

Evolução temporal do hipersincronismo fase-amplitude no modelo de crises epilépticas induzido por pentilenotetrazol

Jasiara Carla de Oliveira¹, Sofia Maria Amorim Falco Rodrigues¹, Renato Marciano Maciel¹, Larissa Altoé Réboli¹, Vinícius Rosa Cota^{1*}

¹Laboratório Interdisciplinar de Neuroengenharia e Neurociências,

*Departamento de Engenharia Elétrica (DEPEL), Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei, Minas Gerais, Brasil

Resumo: Epilepsia é caracterizada por um estado de permanente hiperexcitabilidade do tecido neural. A crise epiléptica, expressão comportamental e neurobiológica desta hiperexcitabilidade, também depende, por outro lado, do acoplamento hipersincrônico de osciladores neurais. No entanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos e propriedades desta sincronização aumentada. O objetivo deste trabalho foi investigar a existência do hipersincronismo neural, durante a evolução das crises agudas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), e caracterizá-lo por meio do índice de modulação (IM), técnica capaz de medir o acoplamento entre a fase e a amplitude de duas bandas de frequências distintas. Para as análises foram comparados registros eletrofisiológicos de um grupo de animais em livre movimento, controle (CTRL), e outro grupo em que os animais recebiam infusão controlada de PTZ. A partir destes registros verificou-se a existência de acoplamentos entre fase e amplitude de faixas de frequências específicas, considerando o aumento do IM durante a evolução da crise do grupo PTZ, com destaque para o acoplamento entre a fase das bandas 0-2 Hz e 2-6 Hz e a amplitude das faixas 8-14 Hz, 14-30 Hz e 30-60 Hz. Também foi possível observar uma provável complexa coordenação entre ritmos cerebrais e as fases ictais, além de sugerir a existência de uma hipersincronização na crise epiléptica, dado o aumento do IM conforme a evolução da crise induzida por PTZ. Estes resultados fornecem evidências sobre os fundamentos fisiopatológicos da dinâmica das crises mostrando uma provável hipersincronização ampla, bem como uma intrincada coordenação de ritmos e circuitos neurais subjacente ao processo ictogênico.

Palavras-chave: Hipersincronismo, Acoplamento entre frequências fase-amplitude, Índice de Modulação, Epilepsia, Crise, Pentilenotetrazol.

1 Introdução

Epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada pela ocorrência espontânea e recorrente de crises epilépticas, que são episódios de atividade neuronal aberrantemente intensa [1]. É uma doença grave e de grande prevalência mundial, afetando cerca de cinquenta milhões de pessoas em todo o mundo [2] e é considerada um problema de saúde pública, dado seu impacto biológico, social e econômico. Em sua grande maioria, os pacientes sofrem crises com perda de consciência e descontrole motor, o que ocasiona impedimento de conduzir veículos, praticar esportes e/ou ter acesso a um emprego e, conseqüentemente, isolamento social e estigma [3]. Os principais tratamentos na clínica médica atual para as epilepsias são o farmacológico [4] e o cirúrgico [5]. No entanto, uma parcela considerável não responde ao tratamento medicamentoso [6] e outra parte não possui um foco epileptogênico bem definido para encaminhamento à cirurgia [7].

A epilepsia é amplamente entendida como resultado de um desequilíbrio entre o tônus neuronal inibitório e excitatório com prevalência para a hiperexcitabilidade [1]. No entanto, há hoje um acúmulo de evidências que apontam que o aspecto hipersincronismo, e não só hiperexcitabilidade, é essencial para a compreensão da fenomenologia e, por conseguinte, para o tratamento da doença [8].

Sincronismo, por sua vez, pode ser definido como a relação motriz entre a dinâmica de dois sistemas oscilantes acoplados [9]. Dessa feita, os fenômenos de sincronização podem se manifestar de muitas maneiras diferentes [10]. Uma forma de sincronismo seria a interação dos ritmos em diferentes bandas, que é comumente chamada de acoplamento de frequências cruzadas (*cross frequency coupling* - CFC). Interações entre frequências podem ocorrer de diversas formas, conforme a característica oscilatória envolvida em cada dinâmica: potência-potência; fase-fase; amplitude-amplitude; correlação entre ciclos de frequências; correlação da potência ou amplitude de uma oscilação de alta frequência (OAF) com a fase de uma oscilação de baixa frequência (OBF) e etc. [11].

Em sistemas neurobiológicos, Jensen e Colgin mostraram que diferentes frequências de oscilações neurais podem interagir umas com as outras [12]. No hipocampo a fase teta (5-10 Hz) modula a amplitude de gama (30-100 Hz) podendo variar de acordo com as atividades cognitivas [13]. Estudos mostram que este acoplamento está envolvido no aprendizado e memória [14, 15]. A interação entre a fase de alfa ou beta e a amplitude de alto gama também foi mostrado no córtex sensorimotor humano e varia de acordo com as tarefas sensoriais, motoras e cognitivas [16]. O acoplamento entre frequências é, portanto, uma atividade fisiológica relevante que ocorre em diversas regiões cerebrais e espécies, denotando comportamentos variados.

Perturbações do sincronismo neural podem, por sua vez, levar à disfunção. Há relatos da existência, particularmente, de aberrações no acoplamento entre frequências no cérebro em condições patológicas, como na

epilepsia [17-20]. Um sincronismo neural reduzido contribui para o isolamento funcional dos focos epiléticos, enquanto uma maior sincronização pode promover o acoplamento entre várias populações neuronais e a disseminação da atividade aberrante, promovendo a ictogênese (processo de geração das crises epiléticas) [21-23]. A relação entre epileptogênese (processo de surgimento da condição epilética) e o hipersincronismo também foi relatada em estudos de modelagem computacional [24].

Nosso grupo de pesquisa acredita que abordar a ictogênese e a epileptogênese no nível do circuito neural, impedindo seu hipersincronismo, é uma estratégia terapêutica válida – e talvez superior – para tratar a epilepsia, sobretudo no caso de refratariedade [8, 25]. Para isso, modificamos a estimulação elétrica do sistema nervoso central, uma promissora alternativa terapêutica em casos de epilepsia refratária, para uma forma de baixa frequência média (4 pulsos por segundo), mas com os intervalos entre pulsos aleatórios. Aplicação da técnica (denominada NPS – *non periodic stimulation*) em modelos animais de crises agudas por pentilenotetrazol (PTZ) ou crônicas por pilocarpina mostrou que a NPS, entregue à amígdala uni ou bilateralmente, tem robusto poder anticonvulsivante [26, 27] bem como promove a inibição / dessincronização de estruturas do sistema límbico relacionadas à ictogênese [25, 28, 29].

Entretanto, apesar da relatada existência de hipersincronização no cérebro epilético, bem como o fato de que a hipotética interrupção desse processo (pela NPS, por exemplo) pode beneficiar quadros de epilepsia, pouco se sabe acerca da exata natureza dessa sincronização, qual o seu formato e características oscilatórias envolvidas, quais as regiões acometidas, bem como a relação do processo com distintos instantes de tempo na fenomenologia da epilepsia. Além disso, estudos acerca do sincronismo neural durante a atividade preictal, ictal e interictal forneceram novas perspectivas para o papel deste fenômeno na geração de atividade epilética [30-32]. Estes estudos apontam períodos específicos de diminuição do sincronismo neural, questionando a noção de que a sincronia é ubiquamente aumentada na epilepsia.

