Pearson, $R = 0,493$ e $p = 0,03$) nos animais do grupo 30 dias. As abreviações indicam: BLP: núcleo basolateral posterior; LaVM: núcleo lateral ventro-medial; BMP: núcleo basomedial posterior; Den: núcleo endopiriforme dorsal.

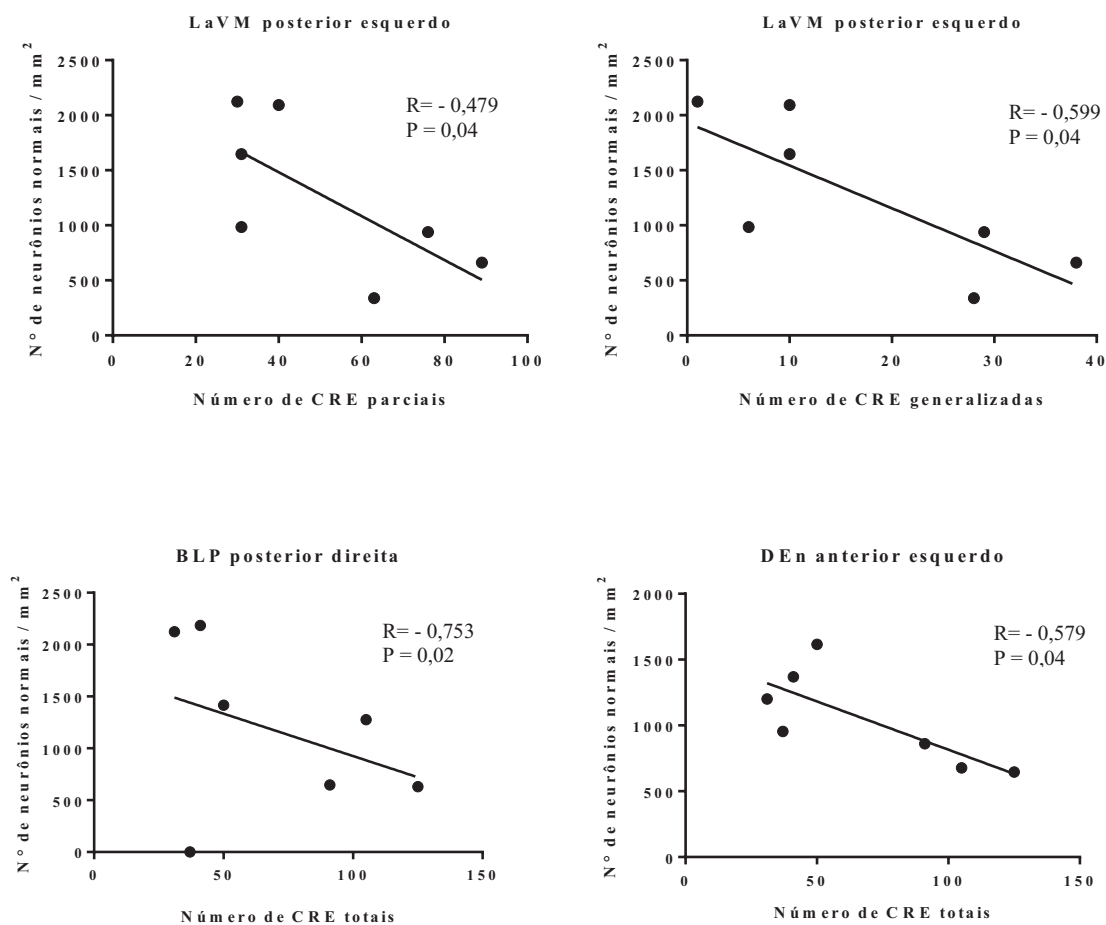


Figura 32. Regressão linear mostrando correlação negativa entre o número de neurônios normais de LaVM posterior esquerdo e o número de CRE parciais e generalizadas (Pearson, $R = -0,479$ e $p = 0,04$ e $R = -0,599$ e $p = 0,04$, respectivamente) e o número de neurônios normais de BLP posterior direita e DEn anterior esquerdo com o número de CRE totais (Pearson, $R = -0,753$ e $p = 0,02$ e $R = -0,579$ e $p = 0,04$, respectivamente).

3.3.3 Degeneração e Perda Neuronal dos córtices Perirrinal e Piriforme

3.3.3.1 Grupo 24 horas

Os animais do grupo controle não apresentaram neurônios em processo de degeneração (células FJC+) nas porções dos córtices perirrinal e piriforme avaliados. Dentro do grupo SE, o padrão de degeneração neuronal do córtex perirrinal em geral foi similar, apresentando maior degeneração do lado direito se comparado ao lado esquerdo (*Mann Whitney Rank Sum*, $p < 0,002$, Figura 33). No córtex piriforme, houve uma maior variabilidade no número de neurônios em degeneração, no entanto, a lesão se restringiu apenas ao lado direito e foi praticamente nula do lado esquerdo (*Mann Whitney Rank Sum*, $p < 0,002$, Figura 33). A degeneração entre os níveis anteriores e posteriores foi similar (*Teste t Student e Mann Whitney Rank Sum*, $p > 0,05$, Figura 33). Não foi encontrada correlação entre a duração do SE e a degeneração neuronal dos córtices perirrinal e piriforme.

Com relação à perda neuronal, os animais do grupo controle apresentaram todos os neurônios de morfologia normal nas porções dos córtices perirrinal e piriforme analisados. Os animais do grupo SE apresentaram diminuição da densidade neuronal com relação aos controles (*Test t Student*, $p < 0,03$, Figura 34).

No grupo SE, assim como na degeneração neuronal, a densidade de neurônios normais, de maneira geral, foi menor do lado direito com relação ao lado esquerdo, que foi significativa nos córtices Perirrinal Dorsal e Ventral e Piriforme Lateral anteriores e Perirrinal Ventral e Piriforme Lateral e Medial posteriores (*Mann Whitney Rank Sum*, $p < 0,04$, Figura 34).

Alguns animais apresentaram perda severa ou total no córtex piriforme, que está

estritamente relacionado com o complexo amigdalóide. A densidade neuronal entre os níveis anteriores e posteriores foi similar (*Teste t Student e Mann Whitney Rank Sum*, $p > 0,1$, Figura 34 e 35A).

Foi encontrada correlação negativa entre o número de neurônios normais do Piriforme Lateral Posterior Direito e a duração do SE generalizado total (Figura 35B), indicando que a maior perda neuronal está associada à maior duração do SE.

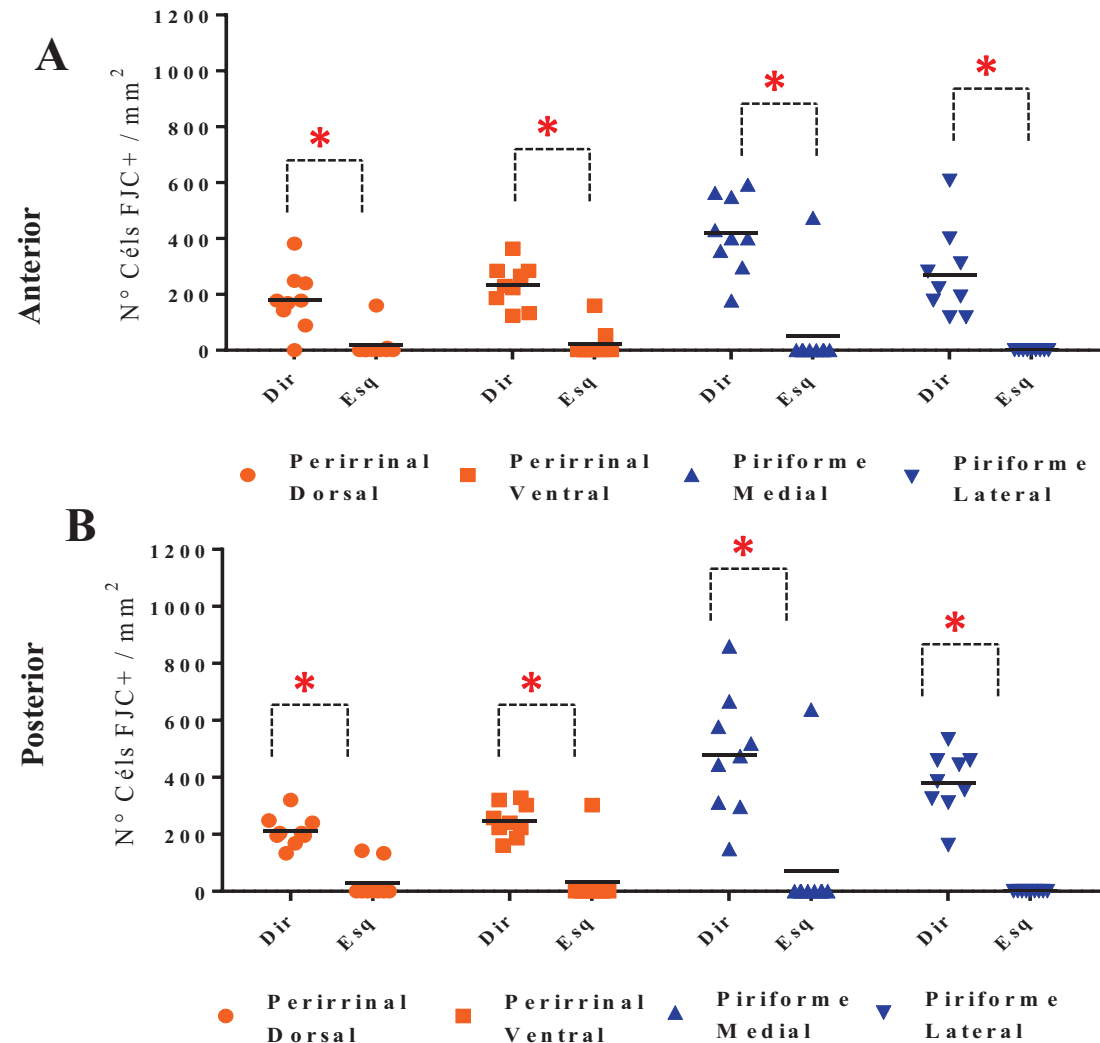
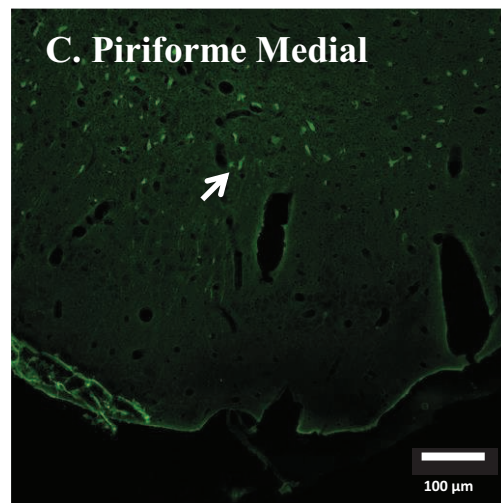
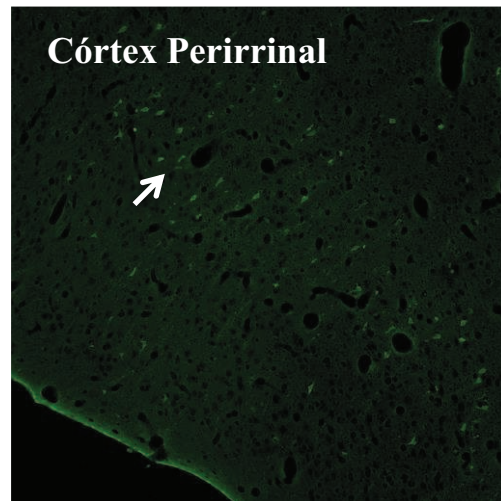


Figura 33. Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal dos córtices perirrinal e piriforme do grupo 24 horas. Não houveram diferenças significativas na degeneração neuronal entre eles. O córtex piriforme medial mostra degeneração na camada III. As setas indicam neurônios em degeneração. Imagens foram adquiridas em aumento de 20x ao microscópio de fluorescência. Os gráficos indicam o número de neurônios em degeneração dos córtices perirrinal e piriforme por mm², 24 horas após a injeção de pilocarpina na amígdala. Todos os animais do grupo controle apresentaram a contagem de neurônios em degeneração igual a zero. **A)** Nível anterior dos córtices perirrinal e piriforme. **B)** Nível posterior dos córtices perirrinal e piriforme. A degeneração do lado direito foi significativamente maior que do lado esquerdo. As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo. Asteriscos vermelhos indicam diferenças que foram estatisticamente significantes dentro do grupo SE.

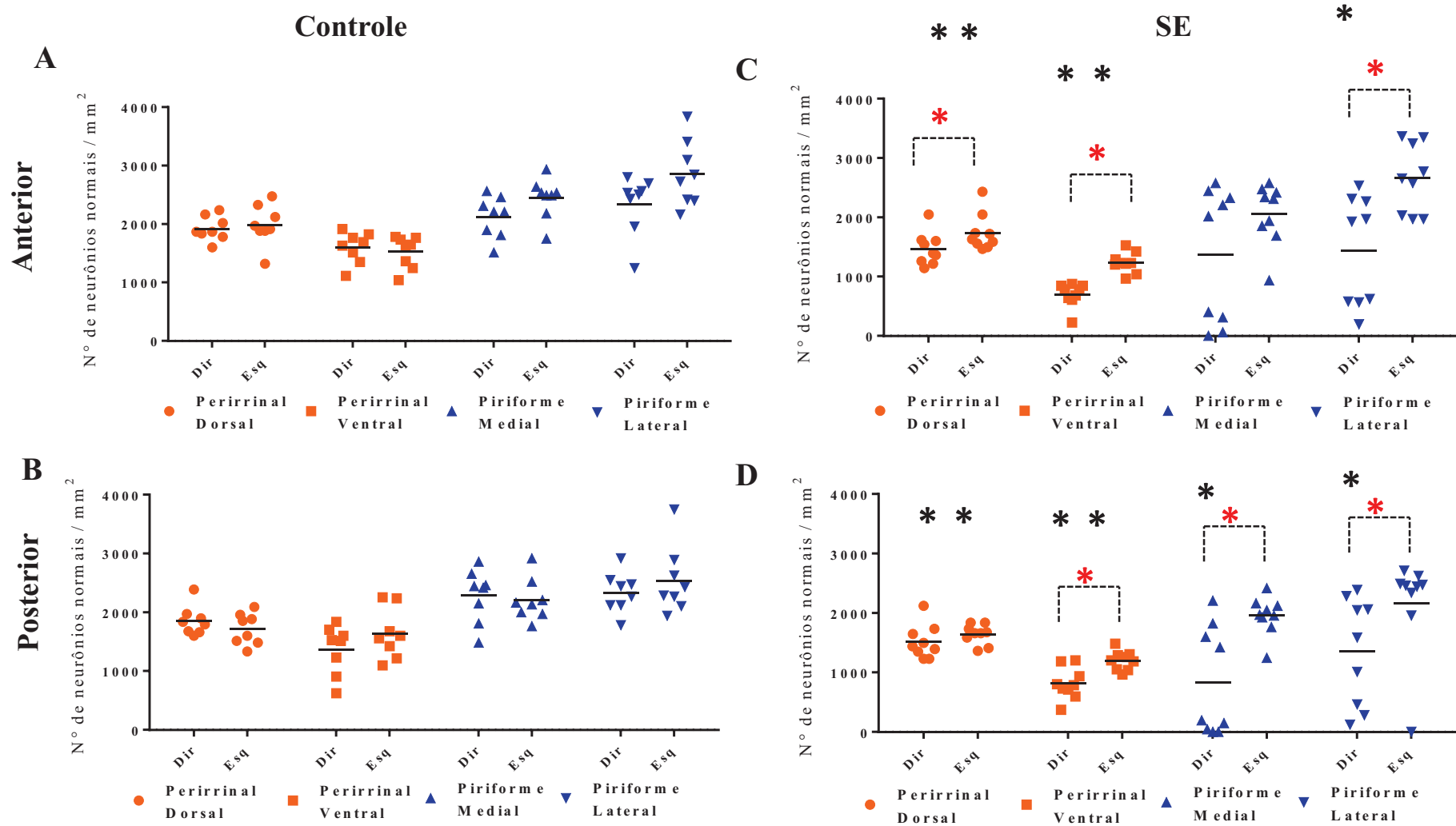


Figura 34. Contagem de neurônios normais remanescentes dos córtices perirrhinal e piriforme dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 24 horas após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo. Asteriscos pretos indicam diminuição da densidade neuronal que foi significativa com relação ao controle; asteriscos vermelhos indicam diferenças que foram estatisticamente significantes dentro do grupo SE.