Este trabalho teve como objetivo aprofundar a investigação da existência e da natureza da hipersincronização dos circuitos neuronais na epilepsia. A investigação foi feita por meio do registro da atividade eletrográfica de substratos neurais envolvidos na ictogênese (hipocampo, tálamo e córtex), durante a evolução de uma crise epilética induzida por PTZ. O índice de modulação (IM) proposto por Tort et al. [33] foi usado para averiguar possíveis acoplamentos fase-amplitude entre distintas bandas de frequência. Esta técnica pode ser definida como uma adaptação da distância Kullback-Leibler, utilizada para o cálculo da semelhança entre duas distribuições distintas. No caso do IM, o cálculo da distância é aplicado à distribuição das relações de modulação existentes entre a fase de uma faixa de frequências mais lentas com a amplitude de uma faixa de frequências mais altas.

2 Metodologia

2.1 Animais e grupos

Foram usados ratos *Wistar* machos, pesando entre 250 e 320 gramas, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ), mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas em temperatura ambiente controlada, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA) desta universidade sob o protocolo 31/2014.

Um total de 17 animais foi aleatoriamente distribuído em dois grupos, um controle em que os animais passaram apenas por um registro eletrofisiológico basal, sem submissão a drogas (grupo CTRL, n=8) e outro grupo em que os animais foram registrados durante a infusão de agente químico proconvulsivante, pentilenotetrazol (ou PTZ) (grupo PTZ, n=9). O peso dos animais foi ajustado de maneira a não apresentar diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

2.2 Cirurgia Estereotáxica

Todos os animais, inclusive os controles, foram submetidos a um procedimento cirúrgico para implante e fixação de eletrodos de aço inoxidável, recobertos por Teflon®. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina na dose de 100 mg/kg (Vetanarcol, 50 mg/ml – Konig), xilazina intramuscular na dose de 5 mg/kg (Xilazin, 20 mg/ml – Syntec) e fentanil intramuscular, 0,025 mg/kg (Unifental, 50 mcg/ml – União Química). Após anestesia, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico para fixação do crânio, passaram por uma incisão oval do scalp e por uma trepanação, por meio de broca odontológica, dos ossos do crânio para implante de eletrodos monopolares (#7916, A-M Systems, Califórnia, EUA) para registro eletrofisiológico dos substratos envolvidos na ictogênese: hipocampo (HP) direito (AP: 2.8 mm; ML: +1.5 mm; DV: 3.3 mm a partir da Dura mater) e tálamo (TH) direito (AP: 3.0 mm; ML: +2.6 mm; DV: 6.0 mm a partir da Dura mater). Também foi implantado um microparafuso cirúrgico (comprimento 4,7 mm, diâmetro 1,17 mm, Fine Science Tools, Inc., North Vancouver, Canada) para registro cortical (CX) no hemisfério direito (AP: 6.0 mm; ML: +2.6 mm). Um segundo microparafuso cirúrgico foi fixado no osso frontal para ser usado como referência.

Todos os animais também passaram pelo implante de eletrodos bipolares (# 7914, A-M Systems, Califórnia, EUA) nas amígdalas direita e esquerda (AP = 2,8 mm, ML = $\pm 5,0$ mm referentes ao Bregma e 7,2 mm a

partir da Dura mater), sem, entretanto, serem usados. Estes implantes foram feitos a fim de que os resultados aqui encontrados possam ser usados em estudos futuros da nossa linha de pesquisa em estimulação elétrica, em comparação a outros animais que recebem a estimulação via eletrodos nas amígdalas.

A posição precisa dos eletrodos nos substratos alvos foi dada com o auxílio de um atlas neuroanatômico [34] e alcançada por intermédio dos eixos de coordenadas do aparelho estereotáxico. Os eletrodos e os microparafusos foram soldados a um conector RJ-45 de 8 pinos e este, por sua vez, fixado ao crânio do animal utilizando-se acrílico auto-polimerizante (Artigos Odontológicos Clássico Ltda). Após o procedimento cirúrgico e durante os cinco dias seguintes foram administrados antibiótico tópico (Dermolene – Ourofino) no escalpo e analgésico em gotas (Cetoprofeno, 20 mg/ml – Medley) por via oral. Após 11 dias de recuperação pós-cirúrgica, deu-se início aos experimentos.

2.3 Infusão de PTZ e registro eletrofisiológico

Após o período de recuperação pós-cirúrgico, os animais do grupo CTRL passaram por um período de registro eletrofisiológico basal mais gravação de vídeo em livre movimento ao longo de 600 segundos (s). Já os animais do grupo PTZ foram submetidos à infusão intravenosa da droga, realizada na taxa de infusão fixada em 10 mg/min (concentração de 10 mg/ml salina) enquanto eram registrados e filmados. A infusão do PTZ foi feita de forma controlada usando uma bomba de injeção da marca *Insight* (modelo EFF 311, Ribeirão Preto, Brasil) e por meio de um cateter introduzido em uma das veias laterais da cauda do animal. A infusão da droga foi interrompida no instante que cada animal desencadeou uma crise tônico-clônica generalizada (CTCG), estágio máximo da evolução de uma crise, em que circuitos neurais que envolvem prosencéfalo, mesencéfalo e tronco estão envolvidos.

Para o registro eletrofisiológico, os animais foram conectados a um equipamento de registro comercial (Modelo #3500, *A-M Systems*) para amplificação, filtragem e interface. Sua saída foi conectada a um conversor analógico-digital (PCI 6023E, *National Instruments*) controlado instrumento virtual desenvolvido em ambiente *Labview®* 2009. Os sinais de potencial de campo local (*local field potential* - LFP's) foram amplificados com ganho de 2000 V/V e filtrados na banda de 0,3 a 300 Hz. O sinal condicionado foi digitalizado a 1 KS/s, com resolução de 12 bits.

2.4 Processamento de sinais e análise – Índice de Modulação

O processamento necessário para o cálculo do IM, desenvolvido como rotinas de Matlab®, é dividido em duas etapas básicas: distribuição fase-amplitude do sinal e cálculo da distância de Kullback-Leibler modificada. Inicialmente, o sinal original é filtrado nas duas faixas de frequência de interesse no sincronismo (a da fase e a da amplitude). Por meio da transformada de Hilbert, obtêm-se as séries temporais das fases, bem como as séries temporais da amplitude de envelope, aplicando-se o cálculo ao respectivo sinal filtrado na etapa anterior. Agrupam-se os valores das séries temporais das fases e a média da amplitude sobre cada valor de fase é então calculada. Por último, normaliza-se esta amplitude média, obtendo a relação final fase-amplitude. O acoplamento fase-amplitude, medido por meio do IM proposto nesta técnica, é caracterizado por um desvio que pode ocorrer na distribuição de amplitude, com relação a uma distribuição uniforme fase-amplitude. Quando este cálculo é aplicado a um espaço de variáveis de interesse, de bandas de frequência para fase no eixo X e bandas de frequência para amplitude no eixo Y, ambas com largura definida, e o resultado é plotado como um gráfico de pseudocores, obtém-se o comodulograma. Para mais detalhes, sugere-se a leitura do artigo de Tort et al. [33]. Todas as rotinas de IM usadas nesse trabalho foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Adriano Bretanha Lopes Tort, após pedido.