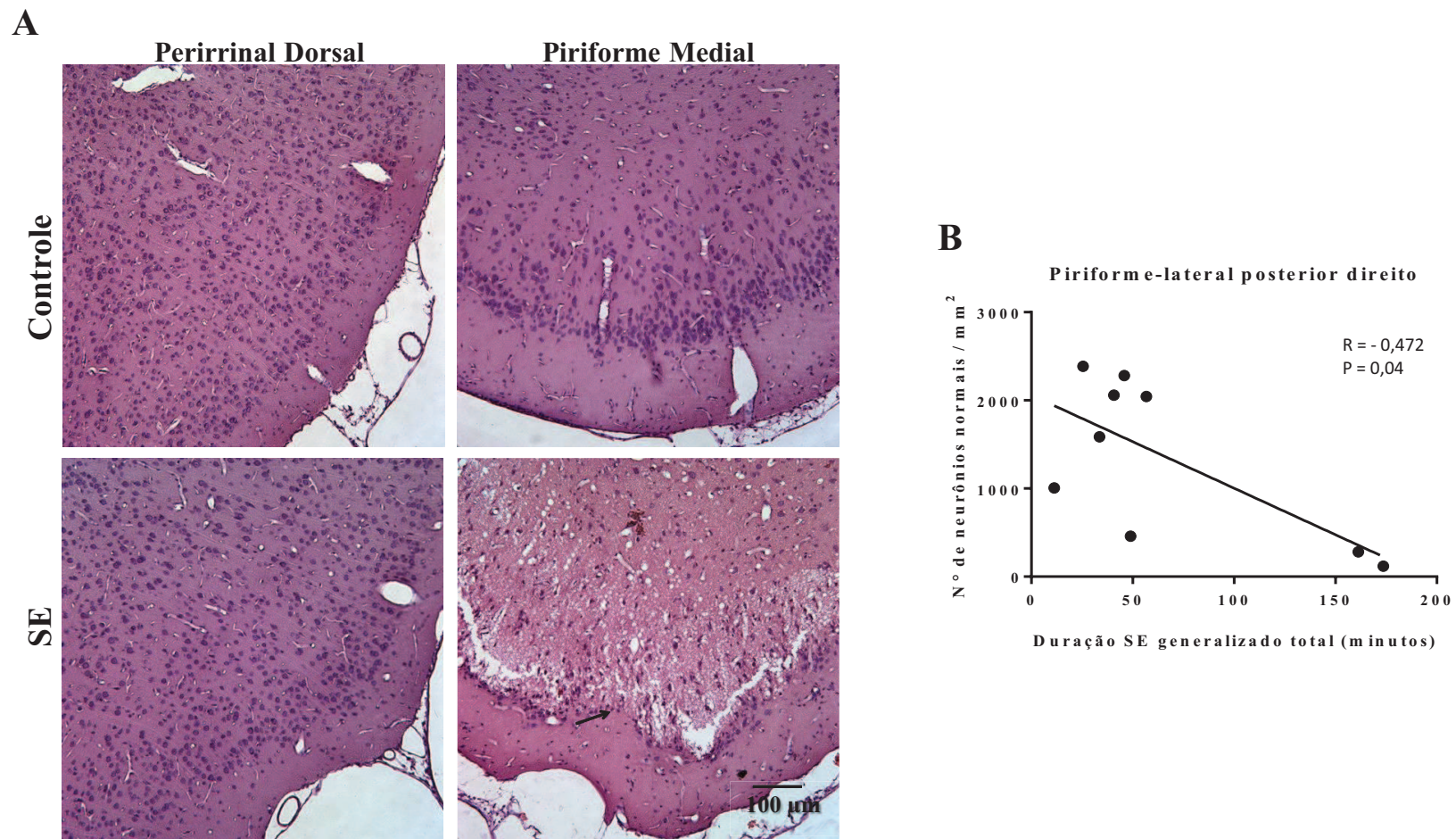


Figura 35. A) Secções coradas por HE representativas dos córtices perirrinal e piriforme de animais do grupo 24 horas, comparando-se Ctrl e SE. A densidade neuronal do córtex perirrinal dorsal foi similar entre o grupo Ctrl e SE. As setas pretas indicam morte neuronal. Imagens obtidas em aumento de 20x ao microscópio óptico. B) Regressão linear mostrando correlação negativa entre a duração do SE generalizado total e número de neurônios normais do córtex piriforme lateral posterior direito (Pearson, $R = -0,472$ e $p = 0,04$) nos animais do grupo 24 horas.

3.3.3.2 Grupo 30 dias

Os animais do grupo controle não apresentaram neurônios em processo de degeneração (células FJC+) nas porções dos córtices perirrinal e piriforme avaliados. Dentro do grupo SE, apenas três animais apresentaram degeneração no nível anterior dos córtices perirrinal e piriforme, ao passo que no nível posterior um número maior de animais (até 6 animais) apresentou degeneração neuronal. No entanto, o número de células FJ+ foi estatisticamente similar entre os níveis anterior e posterior, e lado direito e esquerdo (*Teste t Student e Mann Whitney Rank Sum*, $p > 0,1$, Figura 36). O baixo número de animais com degeneração neuronal poderia justificar o motivo de os dados não terem alcançado significância estatística.

Neste grupo, a porção ventral do córtex perirrinal também sofreu maior degeneração, assim como a porção medial do córtex piriforme. Não houve correlação entre a duração do SE e a degeneração neuronal dos córtices perirrinal e piriforme no grupo 30 dias.

Houve correlação positiva entre a frequência de CRE totais e a degeneração do córtex perirrinal ventral posterior direito (Pearson, $R = 0,705$ e $p = 0,02$), indicando que a degeneração neuronal aumentou quanto o maior número de CRE.

Com relação à perda neuronal, os animais do grupo controle apresentaram todos os neurônios de morfologia normal nas porções dos córtices perirrinal e piriforme analisados. O grupo SE apresentou menor densidade de neurônios normais com relação ao Ctrl, que foi significativa na maioria das estruturas (*Teste t Student*, $p < 0,05$, Figura 37). No grupo SE, a densidade neuronal do córtex perirrinal foi similar entre os animais SE e com relação ao grupo Ctrl (com exceção do lado esquerdo das porções dorsal e

ventral anteriores, que apresentaram perda neuronal, Teste t Student, $p < 0,02$), enquanto que a do córtex piriforme foi mais heterogênea, com alguns animais apresentando perda neuronal severa ou total, que foram os que apresentaram mais CRE (Figura 38). Comparando-se a densidade neuronal entre os animais dentro do grupo SE, a densidade neuronal entre os lados direito e esquerdo, e nível anterior e posterior foram similares estatisticamente, com exceção do córtex perirrinal ventral direito, que teve maior perda neuronal no nível anterior (Teste t Student, $p = 0,02$, Figura 37).

Foi encontrada correlação negativa entre a duração do SE e o número de neurônios normais do córtex Piriforme Medial Posterior Esquerdo (SE generalizado e SE generalizado total - Pearson, $R = - 0,467$ e $p = 0,04$), indicando que a maior perda neuronal está associada à maior duração do SE. Não foi encontrada correlação entre a perda neuronal perirrinal e piriforme e o número de CRE.

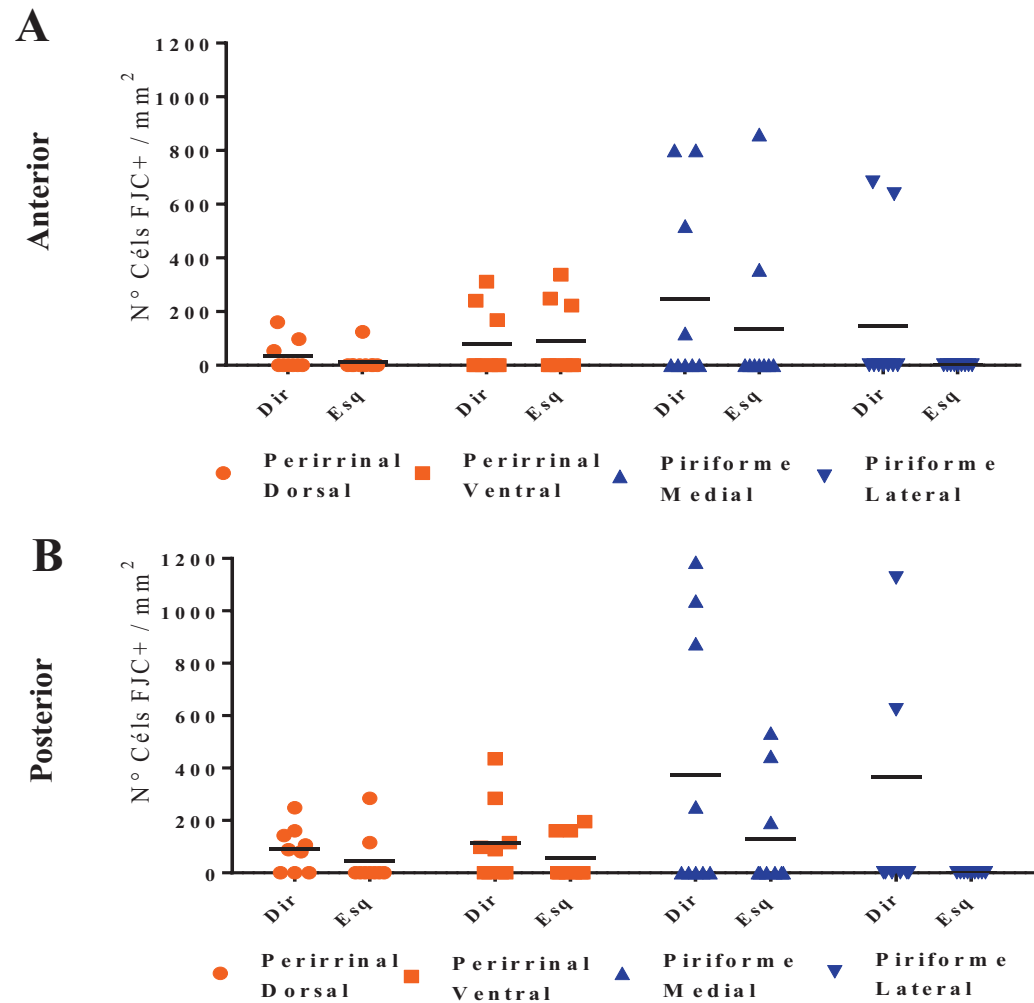
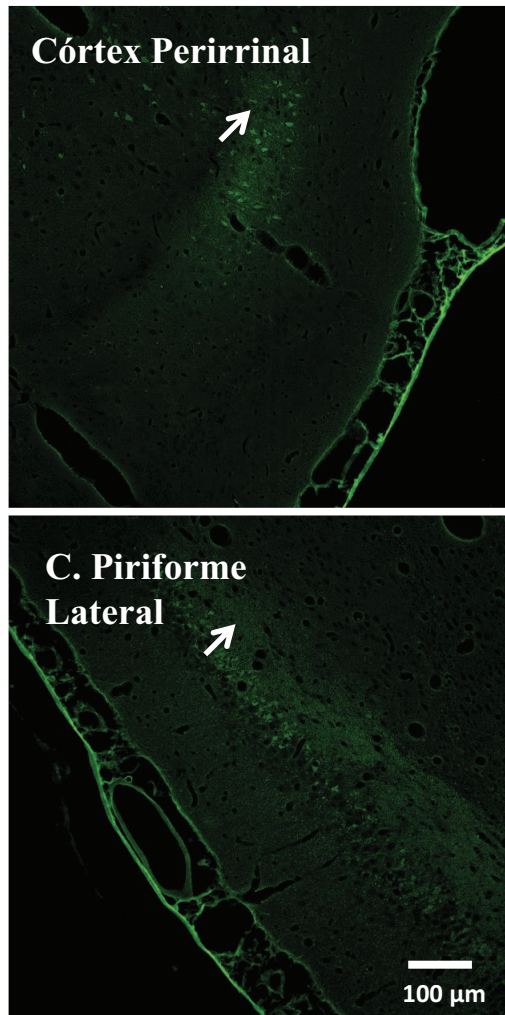


Figura 36. Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal dos córtices perirrinal e piriforme do grupo 30 dias. Não houveram diferenças significativas na degeneração neuronal entre eles. As setas indicam neurônios em degeneração. Imagens foram adquiridas em aumento de 20x ao microscópio de fluorescência. Os gráficos indicam o número de neurônios em degeneração dos córtices perirrinal e piriforme por mm² 30 dias após a injeção de pilocarpina na amígdala, mostrando o nível anterior (A) e posterior (B) Todos os animais do grupo controle apresentaram a contagem de neurônios em degeneração igual a zero As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo.

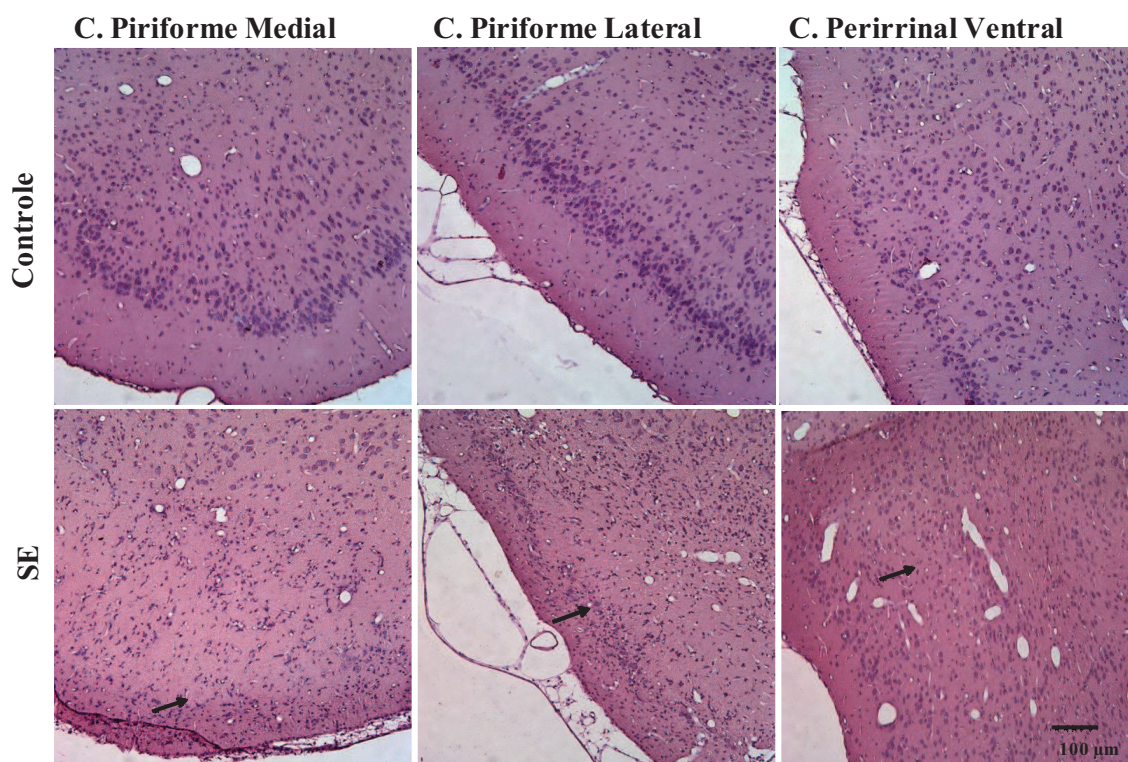


Figura 38. Secções coradas por HE representativas dos córtices perirrinal e piriforme de animais do grupo 30, comparando-se Ctrl e SE. As setas pretas indicam perda neuronal. Imagens obtidas em aumento de 20x ao microscópio óptico.

3.3.4 Degeneração e Perda Neuronal do Tálamo e Hipotálamo

3.3.4.1 Grupo 24 horas

Os animais do grupo controle não apresentaram neurônios em processo de degeneração (células FJC+) nos núcleos do tálamo e hipotálamo avaliados. No grupo SE, os núcleos que apresentaram maior degeneração foram MDM, PVP, VM e VPPC. Os núcleos dorsais-mediais e laterais do tálamo (LDDM, LDVL, LPLR e LPMR) e hipotálamo anterior apresentaram escassa degeneração neste grupo. Embora um maior número de animais tenha apresentado degeneração do lado direito, de forma geral, não

houve diferença significativa na degeneração neuronal entre os lados, exceto em VM anterior e Hipotálamo posterior, onde a degeneração foi significativamente maior do lado direito (*teste t Student*, $p = 0,04$ e *Mann Whitney Rank Sum*, $p = 0,008$, respectivamente). Além disso, comparando-se nível anterior com posterior, VM anterior direito apresentou maior degeneração neuronal, ao passo que no hipotálamo posterior direito, a degeneração foi maior (Figura 39).

Houve uma correlação positiva entre a duração do SE e a degeneração de VM anterior direito e esquerdo e VPPC posterior esquerdo (Figura 40).

Com relação a perda neuronal, os animais do grupo controle apresentaram todos os neurônios de morfologia normal nos núcleos do tálamo e hipotálamo analisados. Os animais do grupo SE apresentaram diminuição da densidade neuronal com relação aos controles na maioria das regiões (*Teste t student*, $p < 0,05$, Figura 41).

Dentro do grupo SE, a degeneração neuronal em geral teve um padrão heterogêneo, com animais apresentando alta perda neuronal, e outros, baixa. A densidade neuronal entre os lados direito e esquerdo e nível anterior e posterior foi similar, com exceção do núcleo Po, anterior e posterior, que apresentou maior perda neuronal do lado direito (*Teste t Student*, $p = 0,03$) e hipotálamo direito, com maior perda no nível posterior (*Teste t Student*, $p = 0,04$) (Figura 41).

Houve uma correlação negativa entre a duração do SE e o número de neurônios normais de VM anterior direito e esquerdo e hipotálamo posterior direito (Figura 42B), indicando que a maior perda neuronal está associada à maior duração do SE.

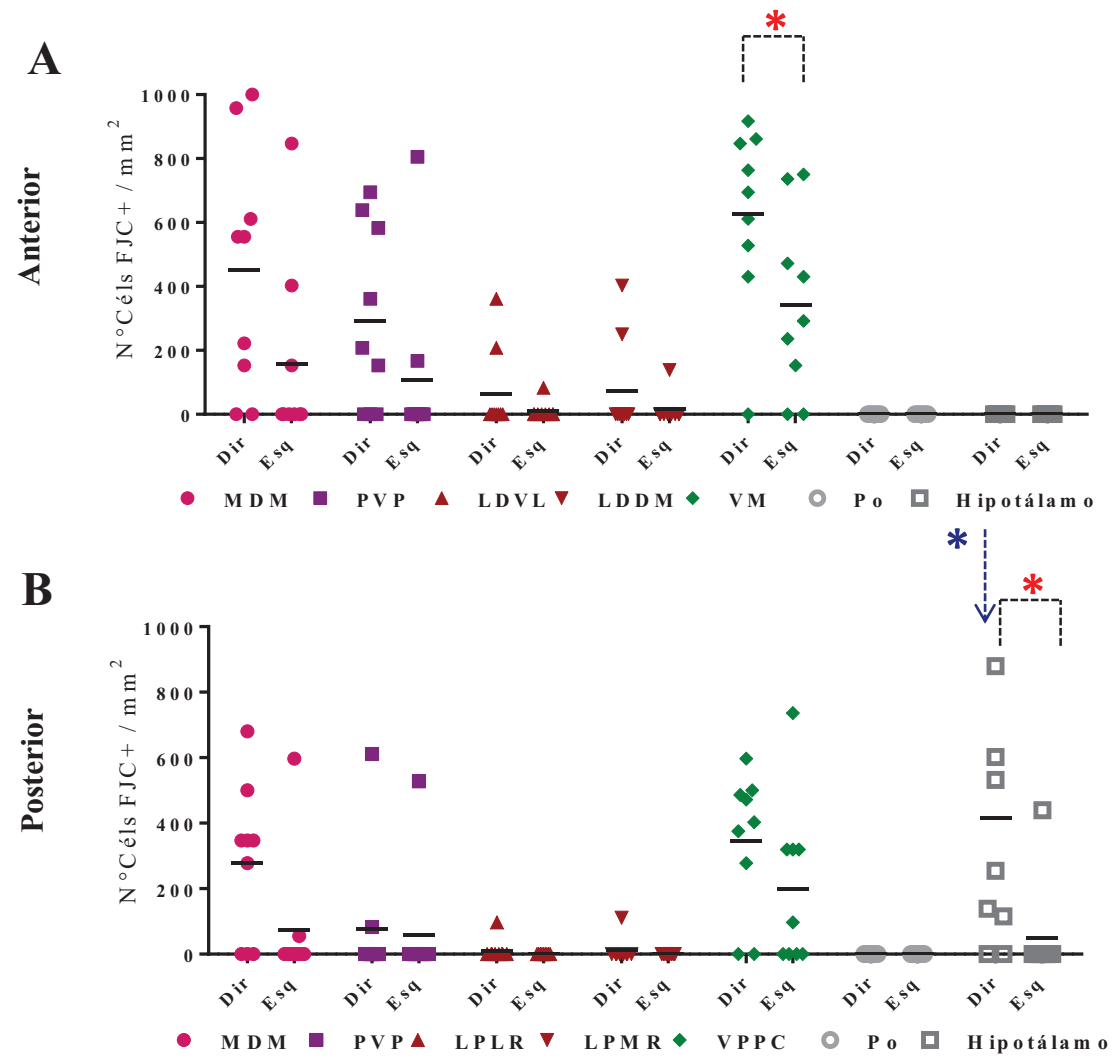
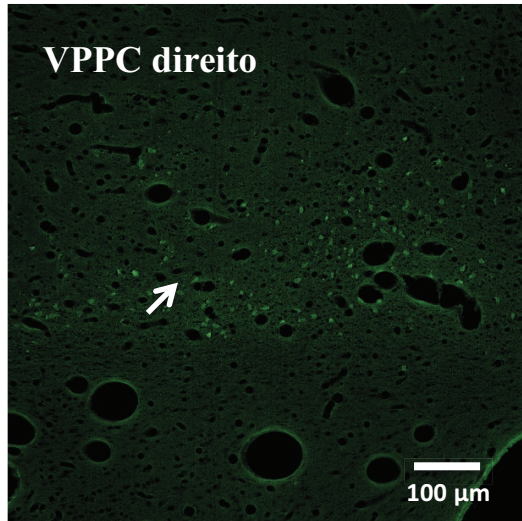
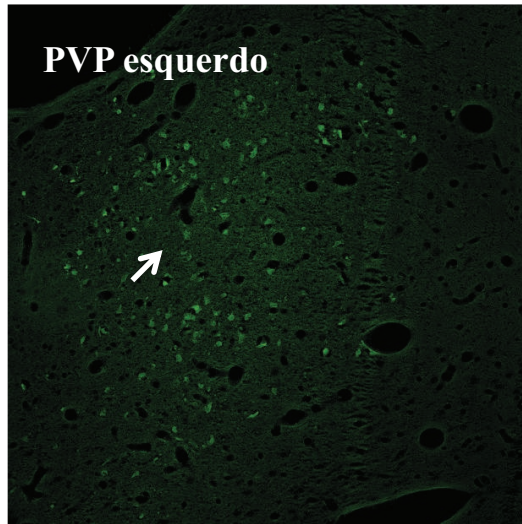


Figura 39. Secções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal do tálamo do grupo 24 horas. As setas indicam neurónios em degeneração. Imagens foram adquiridas em aumento de 20x. Os gráficos indicam o número de neurónios em degeneração dos núcleos do tálamo e hipotálamo por mm², 24 horas após a injeção de pilocarpina na amígdala. Todos os animais do grupo controle apresentaram a contagem de neurónios em degeneração igual a zero. **A)** Nível anterior do tálamo e hipotálamo. **B)** Nível posterior do tálamo e hipotálamo. As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; MDM – núcleo talâmico mediodorsal medial; PVP – núcleo talâmico paraventricular posterior; LDVL – núcleo talâmico laterodorsal ventrolateral; LPLR – núcleo talâmico laterodorsal posterior; LDDM – núcleo talâmico laterodorsal dorsomedial; LPMR – núcleo talâmico mediorostral posterior; VM – núcleo talâmico ventromedial; VPPC – núcleo talâmico ventral parvicelular posterior; Po – grupo nuclear talâmico posterior; Hipotálamo – núcleo PMV – núcleo premamilar ventral. Asteriscos vermelhos indicam diferenças que foram estatisticamente significantes dentro do grupo SE; asteriscos azuis indicam diferenças significantes entre o nível anterior e posterior.

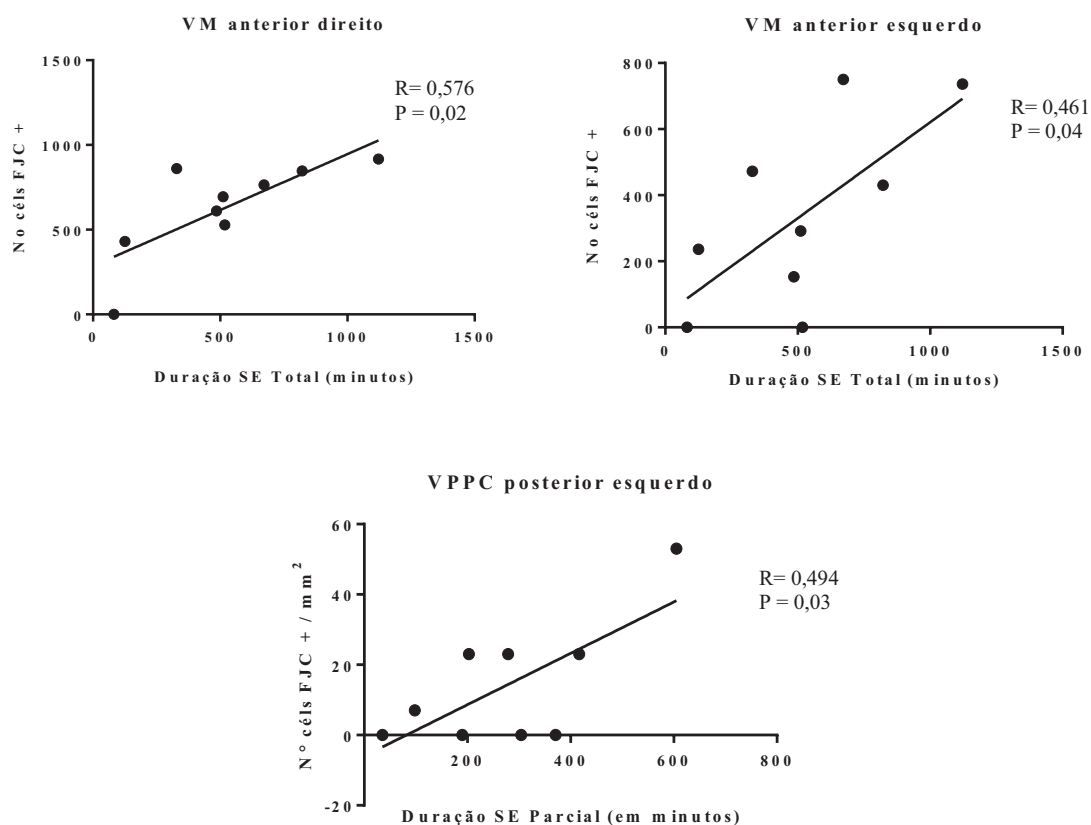


Figura 40. Regressão linear mostrando correlação positiva entre a duração do SE total (todas as crises antes e após DZP) e SE parcial (todas as crises parciais antes do DZP) com o número de neurônios em degeneração em VM anterior direito (Pearson, $R = 0,576$ e $p = 0,02$), VM anterior esquerdo (Pearson, $R = 0,461$ e $p = 0,04$) e VPPC posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,494$ e $p = 0,03$), indicando que a maior duração do SE aumenta a degeneração neuronal.

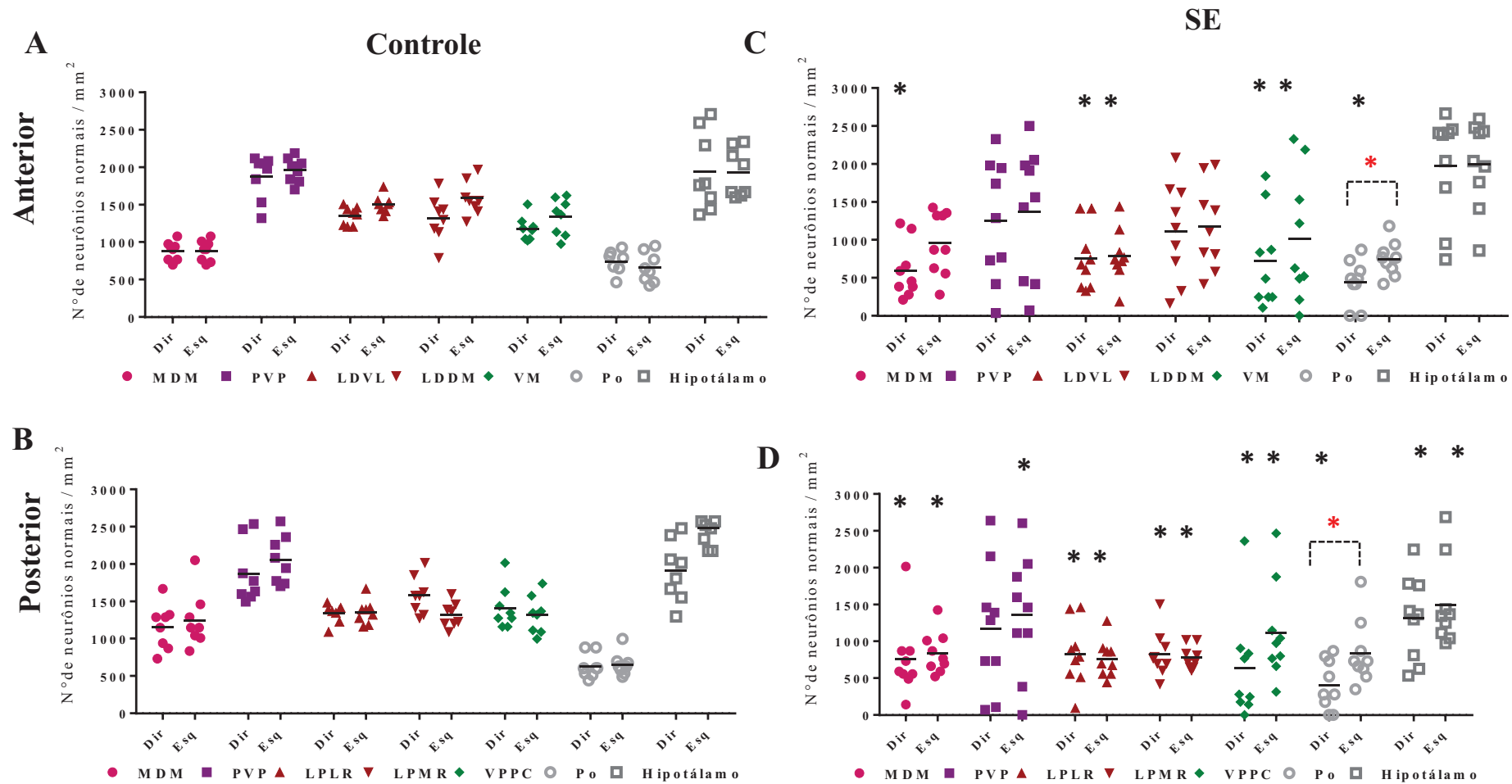


Figura 41. Contagem de neurônios normais remanescentes dos núcleos do tálamo e hipotálamo dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 24 horas após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; MDM – núcleo talâmico mediodorsal medial; PVP – núcleo talâmico paraventricular posterior; LDVL – núcleo talâmico laterodorsal ventrolateral; LPLR – núcleo talâmico laterodorsal posterior; LDDM – núcleo talâmico laterodorsal dorsomedial; LPMR – núcleo talâmico mediorostral posterior; VM – núcleo talâmico ventromedial; VPPC – núcleo talâmico ventral parvicelular posterior; Po – grupo nuclear talâmico posterior; Hipotálamo – núcleo PMV – núcleo premamilar ventral. Asteriscos pretos indicam diminuição da densidade neuronal que foi significativa com relação ao controle; asteriscos vermelhos indicam diferenças que foram estatisticamente significantes dentro do grupo SE.

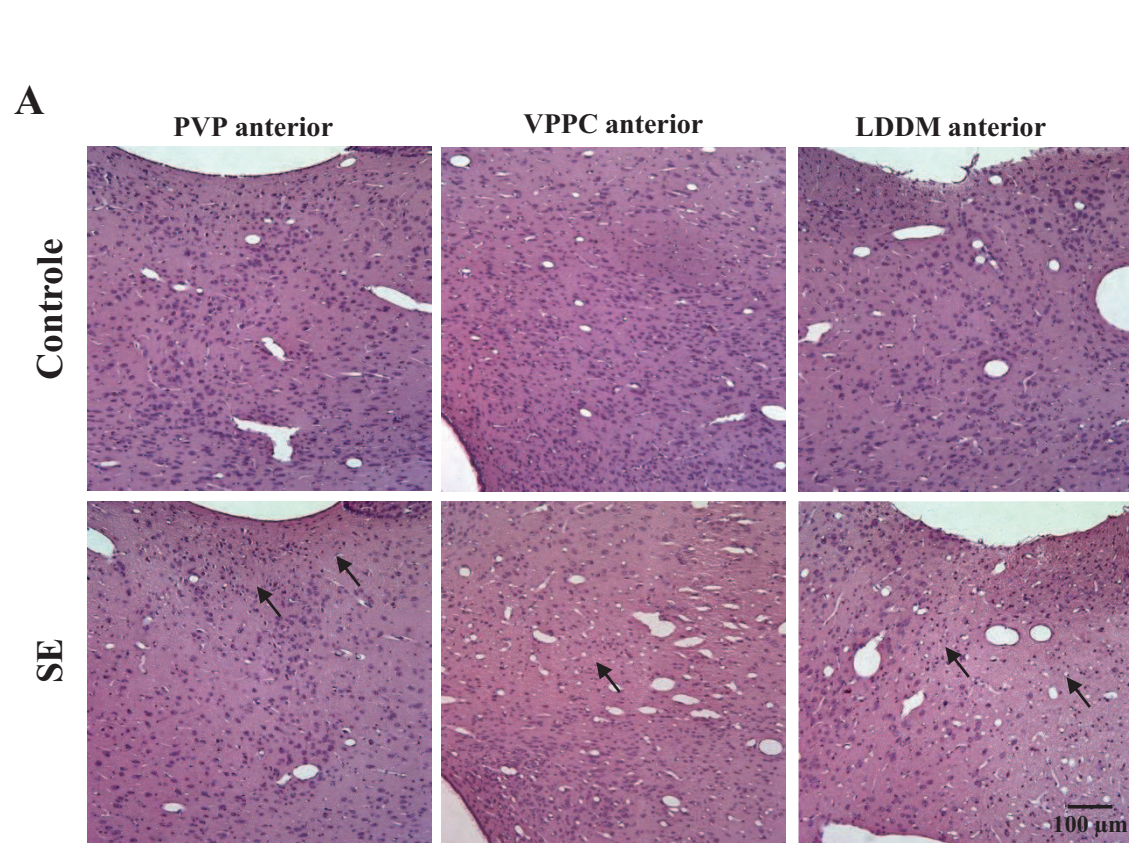
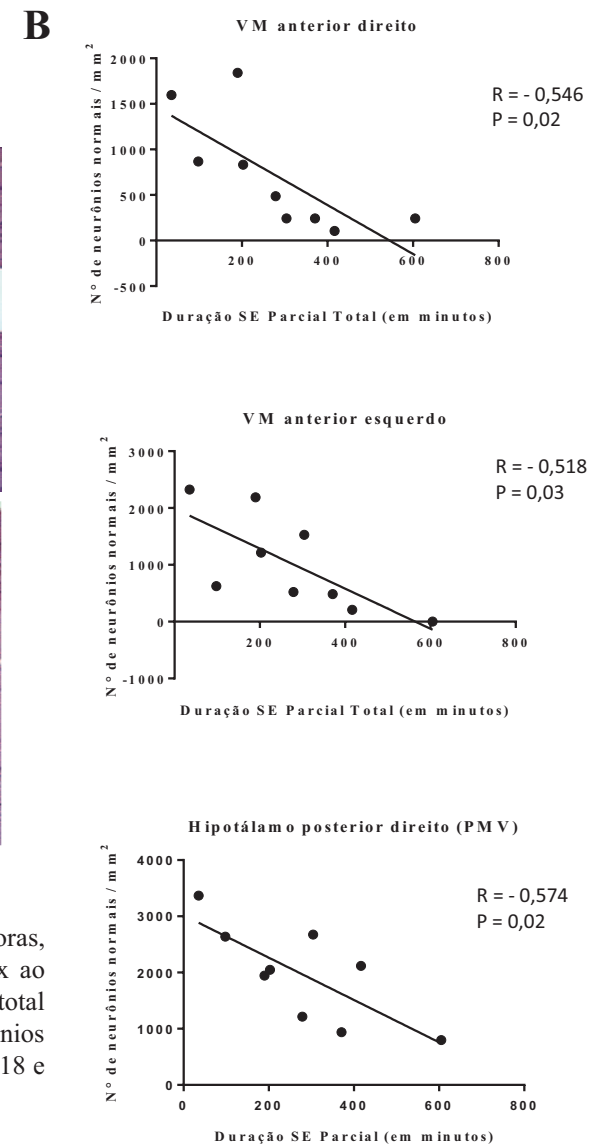


Figura 42. A) Secções coradas por HE representativas dos núcleos do tálamo de animais do grupo 24 horas, comparando-se Ctrl e SE. As setas pretas indicam perda neuronal. Imagens obtidas em aumento de 20x ao microscópio óptico. **B)** Regressão linear mostrando correlação negativa entre a duração do SE parcial total (crises parciais antes e após o DZP) e o SE parcial (crises parciais antes do DZP) e o número de neurônios normais de VM anterior direito (Pearson, $R = -0,546$, $p = 0,02$), VM anterior esquerdo (Pearson, $R = -0,518$ e $p = 0,03$) e hipotálamo posterior direito (Pearson, $R = -0,574$ e $p = 0,02$) nos animais do grupo 24 horas.