Apesar de não haver evidências de direcionalidade modulatória, trabalhos usando acoplamento de frequências cruzadas afirmam que uma determinada característica de oscilações de baixa frequência (OBF) modula propriedades de oscilações de alta frequência (OAF). Dada esta tendência, bandas de frequências usadas neste estudo para análise da fase foram entre 0 e 14 Hz, enquanto que para análise da amplitude foram entre 8 e 300 Hz. As faixas de frequências escolhidas para análise da fase foram: 0 a 2 Hz, 2 a 6 Hz e 8 a 14 Hz. As duas primeiras faixas (0-2 Hz; 2-6Hz) foram combinadas com as seguintes faixas de frequência para análise da amplitude: 8 a 14 Hz, 14 a 30 Hz, 30 a 60 Hz, 60 a 100 Hz, 100 a 200 Hz e 200 a 300 Hz. A última faixa para fase (8-14 Hz) foi analisada em relação às amplitudes das faixas 60 a 100 Hz, 100 a 200 Hz e 200 a 300 Hz.

Ambos os grupos foram analisados por 220 s, em janelas deslizantes com duração de 30 s, deslocadas a cada 10 s. O grupo PTZ foi analisado a partir do início da infusão da droga e sempre incluiu os inícios das fases de mioclonia (MIO) e CTCG, além de um período de tempo durante a CTCG. Já o grupo CTRL foi analisado durante 220 s em que os animais permaneceram acordados e em livre movimento.

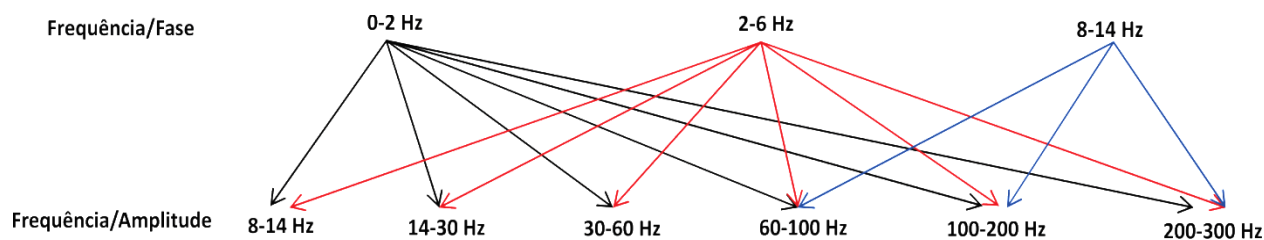


Fig.1. Pares de frequências usados para a análise do acoplamento fase-amplitude.

2.5 Histologia

Após todo o procedimento experimental, os encéfalos dos animais foram extraídos para conservação e posterior processamento histológico (secções coronais de 40 μ m) usando a técnica de coloração de Nissl (cresil violeta) para verificação do posicionamento dos eletrodos implantados. Todos os animais deste estudo tiveram confirmação histológica do posicionamento dos eletrodos em seus respectivos alvos.

2.6 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados usando testes paramétricos *t Student*. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3 Resultados

Animais do grupo de infusão PTZ demonstraram uma sequência de comportamentos típicos deste modelo: automatismos faciais seguidos de abalos mioclônicos, mioclonias de cabeça e membros anteriores (MIO), e, por fim, a CTCG.

O tempo médio de disparo de MIO foi de 79,5 s para animais contabilizados no registro do CX; 84,1 s para HP; e 86,7 s para TH. Já para CTCG os tempos médios foram 141 s; 141,3 s e 145,4 s, respectivamente. Abaixo são apresentados histogramas coincidentes com o tempo de análise de IM (220 s) mostrando o tempo de desencadeamento de MIO e CTCG por animal (Fig. 2).

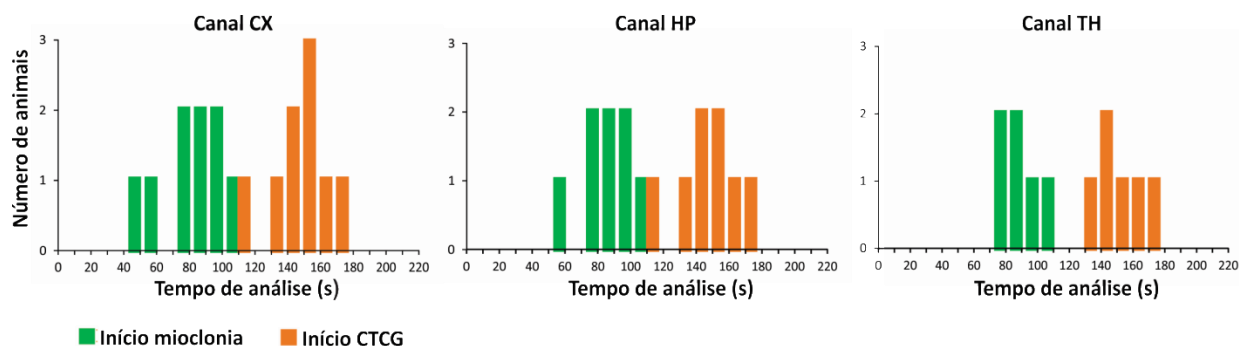


Fig. 2. Histogramas mostrando o tempo individual de disparo de mioclonia e CTCG para animais do grupo PTZ em cada canal registrado (CX, HP e TH).

Os comodulogramas de dois animais representativos, um de cada grupo (CTRL e PTZ), são apresentados na figura 3. A abscissa representa a frequência analisada pela fase e o eixo das ordenadas a frequência analisada pela amplitude. Cores quentes no mapa bidimensional indicam que a fase da frequência x modula a amplitude da frequência y . No comodulograma do animal CTRL é possível observar a uniformidade de cor no tom azul, que indica intensidade de acoplamento nula ou baixa, em todas as faixas de frequência analisadas. Já para o animal representativo do grupo PTZ, os comodulogramas (um para período de MIO e outro para período de CTCG) apresentam intensidades de cores diferentes em múltiplos pares de faixas de frequência que apresentaram maiores IM demonstrando maior intensidade de acoplamento.

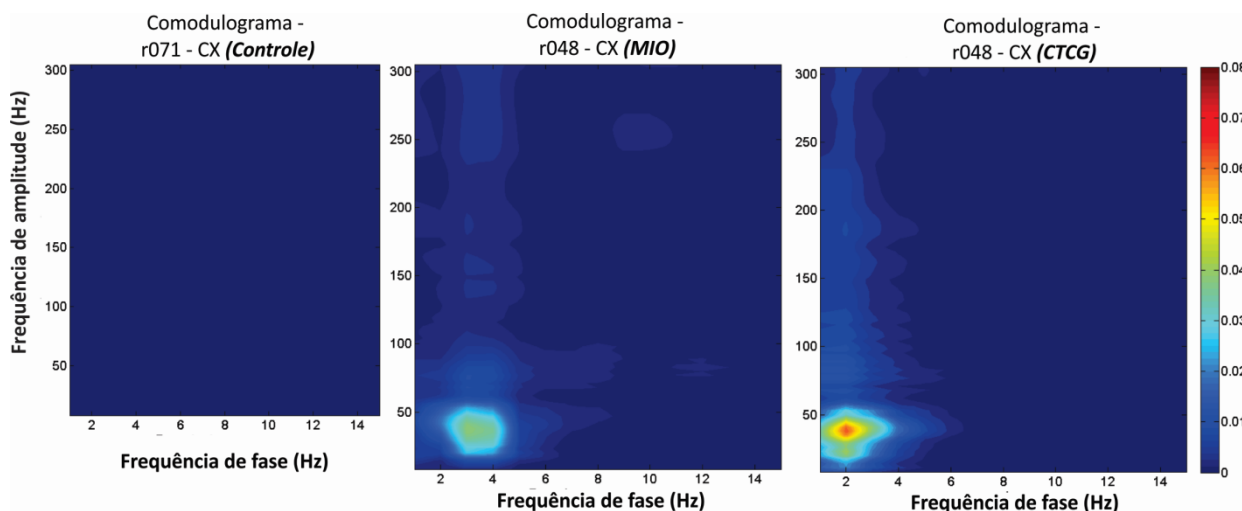


Fig. 3. Comodulogramas de dois animais representativos de cada grupo (r071 – Grupo CTRL e r048 – Grupo PTZ).

Os resultados para IM são apresentados nas figuras 4, 5 e 6, que mostram as combinações por faixas (linhas), de acordo com cada canal registrado (CX, HP e TH) (colunas). Em alguns casos, o sinal eletrográfico de animais do grupo PTZ foi irreversivelmente contaminado por artefatos de movimento ou ainda ruído de rede, inviabilizando a análise por IM. Como cada canal de registro sofreu diferente nível de interferência, o número amostral resultou distinto para cada caso: CX, $n=9$; HP, $n=8$; TH, $n=6$.

Análises feitas foram comparadas para cada janela de tempo entre os grupos CTRL e PTZ no decorrer dos 220 s de registro. Diferenças estatísticas significativas foram observadas nos próprios gráficos conforme símbolos específicos para cada nível de significância ($\dagger p < 0,05$; $\ddagger p < 0,01$; $\# p < 0,001$; $* p < 0,0001$).

A figura 4 mostra a sequência de combinações para a frequência de fase 0-2 Hz. Nestas primeiras análises é possível observar na evolução temporal do registro uma curva crescente que aponta o aumento do IM para grupo PTZ e maiores diferenças estatísticas entre as últimas janelas temporais, aquelas coincidentes com o tempo médio de disparo e ocorrência da CTCG. Maiores diferenças estatisticamente significantes foram encontradas principalmente no canal do CX para todas as combinações de faixas de frequência.

Na figura 5 podem ser observados os gráficos de IM para as combinações de faixas para a frequência de fase 2-6 Hz. Acoplamentos entre frequências fase-amplitude também são observados em todas as combinações propostas para o grupo PTZ se comparado ao grupo CTRL, porém mais intensas, segundo o IM, nas combinações frequência/amplitude de 8-14 Hz, 14-30 Hz e 30-60 Hz principalmente no canal do HP. Interessantemente, a análise do IM para frequência/fase 2-6 Hz aponta uma curva bifásica em que existem picos de intensidade de acoplamento coincidentes com o tempo médio de disparo e a ocorrência da MIO e da CTCG.

A figura 6 mostra as combinações de faixas de frequência/amplitude para a frequência de fase 8-14 Hz. Estas análises mostram menor intensidade de acoplamento fase-amplitude para OAF: alto gama (60-100 Hz), *ripples* (100-200 Hz) e *fast ripples* (200-300 Hz) no grupo PTZ (Note a menor escala para IM (0,02) em comparação à escala do IM das outras combinações de frequências fase-amplitude das figuras 4 e 5 (0,08)), mas ainda apresentam diferenças estatísticas entre algumas janelas de tempo de cada grupo experimental.

Para todas as análises das combinações das faixas de frequência para o grupo CTRL foi constatada uma uniformidade do IM com baixa intensidade de acoplamento no decorrer de todas as janelas de tempo analisadas do registro, o que se confirma pela uniformidade do comodulograma do animal representativo deste grupo (Fig. 3).

Por fim, foi observado um aumento significativo do IM na última janela de tempo em comparação com a primeira, na maior parte dos pares de faixas de frequência analisadas, como pode ser visto nos gráficos da Fig. 7.

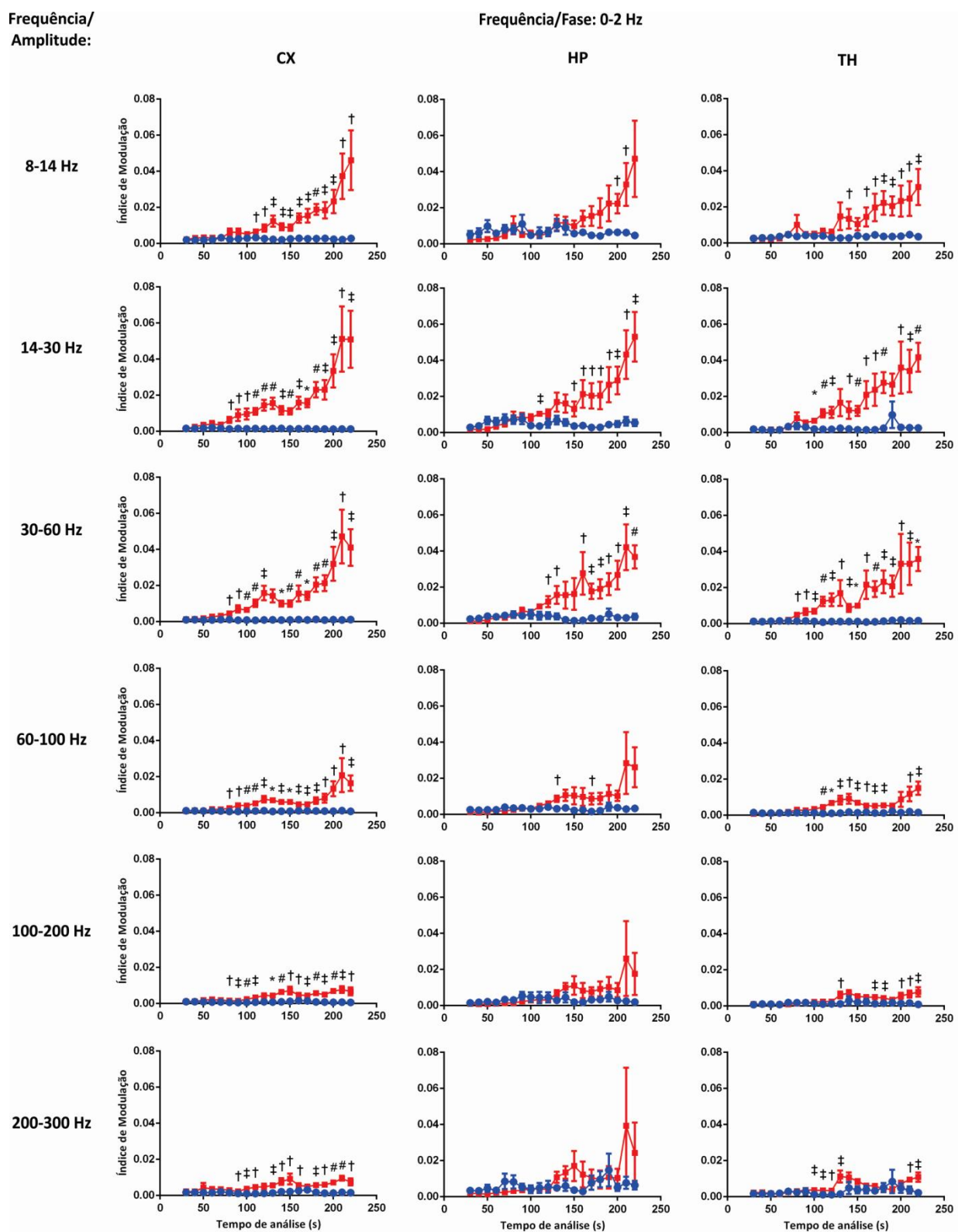


Fig. 4. IM para combinações entre faixa de frequência/fase **0-2 Hz** e faixas de frequências/amplitude (faixas extraídas entre 8 e 300 Hz). • Grupo CTRL ; ■ Grupo PTZ. Símbolos de nível de significância: † $p<0,05$; ‡ $p<0,01$; # $p<0,001$; * $p<0,0001$.