3.3.4.2 Grupo 30 dias

Os animais do grupo controle não apresentaram neurônios em processo de degeneração (células FJC+) nos núcleos do tálamo e hipotálamo avaliados. No grupo SE, os núcleos que apresentaram maior degeneração foram PVP, VM, VPPC e os núcleos laterais-dorsais do tálamo - LDDM, LDVL, LPLR e LPMR – em três animais com forte marcação do FJC, diferente do grupo 24 horas, onde foi encontrada escassa degeneração dos núcleos laterais-dorsais. Estes núcleos laterais foram associados ao alto número de CRE nos animais. Os núcleos Po e Hipotálamo não sofreram degeneração neuronal no nível anterior. De forma geral, a degeneração neuronal entre os lados direito e esquerdo e nível anterior e posterior foram similares (*Teste t Student e Mann Whitney Rank Sum*, $p > 0,05$), com exceção do núcleo Po, que apresentou maior degeneração no nível posterior (*Mann Whitney Rank Sum*, $p < 0,05$) (Figura 43).

Uma correlação positiva foi estabelecida entre a duração do SE e a degeneração neuronal de VM anterior direito (SE generalizado total, Figura 44), indicando que a maior degeneração neuronal está associada à maior duração do SE. Além disso, houve uma correlação positiva entre a frequência de CRE e a degeneração neuronal de LPLR posterior esquerdo (CRE parciais, generalizadas e totais), LPMR posterior esquerdo (CRE parciais, generalizadas e totais) e LDVL anterior esquerdo (CRE parciais, generalizadas e totais, Figura 44), indicando que o maior número de CRE está associado ao aumento da degeneração neuronal nesses núcleos.

Com relação a perda neuronal, os animais do grupo controle apresentaram todos os neurônios de morfologia normal nos núcleos do tálamo e hipotálamo analisados. O grupo SE apresentou menor densidade de neurônios normais com relação ao Ctrl (*Teste*

t student, $p < 0,05$, Figura 45 e 46).

No grupo SE, a perda neuronal foi bastante heterogênea entre os animais, com alguns apresentando alta e outros baixa densidade neuronal. A densidade neuronal entre os lados direito e esquerdo e nível anterior e posterior foram similares, com exceção do núcleo Po posterior, onde a densidade neuronal foi menor do lado direito (*Teste t Student*, $p = 0,02$, Figura 45).

Houve correlação positiva entre a duração do SE e a perda neuronal de PVP anterior esquerdo (SE generalizado e SE generalizado total), VM anterior direito (SE generalizado), Po anterior direito (SE parcial total, $R = 0,339$ e $p = 0,01$), Po posterior direito (SE generalizado, $R = 0,550$ e $p = 0,02$ e SE generalizado total, $R = 0,556$ e $p = 0,02$), e LPMR posterior esquerdo (SE generalizado total, $R = 0,538$ e $p = 0,03$) (*Dados não mostrados*), indicando que a maior perda neuronal está associada à maior duração do SE (Figura 47).

Foi estabelecida também uma correlação positiva entre a frequência de CRE e a perda neuronal de PVP anterior direito (CRE parciais), PVP anterior esquerdo (CRE parciais e totais) e LDDM anterior esquerdo (CRE parciais, generalizadas e totais, Figura 47).

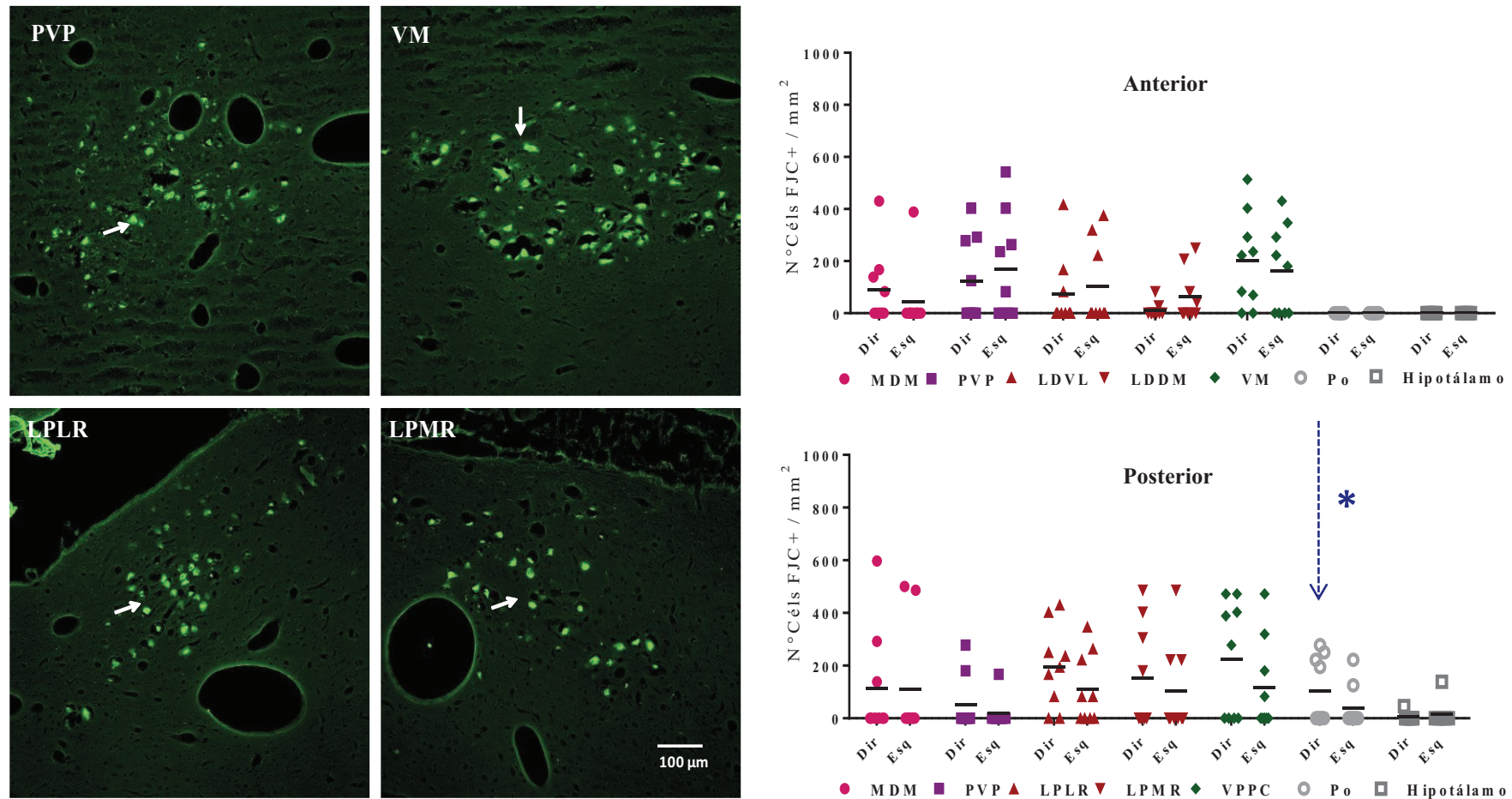


Figura 43. A) Seções coradas por FJC representativas de degeneração neuronal do tálamo de um rato com alta frequência de CRE com forte marcação FJC. As setas indicam neurônios em degeneração. Imagens foram adquiridas em aumento de 20x ao microscópio de fluorescência. B e C) Número de neurônios em degeneração dos núcleos do tálamo e hipotálamo por mm², 30 dias após a injeção de pilocarpina na amígdala. Todos os animais do grupo controle apresentaram a contagem de neurônios em degeneração igual a zero. A) Nível anterior do tálamo e hipotálamo. B) Nível posterior do tálamo e hipotálamo. As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; MDM – núcleo talâmico mediodorsal medial; PVP – núcleo talâmico paraventricular posterior; LDVL – núcleo talâmico laterodorsal ventrolateral; LPLR – núcleo talâmico laterodorsal posterior; LDDM – núcleo talâmico laterodorsal dorsomedial; LPMR – núcleo talâmico mediorostral posterior; VM – núcleo talâmico ventromedial; VPPC – núcleo talâmico ventral parvicelular posterior; Po – grupo nuclear talâmico posterior; Hipotálamo – núcleo PMV – núcleo premamilar ventral. Seta azul indica diferença significativa do nível posterior com relação ao anterior.

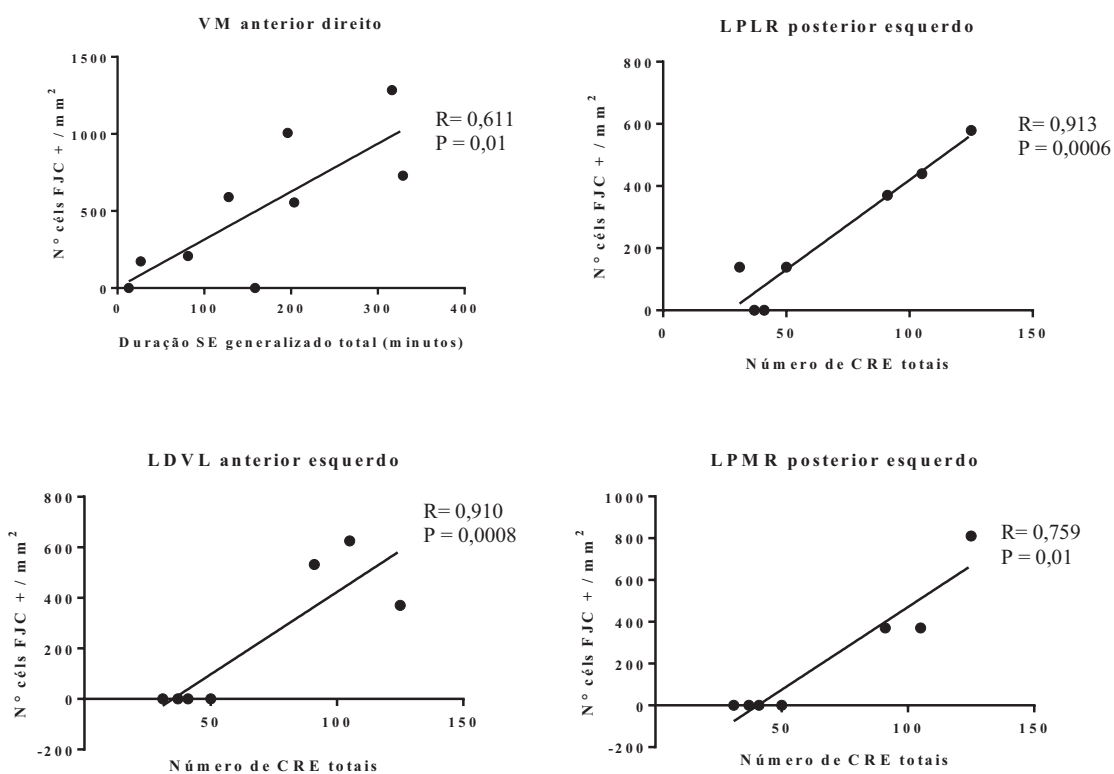


Figura 44. Regressão linear mostrando correlação positiva entre a duração do SE generalizado total (antes e após o DZP) e número de neurônios em degeneração de VM anterior direito (Pearson, $R = 0,611$ e $p = 0,01$) nos animais do grupo 30 dias e correlação positiva entre o número de CRE totais e a degeneração neuronal dos núcleos laterais do tálamo em LPLR posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,913$ e $p = 0,0006$); LPMR posterior esquerdo (Pearson, $R = 0,910$ e $p = 0,0008$); LDVL anterior esquerdo (Pearson, $R = 0,759$ e $p = 0,01$).

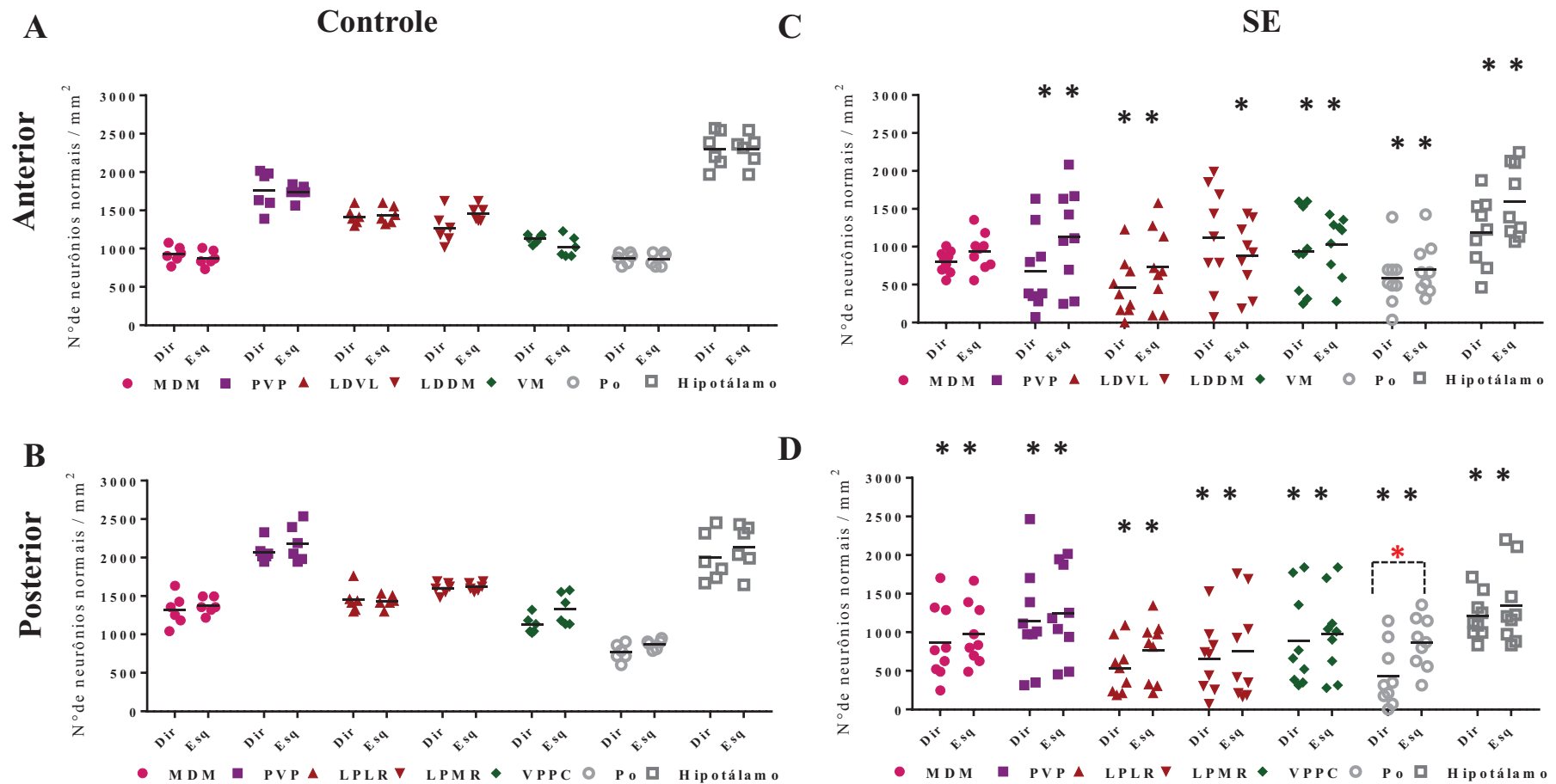


Figura 45. Contagem de neurônios normais remanescentes dos núcleos do tálamo e hipotálamo dos grupos Controle (A e B) e SE (C e D) – 30 dias após a injeção de pilocarpina ou solução salina, mostrando níveis anteriores (A e C) e posteriores (B e D). As abreviações indicam: Dir, direito; Esq, esquerdo; MDM – núcleo talâmico mediodorsal medial; PVP – núcleo talâmico paraventricular posterior; LDVL – núcleo talâmico laterodorsal ventrolateral; LPLR – núcleo talâmico laterodorsal posterior; LDDM – núcleo talâmico laterodorsal dorsomedial; LPMR – núcleo talâmico mediorostral posterior; VM – núcleo talâmico ventromedial; VPPC – núcleo talâmico ventral parvicelular posterior; Po – grupo nuclear talâmico posterior; Hipotálamo – núcleo PMV – núcleo premamilar ventral. Asteriscos pretos indicam diminuição da densidade neuronal que foi significativa com relação ao controle; asteriscos vermelhos indicam diferenças que foram estatisticamente significantes dentro do grupo SE.

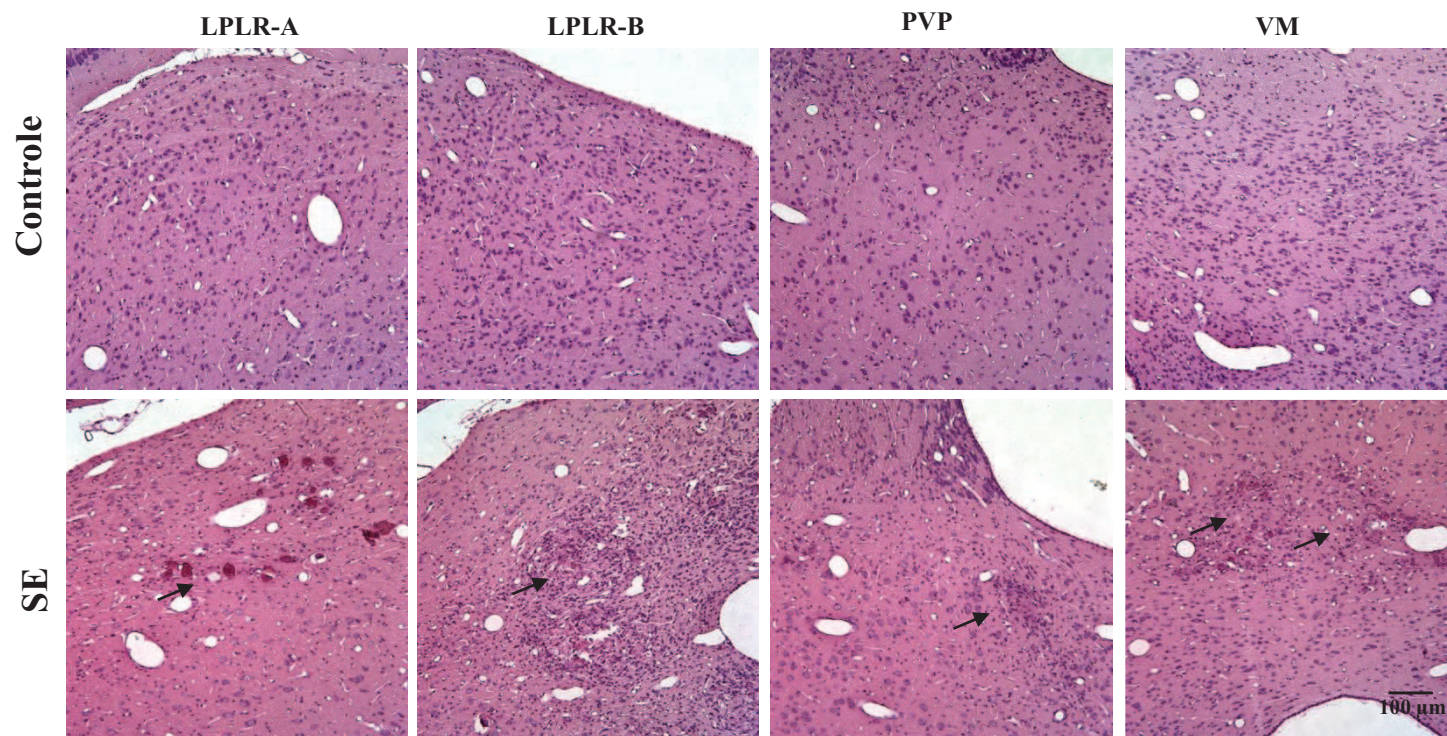


Figura 46. Secções coradas por HE representativas dos núcleos do tálamo de animais do grupo 30 dias, comparando-se Ctrl e SE. LPLR-A e LPLR-B mostram diferentes padrões de morte neuronal, com células com citoplasma eosinófilo, que apresentaram marcação intensa no FJC e lesão que se assemelha à um infiltrado inflamatório em toda região, respectivamente. As setas pretas indicam perda neuronal. Imagens obtidas em aumento de 20x ao microscópio óptico.

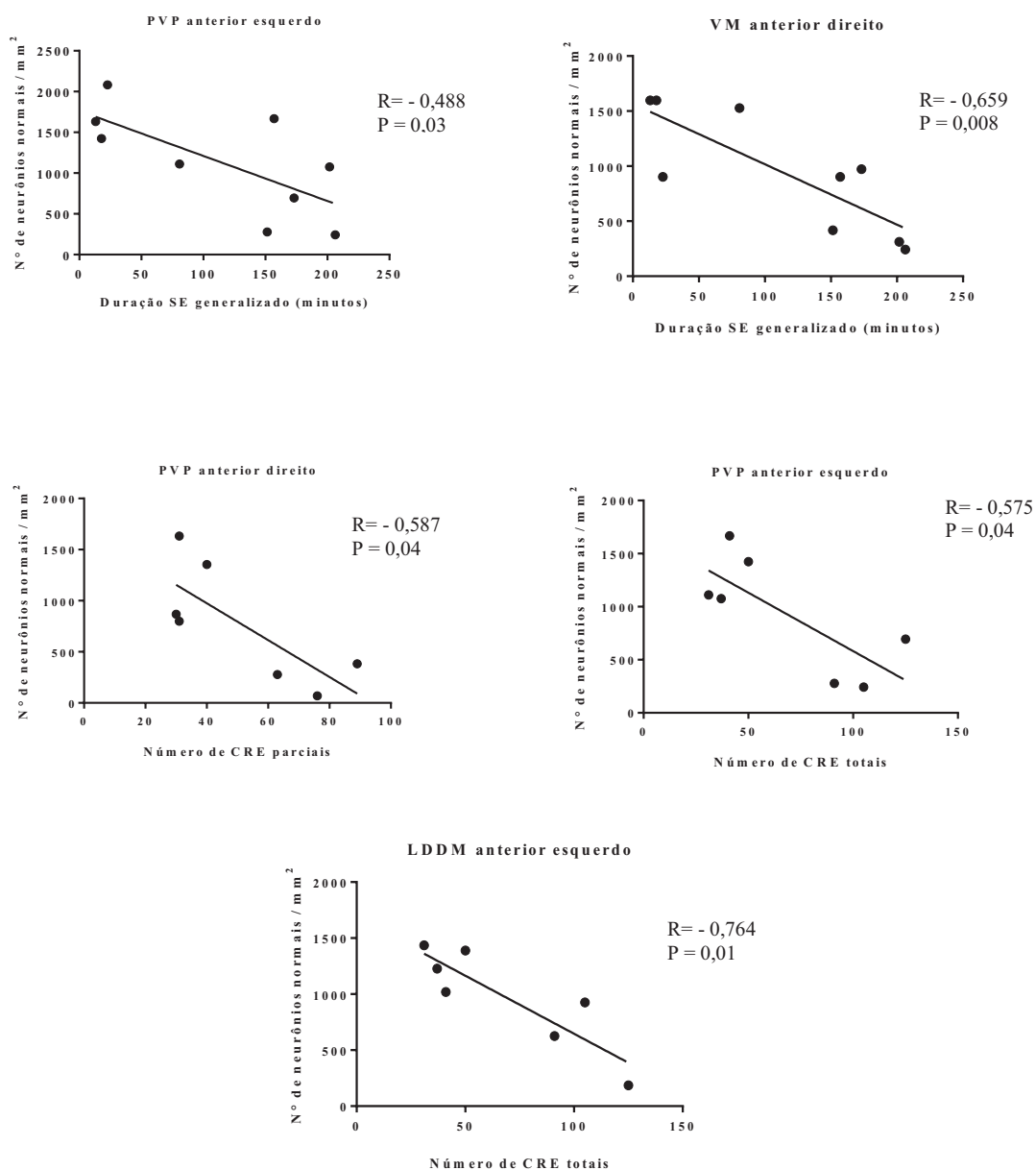


Figura 47. Regressão linear mostrando correlação negativa entre a duração do SE generalizado e o número de neurônios normais em PVP anterior esquerdo (Pearson, $R = -0,488$ e $p = 0,03$) e VM anterior direito (Pearson, $R = -0,659$ e $p = 0,008$) nos animais do grupo 30 dias e correlação negativa entre o número de CRE parciais e o número de neurônios normais em PVP anterior direito (Pearson, $R = -0,587$ e $p = 0,04$) e número de CRE totais e o número de neurônios normais em PVP anterior esquerdo (Pearson, $R = -0,575$ e $p = 0,04$) e LDDM anterior esquerdo (Pearson, $R = -0,764$ e $p = 0,01$).

4. DISCUSSÃO

4.1 Modelos experimentais de indução de SE e avaliação comportamental aguda

O objetivo do presente estudo foi reproduzir e caracterizar um modelo de ELT pela aplicação de pilocarpina na amígdala de ratos *Wistar*. Alterações comportamentais e histológicas foram caracterizadas nas fases aguda (em até 24 horas) e crônica (em até 30 dias). Até o momento, os modelos de ELT mais finamente caracterizados são os de aplicação de pilocarpina (ou ácido-caínico) intra-hipocampal ou intra-peritoneal (sistêmico) e os de estimulação elétrica. Segundo Covolan e Mello (2000),⁽⁶⁰⁾ os modelos de injeção sistêmica de ácido caínico e altas doses de pilocarpina apresentam características em comum com relação a origem de crises generalizadas (SE). No estudo de Furtado et al,⁽⁶¹⁾ em injeção de pilocarpina intra-hipocampal, utilizou-se dose única de 2,4 mg/ul de pilocarpina para produzir crises epiléticas, gerando SE em 76% dos animais. No entanto, no presente estudo, utilizamos injeção de pilocarpina na amígdala e uma dose de 0,9 mg/ul de pilocarpina, quase três vezes menos, e obtivemos 100% (18 injetados incluídos nas análises) dos animais com cânula no complexo amigdalar que desenvolveram crises generalizadas, sendo que, no total, 83,3% (15 animais) apresentaram SE predominantemente generalizado. Além disso, no presente estudo, no grupo 24 horas, 100% dos animais apresentaram SE generalizado por mais de duas horas, e no grupo 30 dias, 55,5%. Estes dados mostram a eficácia do presente modelo e a susceptibilidade da amígdala em gerar crises epiléticas agudas, constatando que a aplicação de pilocarpina na amígdala de ratos induz SE.

Segundo o estudo de Rattka et al⁽⁶²⁾, em modelo de epilepsia induzido por

aplicação de ácido caínico intrahipocampal, os ratos desenvolveram SE sem mortalidade. Quando a pilocarpina é aplicada por via sistêmica, em ratos *Wistar*, as taxas de mortalidade chegam até a 70% ⁽⁶¹⁾. Além da alta taxa de mortalidade, a administração de pilocarpina por via sistêmica gera SE com ratos epiléticos mais debilitados e posteriormente agressivos, o que requer muitas vezes um número maior de animais para obter um resultado estatisticamente significativo. No presente estudo, do total de animais injetados com pilocarpina apenas um morreu durante o SE - tendo este apresentado comportamento atípico no SE, com presença exacerbada de pulos - indicando um modelo com baixa mortalidade dos animais, assim como no modelo já descrito de injeção intra-hipocampal.

4.2 Avaliação comportamental crônica

Com relação ao aparecimento de CRE, no presente estudo, após o SE, 100% dos animais desenvolveram CRE, alguns com maior, outros com menor frequência e diferentes gravidades. Como nossa análise iniciou no 8º dia após o SE, não sabemos ao certo o dia em que ocorreu a primeira crise, pois alguns animais já apresentavam crises no 8º dia e, no 13º dia pós-SE, todos os ratos já haviam apresentado pelo menos duas CRE. Estes dados sugerem que o período de latência para início das CRE tenha sido nas duas primeiras semanas após o SE, em até 13 dias. No estudo de Bortel et al,⁽⁶³⁾ comparando ratos que desenvolveram SE por 30 e 120 minutos, observou-se que o período de latência para o desenvolvimento de CRE em ambos os grupos foi na primeira semana após a injeção de pilocarpina, e períodos de latência similares foram observados em ratos com SE de 2 ou 3 horas.⁽⁶⁴⁻⁻⁶⁶⁾ Em outros estudos, o período de latência foi de $22,1 \pm 8,9$ dias ⁽⁶⁷⁾ e 4-44 dias,⁽⁶⁸⁾ sendo que, os animais que

desenvolveram SE evoluíram para CRE. Arida,⁽⁶⁹⁾ estudando o curso de evolução de CRE no período crônico, observou que, da mesma forma, as primeiras CRE surgiram com aumento significativo na primeira semana após a injeção de pilocarpina, com picos nos primeiros 15 dias. Estudos clínicos em pacientes não tratados também mostram este aceleração do processo epileptogênico nas primeiras fases da epilepsia.^(70,71) De acordo com estes estudos, as razões que explicam esta progressão precoce ainda são incertas.

Além disso, constatamos que a frequência das crises foi associada à gravidade e duração do SE prévio. Isto poderia explicar a alta variabilidade entre os animais do grupo crônico, uma vez que a gravidade do SE foi mais variável que no grupo 24h. Além disso, quatro dos animais apresentaram alta frequência de CRE totais e generalizadas, enquanto que os demais apresentaram menor frequência dessas crises, na maioria parciais. A duração e gravidade do SE generalizado foi maior nestes quatro animais que, conseqüentemente, apresentaram maior padrão de lesão neuronal. Estes achados concordam com o estudo de Bortel et al,⁽⁶³⁾ já mencionado, em que por avaliação comportamental e eletroencefalográfica foi observado que, comparando os animais que desenvolveram SE por 30 e 120 minutos, os animais do grupo 120 minutos apresentaram maior número de descargas interictais no período crônico e maior frequência de CRE, se comparado ao grupo com menor duração do SE, no período de 15 dias após o SE. Neste estudo também foi observado decaimento da frequência das CRE ao longo do tempo. Estes achados mostram o papel da duração e gravidade do SE (ou LPI nos seres humanos) no desencadeamento e frequência de CRE na fase da epilepsia.

A maior parte dos artigos encontrados nas bases de dados está relacionada à

epilepsia experimental voltada para a observação da frequência de crises e alterações cerebrais em um curto período de tempo. Nosso modelo teve como vantagem estudar as 24 horas/dia, em até 30 dias, assim obtivemos maior número de crises com relação a outros trabalhos, com vários picos no período estudado.

Com relação ao ciclo circadiano, o presente estudo mostrou que pelo menos uma CRE ocorreu em todas as horas do dia, e cerca do dobro delas ocorreu no período noturno. Estes achados não coincidem outros estudos em que não foi observada nenhuma diferença na frequência de CRE entre os períodos de noite e dia.^(72,73) Em contraste com nossos dados, no estudo de Arida et al (1999),⁽⁶⁹⁾ que utilizou o modelo de pilocarpina sistêmica, assim como em estudos de estimulação elétrica, os animais apresentaram mais convulsões durante o dia. A divergência desses resultados provavelmente deve-se à diferenças nos protocolos utilizados, considerando que os modelos citados são o de pilocarpina sistêmica e de estimulação elétrica e no presente estudo pilocarpina intra-amigdalar. Deve-se levar em consideração que o período de maior atividade dos ratos é durante a noite, e o maior número de CRE neste período poderia estar associado à maior atividade dos animais. Também deve-se considerar que estamos estabelecendo um novo modelo, e os demais modelos citados envolvem vias de ativação diferentes que, conseqüentemente, podem influenciar na frequência de CRE e no ciclo circadiano.

Finalmente, nossos resultados indicam que, após a indução de SE por aplicação de pilocarpina na amígdala, ocorre epilepsia com alta eficácia, e o grau desta epilepsia é associada à gravidade do SE. A vantagem deste tipo de estudo comportamental com identificação de alta frequência de CRE entre os animais, propicia o desenvolvimento de estudos farmacológicos.

4.3 Lesão neuronal associada às crises agudas e crônicas

Evidências clínicas mostram que mesmo que o foco epiléptico esteja bem localizado em apenas um dos lobos temporais, pacientes com ELT unilateral não apresentam apenas crises parciais, mas também generalizadas. Isto reforça a hipótese de que regiões extratemporais estejam envolvidas na iniciação e propagação das crises, com conseqüente lesão destas estruturas. Em nosso estudo, a injeção de pilocarpina foi realizada na amígdala direita, mas ainda assim, os animais desenvolveram crises generalizadas com lesão em diversas estruturas do lobo temporal, inclusive bilateralmente, corroborando os achados da literatura clínica e experimental. Isto sugere que a amígdala seja realmente susceptível, não só a gerar crises epiléticas, como também na propagação destas crises através de forte conexão com diversas estruturas límbicas como hipocampo, tálamo, hipotálamo, córtices perirrinal e piriforme.

Segundo Lemos e Cavalheiro,⁽⁷⁴⁾ a gravidade da lesão neuronal é diretamente associada com a duração do SE. Nosso estudo também detectou esta relação, pois todos os ratos com cânula na amígdala / complexo amigdalopiriforme apresentaram SE e, nos dois grupos, 100% dos animais apresentaram degeneração e perda neuronal. Alguns ratos que fizeram SE com crises generalizadas por mais tempo ou continuaram as crises noturnas por maior tempo, apresentaram maior padrão de lesão neuronal. Em particular, no grupo 30 dias, 11% (2 animais) apresentaram degeneração mínima (em no máximo duas regiões cerebrais). Estes animais apresentaram a cânula na amígdala, mas desenvolveram SE na maior parte do tempo parcial (crises de Racine 1/2, ≥ 2 horas) e não apresentaram crises durante a noite.

No grupo 24 horas, todos os animais apresentaram SE predominantemente generalizado, mas houve alguma variabilidade. Em geral, o padrão de lesão neuronal

entre os animais foi na maioria unilateral, predominantemente do lado direito. No entanto, os animais com SE generalizado e crises noturnas pós-SE por maior tempo apresentaram padrão maior de lesão neuronal em geral (que inclui degeneração e perda), em maior número de estruturas, e que se estendeu aos dois hemisférios cerebrais (bilateral). Assim, observamos correlações positivas entre a duração do SE e lesão neuronal neste grupo, em intensidade e número de estruturas afetadas. Nas variáveis histológicas analisadas, nem todas as estruturas alcançaram significância estatística, provavelmente pelo fato de algumas terem apresentado maior lesão neuronal que outras, ou por somente alguns animais terem apresentado lesão neuronal na maioria das estruturas, ou mesmo pelo número final de animais considerados para análise.