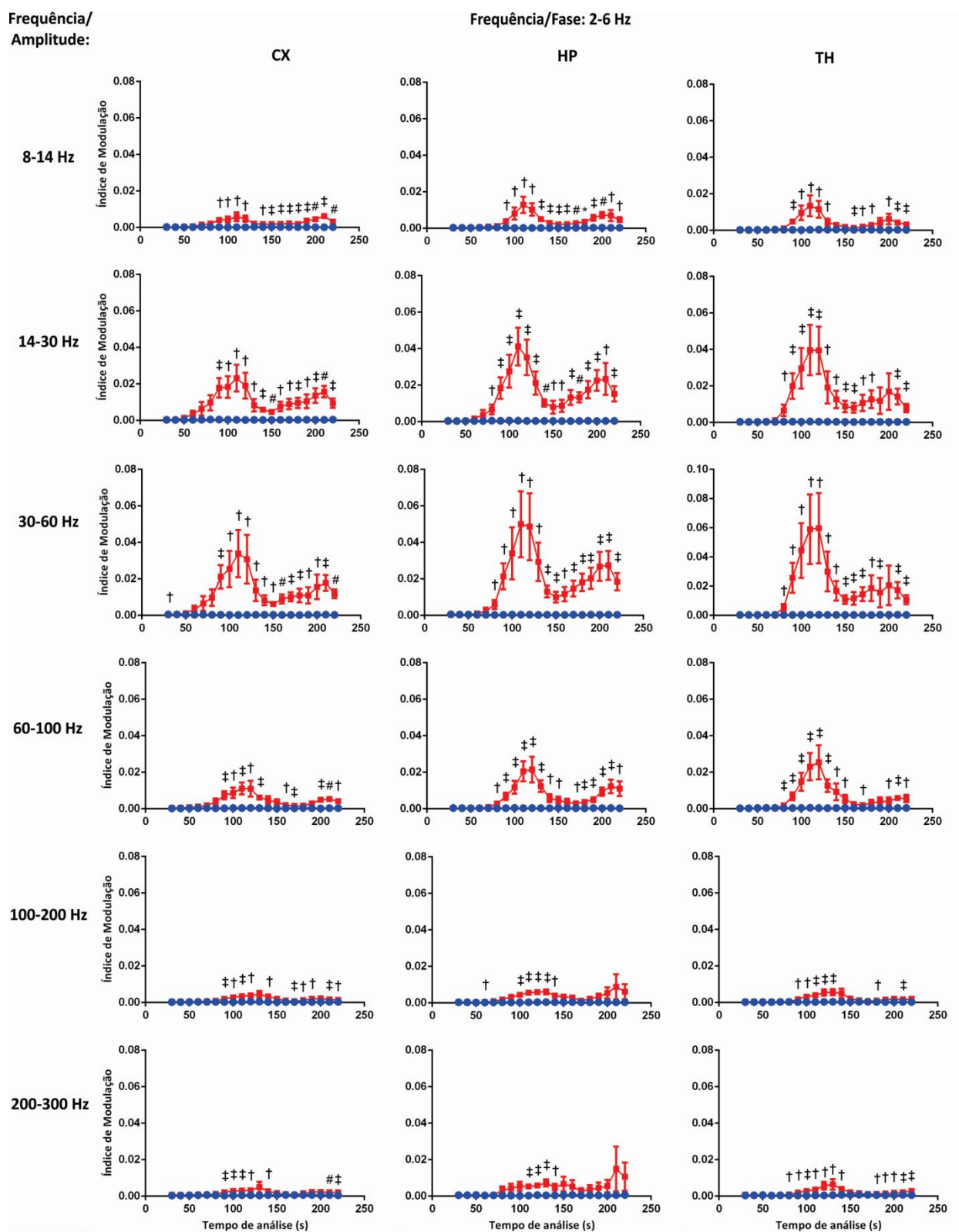


Fig. 5. IM para combinações entre faixa de frequência/fase **2-6 Hz** e faixas de frequências/amplitude (faixas extraídas entre 8 e 300 Hz). • Grupo CTRL ; ■ Grupo PTZ. Símbolos de nível de significância: † $p < 0,05$; ‡ $p < 0,01$; # $p < 0,001$; * $p < 0,0001$.

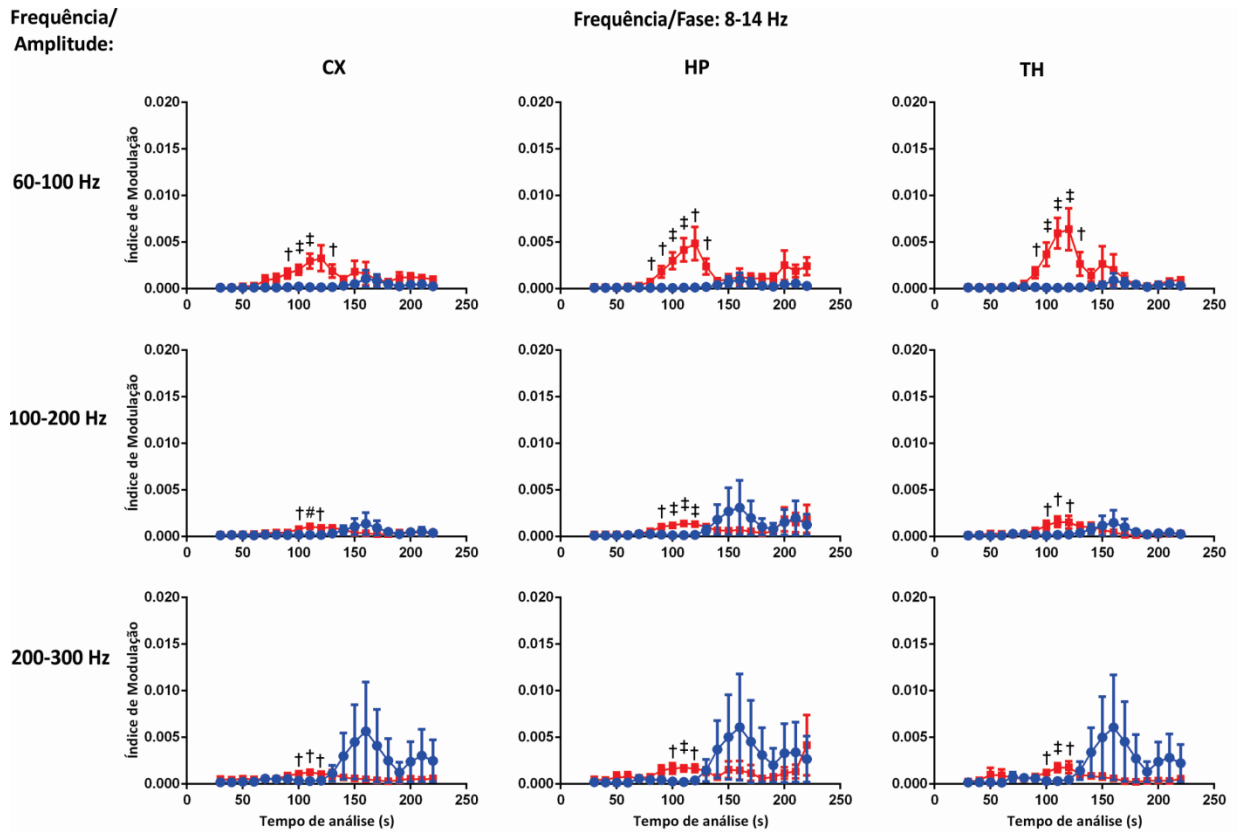


Fig. 6. IM para combinações entre faixa de frequência/fase 8-14 Hz e faixas de frequências/amplitude (faixas extraídas entre 60 e 300 Hz). • Grupo CTRL ; ■ Grupo PTZ. Símbolos de nível de significância: † p<0,05; ‡ p<0,01; # p<0,001; * p<0,0001.