No grupo 30 dias, observamos alta variabilidade entre os animais, provavelmente pelo número final de animais incluídos para análise, duração e tipo de SE mais heterogêneos entre os nos animais deste grupo, e conseqüentemente a frequência de CRE. No entanto, todos os animais apresentaram lesão cerebral, embora alguns tenham apresentado esta lesão em escassas estruturas avaliadas (como já mencionado, em 2 animais que apresentaram poucas CRE), exceto aqueles que apresentaram número alto de CRE com relação aos demais, que foram quatro dos sete animais filmados. Desta forma, acreditamos que não haja direta relação entre a degeneração neuronal após 30 dias com o SE, mas sim, com as CRE. Isto porque, após 30 dias da injeção de pilocarpina, não esperaríamos encontrar marcação FJC+ nos animais deste grupo, considerando que o FJC possui como característica corar apenas neurônios em processo de degeneração agudo, em até cerca de 14 dias.⁽⁵⁸⁾ No entanto, após 30 dias estes animais apresentaram alta marcação FJC+, um achado muito interessante, pois indica que esta marcação foi decorrente das CRE que eles realizaram

nas últimas semanas da análise. Mas, podemos considerar que o SE acaba por exercer, mesmo que indiretamente, relação com a degeneração neuronal em até 30 dias, pois já sabemos que a duração e gravidade do SE determinou a alta frequência de CRE.

Neste grupo foram estabelecidas também correlações positivas entre a duração do SE e CRE com a lesão neuronal em diversas estruturas, principalmente regiões do hipocampo. Mas não alcançamos significância estatística em algumas delas, pois o número de animais que apresentou lesão neuronal foi baixo, assim como o número de estruturas.

Castro et al ⁽⁷⁵⁾ mostraram que uma das principais vantagens do modelo de indução de SE por aplicação de pilocarpina intrahipocampal (H-PILO) consiste na lesão neuronal mais localizada, em contraste com o modelo de aplicação sistêmica de pilocarpina (S-PILO), onde a lesão é mais difusa e pouco localizada. Neste estudo, quando comparadas as áreas com células FJC+ em ambos os modelos, em 24 horas após o SE, foram encontradas áreas tanto exclusivamente afetadas em cada grupo quanto áreas comuns em ambos os grupos. Em uma visão panorâmica do cérebro, pudemos observar uma lesão neuronal seletiva e localizada, assim como no modelo da H-PILO de Castro et al. ⁽⁷⁵⁾ Além disso, nos animais do grupo 30 dias, a lesão neuronal foi predominantemente bilateral entre os animais, de forma diferente ao grupo 24 horas, que apresentou lesão predominantemente unilateral. Isto sugere que haja uma “lateralização” da lesão na fase da epilepsia, ou seja, ela se modifica pela frequência de CRE ao longo do tempo.

Em geral, não encontramos diferenças entre a lesão neuronal entre os níveis mais anteriores e mais posteriores do cérebro, com exceção de estruturas como o núcleo lateral da amígdala e hipocampo, que foi maior no nível posterior. Muitos animais

também apresentaram padrão de lesão bilateral, que foi associada com a gravidade do SE (no grupo 24 horas) ou CRE (no grupo 30 dias), embora, no grupo 24 horas, diversas estruturas tenham apresentado maior lesão do lado direito (ipsilateral à cânula). No grupo 30 dias, a distribuição entre os lados direito e esquerdo foi semelhante na maioria das estruturas, com algumas delas, curiosamente, apresentando maior degeneração do lado esquerdo, mas que não foi significativa em algumas estruturas. Uma vez que a maioria dos estudos observaram um padrão de maior lesão do lado em que foi realizado o estímulo - no nosso caso, direito - não saberíamos explicar ao certo este resultado, mas, estabelecemos correlação significativa entre a frequência de CRE e a lesão neuronal do lado esquerdo em diversas estruturas neste grupo. Provavelmente os mecanismos que medeiam o surgimento de CRE estejam associadas com a lateralização desta lesão com relação ao local de surgimento das crises.

Considerando nossos resultados, o presente estudo apresenta um modelo com padrão de lesão neuronal seletiva e discreta, característica aos achados histopatológicos encontrados nos pacientes com ELT. A seguir serão discutidos os resultados de cada estrutura límbica.

4.4 Hipocampo

O hipocampo é conhecido por ser uma das principais estruturas do sistema límbico na geração de crises epiléticas, e tem recebido muita atenção por parte dos estudos científicos. A importância dada ao hipocampo tem sido baseada em diversos estudos que demonstraram que 1) O hipocampo é a estrutura que mais sofre lesão neuronal nos pacientes com ELT; 2) o início das crises se dá no lobo temporal medial; e

3) a ressecção cirúrgica do hipocampo muitas vezes resulta em melhora ou “cura” da epilepsia.⁽⁷⁶⁾

No grupo 24 horas, de acordo com os resultados do presente estudo, foi observada pouca marcação FJC+ no hipocampo, ao passo que a quantificação da perda neuronal (HE), foi maior. No entanto, ela foi seletiva, afetando as regiões de CA1, CA3, CA4 e Hilo, como encontrado em pacientes com ELT. Além disso, no FJC, a degeneração foi restrita a regiões isoladas, principalmente, com maior degeneração neuronal do hilo do lado direito. Alguns trabalhos com modelos de ELT já encontraram uma maior suscetibilidade do hilo frente à degeneração neuronal. Ressalta-se hipótese da presença de interneurônios hilares que contém somatostatina).⁽⁷⁷⁻⁷⁸⁾ No estudo de Apland et al,⁽⁷⁹⁾ no hipocampo anterior também foi observada maior degeneração no hilo se comparada a outras estruturas. Castro et al,⁽⁷⁵⁾ comparando dois modelos de pilocarpina (intra-hipocampal e sistêmico), também encontraram maior número de células FJB+ no hilo do giro dentado no modelo intra-hipocampal. Crises epiléticas que são iniciadas pela estimulação da amígdala têm sido em várias ocasiões, descritas como associadas à lesão do hipocampo. Por exemplo, verificou-se perda de neurônios do hilo e brotamento de fibras musgosas do giro dentado em ratos que desenvolveram CRE após SE induzido por estimulação elétrica do núcleo lateral da amígdala.⁽⁸⁰⁻⁸¹⁾

No presente estudo, além do hilo, a região de CA1 foi a mais afetada na maioria dos animais. Perda neuronal importante ocorreu em CA1, CA3 e CA4, principalmente do lado direito, de forma similar à perda seletiva das regiões hipocampais encontradas nos pacientes com ELT. Também observamos maior perda neuronal no hipocampo posterior (CA1, CA3 e hilo) com relação ao anterior, e na comparação dorso-ventral do hipocampo posterior, maior perda neuronal na porção ventral. Apland et al,⁽⁷⁹⁾ avaliando

a degeneração neuronal do hipocampo após SE por injeção de Soman, observaram que o hipocampo posterior foi mais suscetível a neurodegeneração que o hipocampo anterior, onde a degeneração foi mínima, similar os achados do presente estudo. A diferença de circuitos neuronais dos dois níveis do hipocampo podem explicar este resultado, podendo o hipocampo posterior apresentar maiores conexões com a amígdala e outras estruturas límbicas devido à sua maior extensão.^(79,82)

Nos animais do grupo 30 dias, notou-se que a degeneração neuronal hipocampal foi marcante, principalmente nos animais que apresentaram maior número de CRE, afetando todas as regiões do hipocampo, predominantemente bilateral. Animais com poucas CRE apresentaram escassa degeneração, na maioria das vezes em apenas uma região. Em geral, a região de CA1 também foi a mais afetada. Se comparados, de maneira geral, a lesão neuronal hipocampal do grupo 30 dias foi maior do que a do grupo 24 horas. A hipótese era de que a alta degeneração neuronal hipocampal nos animais com epilepsia mais grave seria associada às CRE destes animais. E, de fato, a degeneração neuronal hipocampal foi correlacionada com a frequência de CRE, nas camadas mais afetadas, de CA1, tanto no nível anterior quanto posterior. Interessantemente, foi observado alto padrão de degeneração neuronal na camada de células granulares do giro denteado em três animais que apresentaram SE grave e alto número de CRE. Este achado não é comum e ainda não foi descrito na literatura, uma vez que as células granulares do giro denteado são conhecidas por serem resistentes a lesão neuronal, assim como as células piramidais de CA2.⁽⁶⁸⁾ A lesão nesta camada de células, portanto, é diretamente relacionada com a frequência de CRE. Ao contrário do grupo 24 horas, não foi observada diferença significativa na lesão neuronal entre os níveis anteriores e posteriores e entre os lados direito e esquerdo.

Sabe-se que a principal característica histopatológica dos pacientes com ELT é a esclerose hipocampal, que acomete cerca de 70% dos portadores. Os mecanismos que ocasionam a degeneração hipocampal estão possivelmente relacionados à frequência e tempo de CRE, de acordo com estudos experimentais. No estudo de Lopim et al,⁽⁶⁷⁾ perspectiva por até 30, 90, 180 e 360 dias, a redução do número de células neuronais hipocampais em animais em até 30 dias após o SE não diferiu significativamente com os períodos de 90 e 180 dias (exceto aos 360 dias, que a redução foi significativa) indicando que o período mínimo de 30 dias pode definir o padrão de lesão neuronal crônico com eficácia.

4.5 Amígdala e DEn

No presente estudo, nossos animais apresentaram extensa degeneração no complexo amigdalár, onde foi aplicada a pilocarpina. Em geral, os núcleos da amígdala mais afetados foram LaVM, BMP, MePV e PMCo. O núcleo endopiriforme dorsal (DEn), embora não compreenda o complexo amigdalóide, possui importantes aferências com a amígdala, especialmente com a porção medial, e é comumente afetado em modelos de crises epilépticas e epilepsia como o da pilocarpina.⁽⁸²⁾ Assim como outros núcleos da amígdala, DEn apresentou degeneração neuronal em diversos animais e foi incluído às análises juntamente aos núcleos da amígdala.

No grupo 24 horas, os núcleos BMP, MePV, PMCo e DEn apresentaram degeneração em 100% dos animais. No grupo 30 dias, houve alta variabilidade dos animais. Em modelos animais têm sido descritas regiões amigdaloides mais propensas a degeneração neuronal, estando os núcleos mediais e mediais corticais entre os principais

afetados, assim como em nosso estudo. Além disso, já foi relatado que a porção medial e lateral da amígdala se projeta a outros núcleos da amígdala. Scoll et al,⁽⁷⁶⁾ em modelo de pilocarpina sistêmica, encontraram degeneração em diversos núcleos da amígdala com padrão semelhante aos resultados do presente estudo, com elevada degeneração também nos núcleos LaVM, BMP, MePV e PMCo e DEn. Comparando modelos de pilocarpina sistêmica e intra-hipocampal, Castro et al (2011)⁽⁷⁵⁾ encontraram degeneração em todos os núcleos da amígdala descritos, em ambos os modelos.

O núcleo basolateral (BLA) apresentou escassa degeneração, similar aos achados de Scoll et al.⁽⁷⁶⁾ No entanto, a porção basolateral da amígdala tem sido descrita como altamente suscetível a degeneração neuronal.⁽⁸³⁾

De maneira geral, a degeneração da amígdala foi maior do lado direito do que no lado esquerdo. Isto é similar aos achados histopatológicos de pacientes portadores de ELT, em que já foi descrita a maior lesão de estruturas ipsilaterais ao foco epiléptico, embora essa lesão possa acontecer também bilateralmente.⁽⁸³⁾

Em ambos os grupos, o núcleo LaVM foi significativamente maior no nível posterior. A degeneração deste núcleo foi correlacionada positivamente tanto com o SE como com a frequência de CRE dos animais. O núcleo lateral da amígdala é o que mais fornece conexões com os demais núcleos, innervando o núcleo basal, o núcleo basal acessório, o núcleo medial, área amígdalo-hipocampal, núcleo central, núcleo cortical posterior e o córtex periamigdalóide, com projeções de volta ao núcleo lateral. Estas vias fornecem rotas pelas quais os neurônios alvo podem regular a capacidade de resposta de suas regiões. Em seres humanos, tem sido relatada a perda neuronal e gliose no núcleo lateral e basal da amígdala, bastante suscetíveis à degeneração neuronal. Já em modelos animais tem sido descritas mais especificamente as regiões amigdaloides

propensas à degeneração neuronal, que incluem como uma das principais a porção lateral medial (LaVM).⁽⁸¹⁾

Dados recentes em estudos com roedores e primatas não-humanos sugerem que alterações estruturais e funcionais causadas pela atividade convulsiva originada na amígdala não são limitadas à própria amígdala, mas também podem afetar outras estruturas do lobo temporal, reforçando a ideia da alta conectividade neuronal com o sistema límbico que a amígdala possui. Alterações dos circuitos inibitórios que ocorrem dentro da amígdala podem ainda contribuir para a diminuição do limiar de descargas convulsivas, aumentando a excitabilidade dentro da amígdala. Além disso, existem tarefas comportamentais que dependem da integridade dos circuitos amigdaloides para serem realizadas com eficiência, e, um prejuízo ou lesão em alguns destes núcleos podem ser altamente prejudiciais aos pacientes.⁽⁸¹⁾

A amígdala desempenha função central nos mecanismos de memória emocional, comportamento afetivo e resposta ao medo, e circuitos neuronais da amígdala também estão diretamente relacionados com a fisiopatologia de transtornos psiquiátricos. Pacientes com lesão na amígdala podem apresentar alterações de comportamento relacionadas a estes transtornos. Observamos que três dos sete animais analisados no período crônico apresentaram alteração de comportamento, se tornando muito ansiosos e com medo ao contato entre si e com os pesquisadores.

De fato, quando a importância da amígdala é avaliada por critérios semelhantes ao hipocampo, evidencia-se a alta lesão estrutural que ela apresenta, isolada ou em conjunto com o hipocampo, sugerindo que a amígdala também pode contribuir para o desenvolvimento da epilepsia. Além disso, em estudos com fatias de cérebro “in vitro”, foi demonstrado que a amígdala gera atividade elétrica prolongada em resposta ao

Soman, ao passo que o hipocampo gera apenas atividade interictal. Estudos experimentais “in vivo” já constataram a alta atividade colinérgica que a amígdala exerce frente à exposição ao Soman, inibidor de acetilcolinesterase, em que a atividade da amígdala e a neurodegeneração foi maior que no hipocampo e no córtex piriforme.⁽⁵²⁾

4.6 Córtices Perirrinal e Piriforme

Os córtices perirrinal e piriforme são importantes estruturas do sistema límbico, descritas por serem sensíveis à ação da pilocarpina. Entretanto, do ponto de vista experimental, se comparadas ao hipocampo, ainda há poucos estudos sobre estas regiões, por não serem inteiramente danificadas na ELT, no caso do córtex piriforme, e por ser de difícil acesso em seres humanos, no caso do córtex perirrinal. No entanto, já foi constatado em estudos experimentais que estas regiões parahipocampais sofrem lesão neuronal, como encontramos em nossos resultados, assim como podem influenciar na propagação das crises tanto para o hipocampo como para amígdala.⁽⁸⁴⁾

O córtex piriforme atua na ELTM e na epilepsia frontal e possui papel importante na discriminação de odores e na memória olfativa, podendo causar auras olfatórias e atuar como um facilitador da estimulação da amígdala. Ele possui largas projeções com a amígdala, hipocampo e córtex rinal, que contém o córtex perirrinal e o córtex entorrinal que, por sua vez, possuem conexões principalmente com o hipocampo.⁽⁸⁵⁾ O córtex perirrinal está ligado com estruturas límbicas e desenvolve importante função em mecanismos de aprendizagem, memória e em processos patológicos como a epileptogênese.⁽⁸⁶⁾

Covolán e Mello,⁽⁶⁰⁾ observaram que uma das áreas mais afetadas após indução

de SE pela pilocarpina incluem as camadas II e III do córtex piriforme e as camadas profundas do perirrinal, o que também reforça a sensibilidade do córtex piriforme e perirrinal às crises epiléticas. Em nossos resultados, encontramos um padrão de degeneração neuronal do córtex perirrinal e piriforme com padrão semelhante entre os animais do grupo agudo, concentrada apenas do lado direito do cérebro, local onde foi realizada a injeção, e praticamente nula do lado esquerdo.

A escassez de pesquisas envolvendo as regiões do córtex piriforme e perirrinal dificulta a compreensão e o papel destas regiões na epileptogênese. Uma vez comprovado que estas estruturas participam de fato da fisiopatologia da ELT, é imprescindível o desenvolvimento de estudos que visem estudar mais a fundo estas estruturas parahipocampais.

4.7 Tálamo e Hipotálamo

No presente estudo, de forma geral, a variabilidade no número de neurônios em degeneração e normais foi alta entre os animais. Isto se deve provavelmente à variedade de núcleos que o tálamo apresenta que podem ser funcionalmente diferentes, ou mesmo na heterogenicidade entre os animais. No entanto, na maioria dos animais dos grupos agudo e crônico, os núcleos que apresentaram maior lesão foram PVP, MDM e VPPC. Estudos prévios em modelos animais, como o de Druga et al.⁽⁸⁷⁾ e Scholl et al.,⁽⁷⁶⁾ com degeneração de estruturas límbicas após indução de SE por pilocarpina sistêmica, encontraram degeneração em vários núcleos do tálamo e hipotálamo descritos no presente estudo, com padrão de degeneração neuronal, no entanto, mais disperso. A maioria dos núcleos do tálamo descritos no presente estudo, além de outros, foram

afetados. Castro et al, ⁽⁷⁵⁾ comparando o modelo de pilocarpina sistêmica e intrahipocampal, encontraram, da mesma forma, uma alta degeneração talâmica e hipotalâmica, ao passo que, no modelo intrahipocampal esta degeneração não foi encontrada, com exceção do núcleo MDM. No presente estudo, apresentaram degeneração neuronal os núcleos PVP, MDM, VPPC e núcleo premamilar ventral do hipotálamo PMV. Interessantemente, nosso modelo apresentou degeneração em alguns núcleos que não foram descritos no modelo H-PILO por Castro et al.⁽⁷⁵⁾ Isso pode ser explicado por estes núcleos apresentarem maiores conexões com a amígdala. O núcleo mediodorsal do tálamo (MDM) está envolvido na transição de crises límbicas convulsivas e na generalização de crises do telencéfalo basal. Estudos clínicos e metabólicos recentes sugerem o envolvimento da porção mediodorsal do tálamo na atividade convulsiva motora.⁽⁸⁷⁾

No grupo 30 dias, encontramos que os núcleos laterais anteriores do tálamo LDVL e LDDM, e laterais posteriores LPLR e LPMR foram afetados, principalmente nos animais que realizaram maior número de CRE, ao passo que no grupo 24 a degeneração dessas estruturas foi escassa. Nesses animais, estes núcleos laterais do tálamo foram positivamente correlacionados com a frequência de CRE. Núcleos talâmicos laterais projetam-se bilateralmente para o córtex parietal posterior e, além disso, são interconectados com a amígdala lateral, portanto, a atividade da amígdala pode se espalhar por este núcleo. Esta extensa lesão que encontramos nestes núcleos laterais pode estar associada a hiperatividade do circuito talâmico-cortical.⁽⁸⁷⁾

O tálamo é rico em conexões com o córtex cerebral e o sistema límbico. Estas conexões participam da transmissão sensorial e sinais motores, juntamente a regulação da consciência, sono, e alerta em condições fisiológicas, e estão possivelmente

envolvidas na gênese e propagação de crises parciais e generalizadas.⁽⁸⁸⁾ O tálamo comunica áreas corticais com a maioria das outras áreas do sistema límbico, sendo que a ativação do circuito do tálamo pode estar associado a consciência e diversas formas de inconsciência. Além disso, participa de eventos de contração muscular, planejamento e execução comportamental.⁽⁷⁵⁾ Também está associado à fisiopatologia de crises de ausência e mioclônicas.⁽⁸⁷⁾

Estudos clínicos e experimentais, usando técnicas de neuroimagem como SPECT e PET, mostram alterações de perfusão talâmica e metabolismo em pacientes com epilepsia parcial, e também indicam que o tálamo participa dos circuitos neuronais envolvidos da ELT. Contudo, ainda não são bem compreendidos os mecanismos que resultam na alteração patológica do tálamo, podendo ser resultante de uma lesão inicial, crises contínuas ou mesmo consequência da epilepsia crônica, envolvendo conexões com o sistema límbico.^(89,87) Teorias recentes sugerem que o hipocampo e o tálamo possuem papéis distintos, porém ambos estão relacionados com a memória episódica. Stewart et al, ⁽⁹⁰⁾ analisando medidas volumétricas do hipocampo e tálamo em ressonância magnética, diferenciaram o comprometimento da memória proveniente de ambas as estruturas, e concluíram que ambas contribuem para o funcionamento da memória episódica em pacientes com TLE, mas confirmando que o hipocampo suporta memória de longo prazo de codificação e armazenamento, enquanto o tálamo está implicado nos aspectos executivos da memória episódica.⁽⁹⁰⁾

Yong-Hua Li et al,⁽⁸⁸⁾ estudando os caracteres eletrofisiológicos das atividades neuronais e o fluxo de informações entre hipocampo e tálamo durante as crises induzidas por pilocarpina em camundongos, encontraram que no período de iniciação das crises a informação era transmitida do tálamo para o hipocampo, e quando o tálamo

foi bloqueado com tetrodoxina, resultou na supressão das crises. Isto mostra que o tálamo pode possuir importante papel nos mecanismos de iniciação.⁽⁸⁸⁾ Por outro lado, Neubauer et al,⁽⁹¹⁾ encontraram o tálamo como secundário na geração e propagação de crises, constatando o papel central da atividade do neocórtex no início e propagação das crises, com recrutamento secundário do tálamo.⁽⁹¹⁾

Em contrapartida, o tálamo tem sido estudado como uma nova alternativa para o tratamento da epilepsia refratária, através da sua estimulação profunda com eletrodos. Wang et al,⁽⁹²⁾ realizaram um estudo de estimulação de baixa frequência do núcleo anterior do tálamo em ratos submetidos a epilepsia crônica, e constatararam que o método é altamente eficiente na diminuição da frequência de CRE e descargas interictais, além de melhorar a performance dos animais em testes espaciais e cognitivos.⁽⁹²⁾ Além disso, estudos de estimulação profunda do tálamo também sugerem uma estreita ligação dessa estrutura com o hipocampo, pela melhora das crises, que geralmente são iniciadas no hipocampo, e por ter sido descrita a diminuição das concentrações de glutamato e aumento de GABA no hipocampo após estimulação do tálamo.⁽⁸⁸⁾ A estimulação do tálamo, portanto, pode contribuir com importante papel no tratamento clínico da epilepsia refratária.

Com relação ao hipotálamo, avaliamos a porção do núcleo premamilar ventral (PMV), e encontramos maior degeneração no nível posterior. Isto provavelmente se deve às diferentes conexões do hipotálamo com as estruturas límbicas, que diferem de um nível para o outro. Nossos achados foram consistentes com o de Scoll et al,⁽⁷⁶⁾ no modelo de pilocarpina sistêmica, em que houve restrita degeneração no hipotálamo, mas que foi presente no núcleo PMV. Em contrapartida, no trabalho de Castro et al, com o modelo H-PILO, não foi encontrada degeneração neste núcleo do hipotálamo. Isto

também sugere conexões do hipotálamo com a amígdala, mas não diretamente com o hipocampo. O hipotálamo é uma estrutura responsável pelo controle do sistema autonômico, associada ao controle hormonal (eixo hipotálamo-hipofisário) e às funções sexuais. Uma lesão neuronal hipotalâmica pode ocasionar alteração da atividade autonômica, sexual e alterações de peso nos indivíduos, gerando prejuízos à qualidade de vida do paciente. Uma média de 38 a 71% dos homens e 14 a 50% das mulheres portadores de epilepsia são afetados por problemas no desempenho sexual.⁽⁹³⁾ Estudos clínicos de Janousek et al⁽⁹⁴⁾ Ladino et al⁽⁹⁵⁾ sugerem que há uma associação entre a obesidade e a epilepsia. Vias específicas do SNC, associadas aos mecanismos de regulação hipotalâmicos, podem estar associadas ao ganho de peso na epilepsia, o que mostra o estudo de St-Pierre et al⁽⁹⁶⁾ com modelos animais.

Outros exemplos que associam a obesidade e epilepsia podem ser encontrados em Hum et al⁽⁹⁷⁾ e Metzler-Baddeley et al,⁽⁹⁸⁾ que detectaram essa associação em um modelo de epilepsia por estimulação elétrica da amígdala em animais e Davidson et al,⁽⁹⁹⁾ em estudos clínicos com seres humanos. Além destes, estudos em modelo de epilepsia induzida por pilocarpina sistêmica em ratos machos e fêmeas, como os de Ruiz et al⁽¹⁰⁰⁾ e Scharman et al⁽¹⁰¹⁾, respectivamente, observaram aumento do ganho de peso e gordura corporal dos animais epiléticos quando comparados aos controles. No entanto, no presente modelo, até 30 dias após o SE, não detectamos essa característica, pois o peso corporal dos grupos Ctrl e SE foi similar durante todo o experimento. Diferenças do modelo, protocolo experimental e no gênero dos animais podem explicar nosso resultado. No entanto, estas alterações podem depender de outros fatores como o ambiente e condições genéticas, podendo ser multifatoriais. Em resumo, o papel do hipotálamo na ELT tem sido pouco estudado.

Em conclusão, o presente modelo mostra que o SE induzido por pilocarpina na amígdala de ratos, assim como em outros modelos de pilocarpina sistêmica, provoca dano restrito no hipotálamo e em núcleos talâmicos funcionalmente heterogêneos.

4.8 Considerações finais

De maneira geral, estudos com ELT enfatizam a neuropatologia do hipocampo, visto que a esclerose hipocampal é um achado muito comum nos pacientes com ELT. No entanto, recentes estudos neuropatológicos em pacientes com ELT evidenciam que a lesão neuronal não se restringe apenas a esclerose hipocampal, mas também se associa a outras estruturas parahipocampais, como a amígdala e outras estruturas do sistema límbico. Estes estudos também têm demonstrado que a amígdala é bastante suscetível a gerar crises epiléticas e já foi descrito que a atividade epilética originada na amígdala (por estimulação elétrica) pode gerar danos a outras estruturas do lobo temporal, pela alta conectividade dos circuitos amígdaloídes com o sistema límbico, podendo exercer papel no processo de epileptogênese. O modelo de pilocarpina na amígdala, do presente estudo, mostrou esta relação, confirmando a alta atividade da amígdala, susceptibilidade a gerar crises epiléticas e a lesão neuronal em diversas estruturas límbicas.

Já foi descrito em várias revisões ⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾ que a ELT pode ser um fenômeno que requer a atividade neuronal de muitas estruturas para manifestar as características de uma crise epilética. Assim, existe um substrato anatômico e funcional para a excitabilidade alterada entre estas regiões, que poderia permitir a atividade convulsiva localizada no lobo temporal, mesmo quando a degeneração neuronal do hipocampo é modesta ou inconsistente, como encontrado no presente estudo no grupo 24 horas.

Encontramos lesão neuronal em todos os animais estudados, que foi diretamente

associada à duração e gravidade do SE e, no caso do grupo 30 dias, à frequência das CRE. Uma vez que alguns núcleos foram mais afetados e outros não, nossos resultados indicam que existem diferentes circuitos de hiperexcitabilidade. A maior suscetibilidade à neurodegeneração dessas estruturas deve estar relacionada aos mecanismos neuronais envolvidos na iniciação das crises. Além disso, a lesão neuronal foi bastante localizada e seletiva, similar aos achados em seres humanos, e similar à maioria das estruturas entre o nível anterior e posterior, mostrando que o estímulo iniciado na amígdala propaga a lesão neuronal provavelmente pela alta conectividade dos circuitos límbicos. Observamos também, no presente modelo, que a lesão neuronal pode se modificar e “lateralizar” em função do tempo (fase da epilepsia), uma vez que encontramos diferenças na lesão dos hemisférios cerebrais entre os grupos agudo e crônico, de predominância unilateral e bilateral, respectivamente.

Finalmente, o modelo de injeção de pilocarpina na amígdala de ratos *Wistar* conseguiu reproduzir de forma eficaz o curso da ELT que ocorre em seres humanos, iniciando-se pela lesão precipitante inicial (SE) que, após um período de latência desencadeou a fase da epilepsia crônica e a presença de CRE, e posteriormente lesão neuronal de estruturas límbicas, que aparentou-se definida e bem localizada, similar aos achados humanos. Além disso, foi demonstrado que, quando o estímulo é iniciado na amígdala, uma rede de estruturas é afetada, tanto estrutural como funcionalmente, desencadeando crises epiléticas e conseqüente morte neuronal, confirmando o importante papel que a amígdala exerce na iniciação das crises epiléticas e fisiopatologia da ELT.

5. CONCLUSÕES

- A injeção de pilocarpina no complexo amigdalár em ratos *Wistar* induz SE e todas as fases da epilepsia já descritas em seres humanos – a LPI e, após um período de latência, seguido de epilepsia crônica, com CRE e lesão neuropatológica de estruturas límbicas.
- O modelo mostra-se eficiente, específico, de baixa mortalidade para os estudos “*in vivo*”.
- O modelo evidencia que atividade epiléptica originada na amígdala pode gerar danos a muitas outras estruturas do lobo temporal, provavelmente pela alta conectividade dos circuitos amígdaloídes com o sistema límbico.
- Os resultados deste estudo contribuirão a médio ou longo prazo com a caracterização do papel da amígdala na fisiopatologia da ELT e suas comorbidades.

6. REFERÊNCIAS

1. Fisher RS, Boas WVE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel JJ. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46(4): 470-2.
2. Guilhoto LMFF, Muszkat RS, Yacubian EMT. Consenso Terminológico da Associação Brasileira de Epilepsia. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2006; 12(3):175-177.
3. Liik M, Vahter L, Gross-Paju K, Haldre S. Cognitive profile and depressive symptoms in patients with epilepsy. *Medicina (Kaunas)* 2013; 49(6):254-61.
4. Organização Mundial da Saúde – OMS - WHOQOL Measureing quality of life. Geneva: Division of mental health and prevention of substance abuse, 1997.
5. Li LM, Fernandes PT, Noronha AL, Marques LH, Borges MA, Cendes F, et al. Demonstration projetct on epilepsy in Brazil: situation assessment. *Arq Neuropsiquiatr*, 2007; 1:5-13.
6. Meyer AC, Dua T, Ma J, Saxena S, Birbeck G. Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review. *Bull World Health Organ* 2010; 88(4):1564-0604.
7. Neto JG, Marchetti RL. Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy . *Rev Bras Psiquiatr* 2005; 27(4):232-38.
8. World health organization - WHO (2015). Consultado dia 29/07/2016: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>>.
9. Murray MI, Halpern MT, Leppik IE (1996) aput department of health education and welfare, national institutes of health, plan for nationwide action on epilepsy, DHEW, 1978 and Silfvenius, H., Economic costs of epilepsy--treatment benefits, 1988. *Epilepsy Research*, 1996; 23:139-148.
10. Noronha ALA, Borges MA, Marques LHN, Zanetta DMT, Fernandes PT, Boer H, et. al. Prevalence and Pattern of Epilepsy Treatment in Different Socioeconomic Classes in Brazil. *Epilepsia* 2007; 48(5):880-885.
11. Ministério da saúde. DataSUS. Consultado no dia 05/011/2016: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>>.

12. Guedes FA, Galvis-Alonso OY, Leite JP. Plasticidade Neuronal Associada à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial: Insights a partir de Estudos em Humanos e em Modelos Animais. *J Epilepsy Clin Neurophysiology* 2006; 12(1):10-17.
13. Andrade-Valença LPA, Valença MM, Velasco TR, Leite, JP. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2006; 12(1):31-36.
14. Engel JR. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 2001; 7(4): 340-52.
15. Tellez-Zenteno, JF; Pattern SB; Jetté N, et al. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population –based analysis. *Epilepsia* 2007; 48: 2336-44.
16. Kanner AM, Schachter SC, Barry JJ, Harsdorffer DC, Mula M, Trimble M et al. Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence. *Epilepsy Behav* 2012; 24 (2):1525-5069.
17. Cleary RA, Baxendale SA, Thompson PJ, Foong J. Predicting and preventing psychopathology following temporal lobe epilepsy surgery. *Epilepsy Behav* 2013; 26(3): 322-34.
18. Shorvon S. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia* 2011; 52(6):1052-1057.
19. Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JI. *An Introduction to Epilepsy*, West Hartford (CT): American Epilepsy Society, 2006.
20. ILAE – Commission on Classification and Terminology of the International League
21. *Against Epilepsy. Proposal for Revised Classification of Epilepsy and Epileptic Syndrome.* *Epilepsia* 1989; 30:389-99.
22. Blume-chair WT, Mizrahi E, Tassinari C, Boas WVE, Engel J. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ilae task force on classification and terminolgy. *Epilepsia* 2001; 42 (9):1212-1218.
23. Torres CM. Fatores de risco para transtornos de ansiedade na epilepsia do lobo temporal [dissertação]. Porto Alegre (RS): UFRGS; 2010.
24. French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol* 1993; 34(6):774-780.

25. Yacubian EMT. Tratamento da epilepsia na infância. *Jornal de Pediatria* 2002; 78 (1): 19-27.
26. Jones DM, Esmacil N, Maren S, Macdonald RL. Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Research* 2002; 50(3):301-312.
27. Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK; Quinn B, Peacock WJ, Babb TL. Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprout during postnatal granule cell migration and differentiation. *Brain Res Dev Brain Res* 1994; 78(1): 70-80.
28. Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman, KM, Kuhlman, PA. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 1996; 26(1): 151-161.
29. Sendrowski K, Sobaniec W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacol Rep* 2013; 65(3):555-65.
30. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 1991; 42:351-63.
31. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 1985; 5:1016-22.
32. Zhang W, Thamattoor AK, LeRoy C, Buckmaster PS. Surviving mossy cells enlarge and receive more excitatory synaptic input in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2015; 25(5):1098-1063.
33. Bonilha L, Nesland T, Martz GU, Joseph JE, Spampinato MV, Edwards JC. Medial temporal lobe epilepsy is associated with neuronal fibre loss and paradoxical increase in structural connectivity of limbic structures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83(9): 903-9.
34. Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res* 2002; 135:237-51.
35. Cúria G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 2008; 172(2):143-157.
36. Fernandes MJS. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estud av* 2013; 27(77): 85-96.

37. Losher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011; 20(5): 359-68.
38. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolloto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous I Recurrent Seizures. *Epilepsia* 1991; 32(6):778-782.
39. Mello EAM, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, et al. Circuit Mechanisms of Seizures in the Pilocarpine Model of Chronic Epilepsy: Cell Loss and Mossy Fiber Sprouting. *Epilepsia* 1993; 34(6):985-995.
40. Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Experimental Brain Research* 1995; 102(3):423-428.
41. Davis M, Walker DL, Milles L, Grillon C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35 (1):105-135.
42. Prince JL.; Russchen FT.; Amaral DG *apud* Alvez DM. The limbic region. II: The amygdaloid complex. New York: Elsevier Science, 1987.
43. McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 1998, 55 (3):257-332.
44. Alvez DM. Estimativa da densidade de neurônios da amígdala basolateral e central e avaliação comportamental de camundongos sob o uso de esteroides anabolizantes [dissertação] Alfenas (MT): Universidade Federal de Alfenas; 2015.
45. Willians LM, Das P, Liddell BJ, Kemp AH, Rennie CJ, Gordon E. Mode of functional connectivity in amygdala pathways dissociates level of awareness for signals of fear. *J Neurosci* 2006; 26 (36): 9264-9271.
46. Maren S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci* 1999; 22(12):561-567.
47. Benini R, Avolli M. Altered inhibition in lateral amygdala networks in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 2006; 95(4):2143-2154.
48. Rosenkranz JA, Venheim ER, Padival M. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biol Psychiatry* 2010; 67(12):1128-1136.