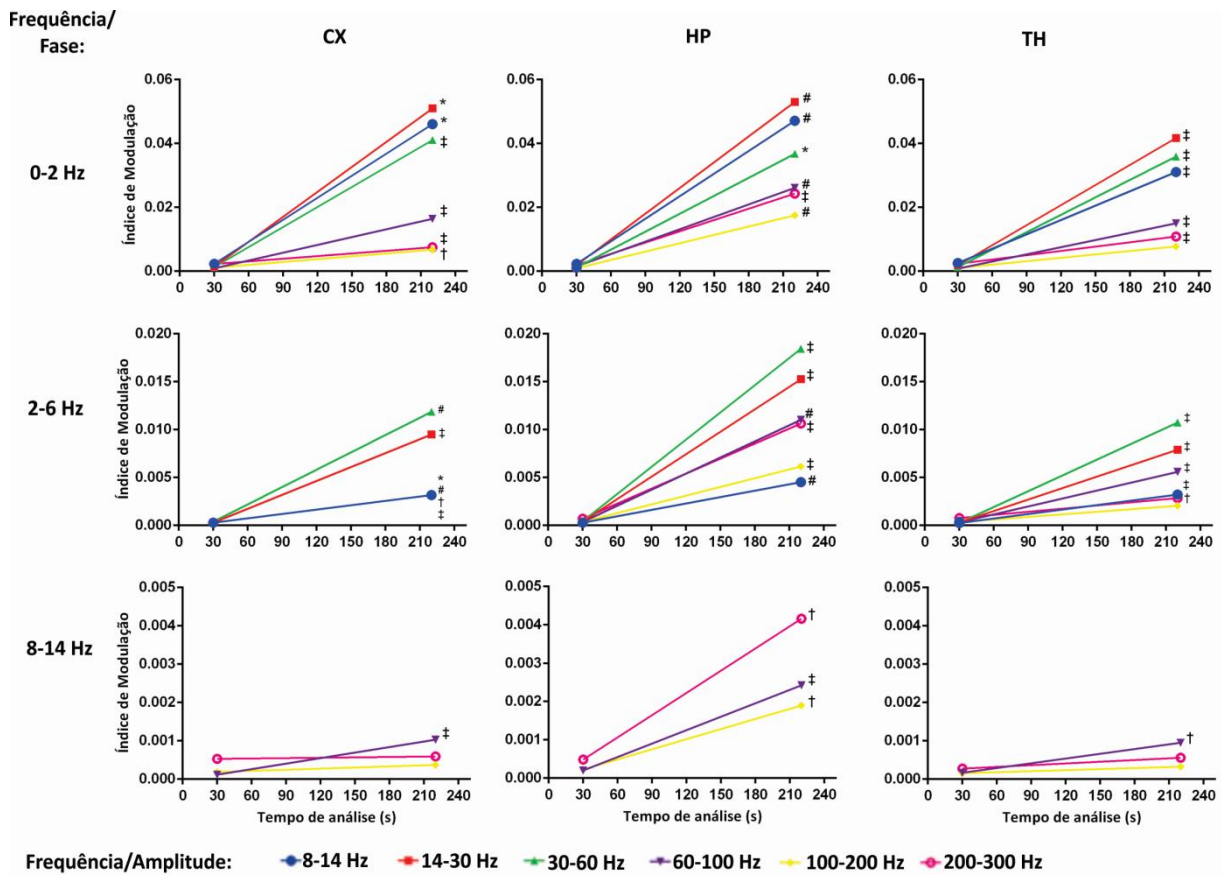


Fig. 7. Comparações entre primeira e última janelas de tempo (30s e 220s) do registro eletrofisiológico do grupo PTZ para todos os pares de frequências e todos os canais registrados (CX, HP, TH). Símbolos de nível de significância: † p<0,05; ‡ p<0,01; # p<0,001; * p<0,0001.

4 Discussão

Os LFP's obtidos dos registros experimentais dos grupos CTRL e PTZ foram analisados sob o ponto de vista de acoplamento de frequências cruzadas, por meio da técnica do IM, proposta e validada no estudo de Tort et al. [33]. Os resultados obtidos sugerem a existência de uma sincronização ampla entre os vários pares de frequências analisados e em todos os canais registrados (CX, HP e TH), dado o consistente aumento do IM (Fig. 4, 5 e 6). No entanto, bandas de frequência mais baixas para análise de fase, 0 a 2 Hz (Fig. 4) e 2 a 6 Hz (Fig. 5), em combinação a todas as outras faixas de frequência, mas principalmente para as faixas 8-14 Hz, 14-30 Hz e 30-60 Hz, mostraram maiores índices de acoplamento durante a evolução da crise epilética.

O acoplamento fase-amplitude de frequências possui correlações funcionais e mecanismos fisiológicos plausíveis. A fase da baixa frequência reflete a excitabilidade neuronal local, enquanto que o aumento na potência da alta frequência reflete um aumento geral da atividade sináptica da população neuronal, ou ainda, a ativação de redes neuronais conectadas [15]. O acoplamento entre frequências pode, portanto, servir como um mecanismo de transferência de informações de redes neuronais [11]. Efetivamente, a epilepsia é um estado hiperexcitável das redes neurais do cérebro. Durante um episódio de crise, quando esta hiperexcitabilidade é evidente, há uma sobrecarga de comunicação entre as várias regiões do cérebro, que é muitas vezes de longo alcance e, portanto, seria facilitada pelo acoplamento entre frequências [35].

Alguns poucos estudos forneceram evidências sobre acoplamento fase-amplitude entre faixas de frequências na epilepsia. Dentre eles destacou-se a interação entre ondas lentas (0-2 Hz) e baixo gama (30-60 Hz), *ripples* (100-200 Hz) e *fast ripples* (> 200 Hz). Nariai et al. mostraram que *ripples* dos espasmos epiléticos são acoplados com a fase de ritmos lentos (0-1 Hz) [19]. Guirgis et al. apontaram que o acoplamento entre frequências são dependentes do estado fisiológico/patológico. Pacientes que tiveram crises registradas durante o sono mostraram que oscilações na banda delta modulam *ripples* e *fast ripples*, enquanto pacientes que apresentaram crises durante a vigília apresentaram maior intensidade de acoplamento entre delta e baixo gama (~40 Hz) [18]. Corroborando estes estudos, nossos resultados também apontam acoplamento entre estas faixas de frequências e foi possível observar a partir dos LFP's que o IM aumenta, conforme a evolução da crise, principalmente nos canais do CX e TH (Fig. 4).

Levesque et al. apontam que OAF (*ripples* – 80-200 Hz) refletem a atividade de redes neuronais disfuncionais na epilepsia. No entanto, para que *ripples* possam ser considerados biomarcadores confiáveis nesta desordem neurológica, é necessária a coocorrência deste ritmo com outros eventos eletrofisiológicos [20], tendo em vista que estas oscilações também estão presentes em condições fisiológicas, apesar de se apresentarem de forma menos intensa [36]. Conclusões de Levesque et al. foram ratificadas pelo estudo vigente, uma vez que não só foram observados *ripples* durante a ictogênese, como também se pôde caracterizar que a amplitude desta banda de frequência provavelmente é modulada pela fase das bandas de 0-2 Hz, 2-6 Hz e 8-14 Hz.

Estudos mostram que fusos (8-14 Hz) estão relacionados com a consolidação de memórias [37] e evidências indicam que este fenômeno possivelmente está ligado ao acoplamento sincronizado com OAF (*ripples* ~200 Hz) no hipocampo [38, 39]. Tort et al. também mostraram a existência de acoplamento entre fusos e baixo e alto gama, por meio da técnica do IM, em registros hipocámpais de ratos em livre movimento [33]. Nossos resultados apontam um leve, porém existente, acoplamento entre a fase de ritmos de 8 a 14 Hz e a amplitude de ritmos nas bandas de 60 a 100 Hz, 100 a 200 Hz e ainda 200 a 300 Hz (*fast ripples*) (Fig. 6). No entanto, cabe ressaltar que o presente estudo não foi feito em condições fisiológicas e sim patológicas, tendo em vista que os acoplamentos foram constatados durante a evolução de crise epilética induzida por PTZ. Sendo assim, este tipo de acoplamento pode fornecer evidências de características presentes no processo epileptogênico, uma vez que este pode ser entendido como um tipo de memória aberrante [40].

Neste trabalho observamos uma provável complexa coordenação entre ritmos cerebrais e as fases ictais. O PTZ cria uma condição de hiperexcitabilidade por apresentar propriedades antagonistas GABAérgicas [41]. Quando administrado em doses baixas (< 40 mg/Kg) recruta áreas do sistema límbico provocando assim crises mínimas que se manifestam por comportamentos como espasmos, automatismos faciais, mastigação e clonias de cabeça e membros anteriores [42]. Em doses altas (> 60 mg/Kg) evoca crises máximas correlacionadas com a ativação do tronco encefálico e manifestação de CTCG [43]. Logo, comportamentos de MIO e CTCG se originam de circuitos diferentes o que pode fornecer explicação para a variabilidade ritmo-dependente vista nos resultados. Resultados da intensidade de acoplamentos entre a frequência de fase 2-6 Hz e faixas de frequência entre 8 e 300 Hz mostraram uma curva bifásica no gráfico de evolução temporal janelada dos LFP's. O primeiro pico de intensidade do IM aparece em torno do tempo médio de disparo para mioclonia e o segundo pico com menor intensidade aparece acerca do tempo médio de disparo para CTCG. Esses picos de intensidade são ainda mais intensos no canal do HP, substrato este envolvido na gênese das crises focais, e em acoplamentos com frequências de amplitude 8-14 Hz, 14-30 Hz e 30-60 Hz. Logo, os resultados mostram que no momento de disparo e durante a mioclonia o acoplamento fase-amplitude entre frequências que prevalece é para a frequência de fase 2-6 Hz.

Acoplamentos entre a frequência de fase 0-2 Hz e faixas de frequência entre 8 e 300 Hz apresentaram-se mais intensos nas últimas janelas de tempo analisadas, aquelas coincidentes com a média de tempo de disparo para CTCG, principalmente no canal do CX e em acoplamentos com todas as faixas de frequências de amplitude

analisadas. Ondas lentas (0-2 Hz) têm origem no córtex cerebral [44, 45], o que pode fornecer inferências sobre a prevalência de acoplamentos nesta frequência de fase no CX e durante o comportamento de CTCG.

Os resultados apresentados aqui fornecem evidências sobre os fundamentos fisiopatológicos da dinâmica das crises. Apesar de o IM apresentar desvantagens por perder informação do tempo (necessidade de janelas de tempo longas) e não deixar claro se o acoplamento ocorreu durante o período integral analisado ou se ocorreram *bursts* de acoplamento dentro dos períodos de tempo, ele apontou prováveis acoplamentos entre determinadas faixas de frequência analisadas para o grupo PTZ em comparação ao grupo CTRL. Também foi possível presumir um aumento da sincronização na evolução de uma crise a partir do aumento da intensidade de acoplamento entre frequências quando comparada a primeira e a última janela de tempo analisada na evolução temporal do período registrado para o grupo PTZ. Este conjunto de resultados sugere a existência de um hipersincronismo neuronal durante a evolução de uma crise epilética, além de caracterizar formas de sincronismo, apontando que estas são ritmo-dependentes.

A técnica de análise do IM teve seu desempenho avaliado em comparação a outras sete técnicas de medidas, também de acoplamento fase-amplitude, e apresentou vantagens em relação a todas elas [33]. No entanto, cabe enfatizar que o estudo de Tort et al. foi feito em condições fisiológicas normais, ou seja, não patológicas [33]. Kramer et al. [46] alertam que medidas de acoplamento de frequências podem exibir uma comodulação artefactual se usadas em análises de sinais contendo arestas agudas (do inglês: *sharp edges*), como por exemplo aquelas observadas nas ondas agudas (*sharp waves*) de sinais ictais [47]. O autor sugere uma inspeção rigorosa do sinal, além de algumas técnicas para possível identificação destas arestas agudas. Estas técnicas estão sendo implementadas por nossa equipe de pesquisa a fim de consolidar nossos resultados. Trabalhos em andamento do nosso grupo pretendem usar estas evidências para se compreender melhor os mecanismos pelos quais a NPS (estimulação de padrão temporal aleatório) é capaz de dessincronizar redes neurais promovendo efeitos anticonvulsivantes.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPEMIG (APQ 02485-15) pelo apoio financeiro e ao Prof. Dr. Adriano Bretanha Lopes Tort, do Instituto do Cérebro (ICe), por compartilhar as rotinas do IM e pela disponibilidade em dirimir nossas dúvidas acerca do método.

Referências

1. Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P.: Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470–2 (2005).
2. World Health Organization. Epilepsy in the WHO Africa region, bridging the gap: the global campaign against epilepsy “out of the shadows”. Geneva: World health Organization; (2004).
3. Harden, C.L., Maroof, D.A., Nikolov, B., Fowler, K., Sperling, M., Liporace, J., Pennell, P., Labar, D., Herzog, A.: The effect of seizure severity on quality of life in epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 11, 208–211 (2007).
4. Perucca, E., Tomson, T.: The pharmacological treatment of epilepsy in adults. *Lancet Neurol.* 10, 446–56 (2011).
5. Cascino, G.D.: Surgical treatment for epilepsy. *Epilepsy Research* 60, 179–186 (2004).
6. French, J.A.: Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia* 48 (Suppl. 1), 3–7 (2007).
7. Spencer, S.S.: When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? *Lancet Neurol.* 1, 375–82 (2002).
8. Medeiros, D.C., Moraes, M.F.D.: Focus on desynchronization rather than excitability: a new strategy for intraencephalic electrical stimulation. *Epilepsy Behav* 38, 32–36 (2014).
9. Kreuz, T., Mormann, F., Andrzejak, R.G., Kraskov, A., Lehnertz, K., Grassberger, P.: Measuring synchronization in coupled model systems: a comparison of different approaches. *Phys D Nonlinear Phenomena* 225, 29–42 (2007).
10. Lehnertz, K., Bialonski, S., Horstmann, M.T., Krug, D., Rothkegel, A., Staniek, M., Wagner, T.: Synchronization phenomena in human epileptic brain networks. *J Neurosci Methods.* 183(1), 42–8 (2009).
11. Canolty, R.T., Knight, R.T.: The functional role of cross-frequency coupling. *Trends Cogn. Sci.* 14, 506–515 (2010).
12. Jensen, O., Colgin, L.L.: Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. *Trends Cogn Sci* 11, 267–269 (2007).