49. Bernhardt BC, Kim H., Bernasconi N. Patterns of subregional mesiotemporal disease progression in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2013; 19(21):1840-7.
50. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol.* 1969; 25(3):295-330.
51. Le Gal La Salle G. Amygdaloid organization related to the kindling effect. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl.* 1982; 36:239-48.
52. Prager EM, Aroniadou-Anderjaska V, Almeida-Suhett CP, Figueiredo TH, Apland JP, Braga MF. Acetylcholinesterase inhibition in the basolateral amygdala plays a key role in the induction of status epilepticus after soman exposure. *Neurotoxicology* 2013; 38:84-90.
53. Nissinen J, Halonen T, Koivisto E, Pitkänen A. A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Res.* 2000; 38(2-3):177-205.
54. Brandt C, Glien M, Potschka H, Volk H, Löscher W. Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. *Epilepsy Res.* 2003; 55(1-2):83-103.
55. Mouri G, Jimenez-Mateos E, Engel T, Dunleavy M, Hatazaki S, Paucard A, Matsushima S, Taki W, Henshall DC. Unilateral hippocampal CA3-predominant damage and short latency epileptogenesis after intra-amygdala microinjection of kainic acid in mice. *Brain Res.* 2008; 5;1213:140-51.
56. Yi PL, Lu CY, Cheng CH, Tsai YF, Lin CT, Chang FC. Activation of amygdala opioid receptors by electroacupuncture of Feng-Chi (GB20) acupoints exacerbates focal epilepsy. *BMC Complement Altern Med.* 2013; 29;13:290.
57. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1972; 32:281-294.
58. Schmued LC, Albertson C, Slikker WJ. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 1997, 751(1)37-46.
59. Paxinos G, Watson C. *The rat brain stereotaxic Coordinates.* Elsevier 2007, 6th ed. Amsterdam.

60. Covolan L, Mello LEAM. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Research* 2000, 39:133-152.
61. Furtado Mde A, Braga GK, Oliveira JA, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*. 2002;43 (5):37-9.
62. Rattka M, Brandt C, Löscher W. The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: Epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. *Epilepsy Research* 2013, 103:135-152.
63. Bortel A, Levésque M, Biagini G, Gotman J, Avoli M. Convulsive status epilepticus duration as determinant for epileptogenesis and interictal discharge generation in the rat limbic system. *Neurobiology of Disease* 2010; 40(2): 478–489.
64. Bumanglag, A.V., Sloviter, R.S. Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. *J. Comp. Neurol.* 2008; 510, 561–580.
65. El-Hassar, L., Milh, M., Wendling, F., Ferrand, N., Esclapez, M., Bernard, C. Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. *J. Physiol.* 2007; 578, 193–211.
66. Goffin, K., Nissinen, J., Van Laere, K., Pitkänen, A. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Exp. Neurol.* 2007; 205, 501–505.
67. Lopim GM, Campos DV, Silva SG, Almeida AA, Lent R, Cavalheiro EA, Arida RM. Relationship between seizure frequency and number of neuronal and non-neuronal cells in the hippocampus throughout the life of rats with epilepsy. *Brain Research* 2016, 1634:179-186.
68. Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*, 1990; 14:511-7.
69. Arida RM, Scorza FA, Peres CA, Cavalheiro EA. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* 1999, 34:99-107.

70. Elwes, R.D.C., Johnson, A.L., Reynolds, E.H., 1988. The course of untreated epilepsy. *Br. Med. J.* 297, 948–950.
71. Gilad, R., Lampl, Y., Gabbay, U., Eshel, Y., Sarova-Pinhas, I., 1996. Early treatment of a single generalized tonic-clonic seizure to prevent recurrence. *Arch. Neurol.* 53, 1149–1152.
72. Quigg M, Straume M, Menaker M, Bertam EH. Temporal distribution of partial seizures: Comparison of an animal model with human partial epilepsy. *Annals of Neurology*, 1998; 43(6):748-755.
73. Raedt R, Dycke AV, Melkebeke DV, Smedt TD, Claeys P, Wyckhuys T, Vonck K, Wadman W, Boon P. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurologica*, 2009; 119(5):293-303.
74. Lemos T, Cavaleiro EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp. Brain Res* 1995, 102:423-428.
75. Castro OW, Furtado MA, Tilelli CQ, Fernandes A, Pajolla GP, Garcia-Cairasco N. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of Fluoro-Jade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res* 2011, 1374:43-55.
76. Scholl EA, Dudek FE, Ekstrand JJ. Neuronal degeneration is observed in multiple regions outside the hippocampus after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in the immature rat. *Neuroscience*. 2013; 12;252:45-59.
77. Freund TF, Ylinen A, Miettinen R, Pitkänen A, Lahtinen H, Baimbridge KG, Riekkinen PJ. Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res Bull.* 1992; 28(1):27-38.
78. Choi YS, Lin SL, Lee B, Kurup P, Cho HY, Naegele JR, Lombroso PJ, Obrietan K. Status epilepticus-induced somatostatinergic hilar interneuron degeneration is regulated by striatal enriched protein tyrosine phosphatase. *J Neurosci.* 2007; 14;27(11):2999-3009.
79. Aplan JP, Figueredo TH, Qashu F, Aroniadou-Anderjaska V, Souza AP, Braga MFM. Higher susceptibility of the ventral versus the dorsal hippocampus and the posteroventral versus anterodorsal amygdala to soman-induced neuropathology. *NeuroToxicology*, 2010; 31; 485–492.

80. Nissinen, J.T.P., Pitkänen, A., Koivisto, E., Halonen, T.O. Appearance of spontaneous seizures in a new experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsia*, 1996.
81. Pitkanen A, Tuunanen J, Kalviainen R, Partanen K, Salmenpera T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1998, 32:233–253.
82. Cádiz-Moretti B, Otero-García M, Martínez-García F, Lanuza E. Afferent projections to the different medial amygdala subdivisions: a retrograde tracing study in the mouse. *Brain Struct Funct* 2016; 221(2):1033-65.
83. Aroniadou-Anderjaska V, Fritsch B, Qashu F, Braga MFM. Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Research* 2008; 78:102-116.
84. Vismar MS, Forcelli PA, Skopin MD, Gale K, Koubeissi MZ. The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. *Frontiers in Neural Circuits*, 2015; 9:27.
85. Vaughan DN, Jackson GD. The piriform cortex and human focal epilepsy. *Frontiers in Neurology* 2014; 5:1-18.
86. Biagini G, D'Antuono M, Benini R, Guzman P, Longo D, Avoli M. Perirhinal cortex and temporal lobe epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2013; 7:1-10.
87. Druga R, Mares P, Otáhal J, Kubová H. Degenerative neuronal changes in the rat thalamus induced by status epilepticus at different developmental stages. *Epilepsy Research* 2005, 63:43-65.
88. Yong-Hua Li, Jia-Jia Li, Qin-Chi Lu, Hai-Qing Gong, Pei-Ji Liang, Pu-Ming Zhang. Involvement of Thalamus in Initiation of Epileptic Seizures Induced by Pilocarpine in Mice. *Neural Plasticity* 2014.
89. Sinjab B, Martinian L, Sisodiya SM, Thom M. Regional thalamic neuropathology in patients with hippocampal sclerosis and epilepsy: A postmortem study. *Epilepsia*, 2013; 54: 2125–2133.
90. Stewart CC, Griffith HR, Okonkwo OC, Martin RC, Knowlton RK, Richardson EJ, Hermann BP, Seidenberg M. Contributions of volumetrics of the

- hippocampus and thalamus to verbal memory in temporal lobe epilepsy patients. *Brain and Cognition*, 2009; 69:65-72.
91. Neubauer FB, Sederberg A, MacLean JN. Local changes in neocortical circuit dynamics coincide with the spread of seizures to thalamus in a model of epilepsy. *Front. Neural Circuits*, 2014.
 92. Yi Wang, Jiao Liang, Cenglin Xu, Ying Wang, Yifang Kuang, Zhenghao Xu, et al. Low-frequency stimulation in anterior nucleus of thalamus alleviates kainate-induced chronic epilepsy and modulates the hippocampal EEG rhythm. *Experimental Neurology* 2016, 276:22-30.
 93. Silva HÁ, Carvalho JC, Jorge CL, Neto MBC, Goes PM, Yacubian EMT. Alterações sexuais na epilepsia Arq Neuropsiquiatr, 1999; 57(3-B): 798 -807.
 94. Janousek J, Barber A, Goldman L, Klein P. Obesity in adults with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2013; 28(3):391-394.
 95. Ladino LD, Hernández-Ronquillo L, Téllez-Zenteno JF. Obesity and its association with generalised epilepsy, idiopathic syndrome, and family history of epilepsy. *Epileptic Disord* 2014; 16(3):343-353.
 96. St-Pierre LS, Bubenik GA, Parker GH, Persinger MA. Insidious weight gain in prepubertal seized rats treated with an atypical neuroleptic: the role of food consumption, fluid consumption and spontaneous ambulatory activity. *Epilepsy Behav.* 2009; 14:288-92.
 97. Hum KM, Megna S, Burnham WM. Lack of laterality in the effects of right and left amygdala kindling on weight gain in female rats. *Epilepsy Res* 2009; 87:40-46.
 98. Metzler-Baddeley C, Baddeley RJ, Jones DK, Aggleton JP, O'Sullivan MJ. Individual differences in fornix microstructure and body mass index. *PLoS One* 2013; 8: e59849.
 99. Davidson TL, Chan K, Jarrard LE, Kanoski SE, Clegg DJ, Benoit SC. Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation. *Hippocampus* 2008; 19:235-52.
 100. Ruiz LF, Pacheco B, Farrell CB, Cox BS, Ermolinsky ER, Garrido-Sanabria SN. Metabolic gene expression changes in the hippocampus of obese epileptic

- male rats in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 2011; 1426:86-95.
101. Scharfman HE, Kim M, Hintz BS, MacLusky NJ. Seizures and reproductive function: insights from female rats with epilepsy. *Ann. Neurol.* 2008; 64(6):687-697.
 102. Spencer SS. Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia* 2002; 43:219–227.
 103. Bertram EH. Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav* 2009; 14:32–37.
 104. Laufs H. Functional imaging of seizures and epilepsy: evolution from zones to networks. *Curr Opin Neurol.* 2012; 25(2):194-200.

ANEXO I – Materiais utilizados nos experimentos

1) Cirurgia Estereotáxica

Medicamentos:

- ✓ Acepromazina - 1 mg/kg (subcutânea; s.c)
- ✓ Ketamina - 50 mg/kg (intraperitoneal, i.p)
- ✓ Xilazina - 10 mg/kg (intraperitoneal, i.p)
- ✓ Cloridrato de prilocaína com felipressina (Cloridrato de Prilocaína – 30 mg/ml; Felipressina – 0,03 UI/ml; Veículo estéril - cloreto de sódio, metilparabeno, hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico q.s.p. pH, água para injetáveis – *Cristália Produtos Químicos Farmaceuticos LTDA*) – 0,1 ml
- ✓ Pentabiótico (Benzilpenicilina benzatina - 1.200.000 UI/ml; Benzilpenicilina procaína - 600.000 UI/ml; Benzilpenicilina potássica – 600.000 UI/ml; Diidroestreptomicina base (sulfato) – 500 mg/ml; Estreptomicina base (sulfato) – 500 mg/ml; *Fort Dodge Saúde Animal LTDA*) – 100.000 U.I/kg de peso.
- ✓ Flunixinina Meglunine – 1 mg/kg (subcutânea; s.c)

Equipamentos

- ✓ Mesa contendo aparelho estereotáxico e lâmpada cirúrgica;
- ✓ Cânula intracerebral - 14 mm de comprimento (fabricada a partir de agulha 23G1 – 25 x 0,6 mm);
- ✓ Parafusos de relógio – aço inoxidável;
- ✓ Mandril – aço inoxidável;
- ✓ Tesoura de ponta fina;
- ✓ Pinça lisa;
- ✓ Pinça dente-de-rato;
- ✓ Bolas de algodão esterilizado – assepsia;
- ✓ Álcool 70%;
- ✓ Álcool Iodado;
- ✓ Tubos de citocaína (anestesia local);
- ✓ Acrílico acetopolimerizante – confecção do capacete;
- ✓ Equipamentos de proteção individual – luva, máscara e toca cirúrgica e avental.

2) Sistema para indução do SE

- ✓ Pilocarpina - 0,9 mg/ul – diluída em 20 ul de solução salina 0,9% (intracerebral; i.c);
- ✓ Diazepam – 10 mg/kg (intraperitoneal; i.p)
- ✓ Microseringa – 1 ul;
- ✓ Cateter de polietileno;
- ✓ Microagulha;

- ✓ Pipetas e ponteiras correspondentes;
- ✓ Álcool e água estéril – limpeza dos cateteres;
- ✓ Caixas de acrílico.
- ✓ Sistema de vídeo – câmera conectada ao monitor de computador

3) **Registro crônico**

- ✓ Caixas de acrílico – em estante
- ✓ Câmeras – uma por caixa
- ✓ Monitor de computador
- ✓ Nobreak

4) **Perfusão cerebral**

- ✓ Heparina – 250 UI/kg, onde UI = Unidade Internacional (subcutânea; s.c);
- ✓ Tiopental Sódico – 100 mg/kg (intraperitoneal; i.p);
- ✓ Caixas de plástico grandes
- ✓ Sistema de soro contendo:
 - Solução de PBS: 280 ml (30 ml de PBS 0,1M; 200 ml de PFA 4% em PBS 0,1M – fixação e 50 ml de PFA 4% em 0,1M - para pós fixação).
 - Tubo de soro fisiológico 0,9% - 50 ml
 - Cânula transcardíaca – agulha 16G (1,60 x 40 mm, sem bisel);
- ✓ Tesoura de ponta-romba
- ✓ Pinça dente-de-rato
- ✓ Pinça lisa

5) **Processamento e inclusão de tecidos**

- ✓ Aparelho processador;
- ✓ Cestas com cassetes contendo os cérebros;
- ✓ Etanol 70%;
- ✓ Etanol 80%;
- ✓ Etanol 90%
- ✓ Etanol 95%;
- ✓ Etanol absoluto I, II, III e IV;
- ✓ Etanol 50% - xileno 50%;
- ✓ Xileno I, II e III;
- ✓ Parafina I, II e III;
- ✓ Equipamento inclusor de parafina;
- ✓ Moldes de alumínio para inclusão.

6) Colorações histológicas

FJC

- ✓ Estufa histológica;
- ✓ Balança analítica;
- ✓ Água destilada;
- ✓ Pipetas;
- ✓ Xilol I, II e III;
- ✓ Xilol 50%: álcool 50%;
- ✓ Etanol absoluto;
- ✓ Álcool básico (20 ml de NaOH 1% + 80 ml Etanol Absoluto);
- ✓ Etanol 70%;
- ✓ Permanganato de potássio 0,006% (10 min);
- ✓ Solução de FJ-C 0,0001% - dissolvido em ácido acético 0,1%;
- ✓ DPX – para montagem;
- ✓ Lamínulas.

• Preparo da solução de trabalho FJ-C

1. Solução stock de FJ-C 0,01 %: dissolver 10 mg de FJ-C em 100 ml de água destilada. Esta solução pode ser guardada durante alguns meses, na geladeira e no escuro.

2. Solução de trabalho de FJ-C: 1 ml da solução “stock” de Fj-C + 99 ml de ácido acético 0,1 %. Esta solução deve ser preparada cada vez que vai ser utilizada. Não deve ser armazenada para futuro.

HE

- ✓ Estufa histológica;
- ✓ Balança analítica;
- ✓ Hematoxilina;
- ✓ Eosina;
- ✓ Xilol I, II e III;
- ✓ Álcool Abs. I e II;
- ✓ Álcool 50%;
- ✓ Álcool 70%;
- ✓ Álcool 80%;
- ✓ Água;
- ✓ HCl 1%;
- ✓ Verniz transparente;
- ✓ Lamínulas.

7) Sistema de aquisição de imagens de microscopia

- ✓ Computador
- ✓ Microscópio OLYMPUS BX53
- ✓ Câmara Retiga 4000R de alta resolução
- ✓ Lâminas histológicas – coradas

8) Softwares de análises

- ✓ *Image Pro Plus (versão)* – aquisição de imagens em microscópio
- ✓ *Image J 1.46 r (National Institute of Health)* – contagem neuronal
- ✓ *Mejia* – análise comportamental do *status epilepticus*
- ✓ *Nero Show Times* – análise comportamental crônica
- ✓ *Graph Prism 6.0* – análise estatística

ANEXO II – Carta de Aprovação Comitê de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Autarquia Estadual – Lei nº 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)



Licença CEUA 04/2014
São José do Rio Preto 23 de Julho de 2014.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEUA/FAMERP, em reunião, analisou o Protocolo FAMERP nº: **001-003258/2014** referente ao projeto intitulado **“Caracterização comportamental e neuropatológica do efeito do *status epilepticus* induzido por aplicação de pilocarpina na amígdala de ratos Wistar adultos.”**, sob responsabilidade da Profa. Dra. Orfa Yineth Galvis Alonso, deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002, concedendo a presente licença com a seguinte recomendação:

- Explique-se o número de animais no grupo controle.

Atenção: **Até 30 dias após a finalização do projeto**, o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final disponível no site e enviar à CEUA. O descumprimento desta obrigação poderá prejudicar o andamento de futuras solicitações.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Orfa Yineth Galvis Alonso
Pesquisadora Responsável pelo Projeto

Prof. Dr. Júlio César André
Presidente CEUA