13. Axmacher, N., Henseler, M.M., Jensen, O., Weinreich, I., Elger, C.E., Fell J.: Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 3228–3233 (2010).
14. Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., Hetke, J., Wise, K., Buzsáki, G.: Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15, 47–60 (1995).
15. Canolty, R.T., Edwards, E., Dalal, S.S., Soltani, M., Nagarajan, S.S., Kirsch, H.E., Berger, M.S., Barbaro, N.M., Knight, R.T.: High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science* 313, 1626–1628 (2006).
16. Yanagisawa, T., Yamashita, O., Hirata, M., Kishima, H., Saitoh, Y., Goto, T., Yoshimine, T., Kamitani, Y.: Regulation of motor representation by phase-amplitude coupling in the sensorimotor cortex. *J. Neurosci.* 32, 15467–15475 (2012).
17. Edakawa, K., Yanagisawa, T., Kishima, H., Fukuma, R., Oshino, S., Khoo, R.M., Kobayashi, M., Tanaka, M., Yoshimine, T.: Detection of Epileptic Seizures Using Phase–Amplitude Coupling in Intracranial Electroencephalography. *Scientific Reports* 6 (25422), (2016).
18. Guirgis, M., Chinvarun, Y., Carlen, P. L. & Bardakjian, B. L. The role of delta-modulated high frequency oscillations in seizure state classification. *Conf. Proc. IEEE. Eng. Med. Biol. Soc.*, 6595-6598 (2013).
19. Nariai, H., Matsuzaki, N., Juhasz, C., Nagasawa, T., Sood, S., Chugani, H., Asano, E.: Ictal high-frequency oscillations at 80–200 Hz coupled with delta phase in epileptic spasms. *Epilepsia* 52, 130–134 (2011).
20. Lévesque, M., Shiri, Z., Chen, L.Y., Avoli, M.: High-frequency oscillations and mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience Letters* (2017).
21. Penfield, W., Jasper, H. *Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain*. Little Brown, Boston (1954).
22. Varela, F., Lachaux, J.P., Rodriguez, E., Martinerie, J.: The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 229–239 (2001).
23. Uhlhaas, P.J., Singer, W.: Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron* 52, 155–168 (2006).
24. Tass, P.A., Hauptmann, C.: Therapeutic modulation of synaptic connectivity with desynchronizing brain stimulation. *Int. J. Psychophysiol* 64, 53-61 (2007).
25. Cota, V.R., Drabowski, B.M.B., de Oliveira, J.C., Moraes, M.F.D.: The Epileptic Amygdala: Toward the Development of a Neural Prosthesis by Temporally Coded Electrical Stimulation. *Journal of Neuroscience Research* 94, 463-485 (2016).
26. Cota, V.R., Medeiros, D.C., Vilela, M.R.S.P., Doretto, M.C., Moraes, M.F.D.: Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. *Epilepsy Behav* 14, 26–31 (2009).
27. de Oliveira, J.C., Medeiros, D.C., de Souza e Rezende, G.H., Moraes, M.F.D., Cota, V.R.: Temporally unstructured electrical stimulation to the amygdala suppresses behavioral chronic seizures of the pilocarpine animal model. *Epilepsy Behav* 36, 159–164 (2014).
28. Mesquita, M.B.S., Medeiros, D.C., Cota, V.R., Richardson, M.P., Williams, S., Moraes, M.F.D.: Distinct temporal patterns of electrical stimulation influence neural recruitment during PTZ infusion: an fMRI study. *Prog Biophys Mol Biol* 105, 109–118 (2011).
29. Medeiros, D.C., Cota, V.R., Vilela, M.R.S.P., Mourão, F.A.G., Massensini, A.R., Moraes, M.F.D.: Anatomically dependent anticonvulsant properties of temporally-coded electrical stimulation. *Epilepsy Behav* 23, 294–297 (2012).
30. Netoff, T.I., Schiff, S.J.: Decreased neuronal synchronization during experimental seizures. *J. Neurosci.* 22, 7297–7307 (2002).
31. Garcia Dominguez, L., Wennberg, R.A., Gaetz, W., Cheyne, D., Snead, O.C., Perez Velazquez, J.L.: Enhanced synchrony in epileptiform activity? Local versus distant phase synchronization in generalized seizures. *J. Neurosci.* 25, 8077–8084 (2005).
32. van Putten, M.J.: Nearest neighbor phase synchronization as a measure to detect seizure activity from scalp EEG recordings. *J. Clin. Neurophysiol.* 20, 320–325 (2003).
33. Tort, A.B.L., Komorowski, R., Eichenbaum, H., Kopell, N.: Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. *J Neurophysiol* 104, 1195–1210 (2010).
34. Paxinos, G., Watson, C.: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 1 edn, Academic Press, San Diego (2007).
35. Schnitzler, Gross, J.: Normal and pathological oscillatory communication in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 285–296 (2005).

36. Matsumoto, B.H., Brinkmann, S.M., Stead, J., Matsumoto, M.T., Kucewicz, W.R., Marsh, F., Meyer, G., Worrell: Pathological and physiological high-frequency oscillations in focal human epilepsy. *J. Neurophysiol* 110, 1958–1964, (2013).
37. Blanco, W., Pereira, C.M., Cota V.R., Souza, A.C., Renn e-Costa, C., Santos, S., Dias, G., Guerreiro, A.M.G., Tort, A.B.L., Neto, A.D., Ribeiro, S.: Synaptic homeostasis and restructuring across the sleep–wake cycle. *PLoS Comput Biol* 11:e1004241 (2015).
38. Siapas, A. G., Wilson, M. A.: Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron* 21, 1123–1128 (1998).
39. Sirota, A., Csicsvari, J., Buhl, D., and Buzsaki, G.: Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2065–2069 (2003).
40. Botterill, J.J., Brymer, K.J., Caruncho, H.J., Kalynchuk, L.E.: Aberrant hippocampal neurogenesis after limbic kindling: Relationship to BDNF and hippocampal-dependent memory. *Epilepsy Behav.* 47, 83-92 (2015).
41. MacDonald, R. L., Barker, J. L.: Pentylentetrazol and penicillin are selective antagonists of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Nature* 267 (5613), 720-21 (1977).
42. Eells, J. B., Clough, R. W., Browning, R. A., Jobe, P. C.: Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylentetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience* 123, 279-92 (2004).
43. Velisek, L., Kubova, H., Pohl, M., Stankova, L., Mares, P., Schikero,va, R.: Pentylentetrazol-Induced Seizures In Rats: An Ontogenetic Study. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346, 588-91 (1992) .
44. Achermann, P. & Borbely, A. A.: Low-frequency (< 1 Hz) oscillations in the human sleep electroencephalogram. *Neuroscience* 81, 213–222 (1997).
45. Steriade, M., Contreras, D., Curro Dossi, R., Nuñez A.: The slow (<1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. *J. Neurosci.* 13, 3284–3299 (1993).
46. Kramer, M.A., Tort, A.B.L., Kopell, N.J.: Sharp edge artifacts and spurious coupling in EEG frequency comodulation measures. *J Neurosci Methods* 170, 352–357 (2008).
47. Niedermeyer, E. Abnormal EEG patterns: epileptic and paroxysmal. In: Niedermeyer, E., Lopes Da Silva, F., editors. *Electroencephalography: basic principles, clinical applications and related fields*. Fourth ed Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins (1999).